

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója  
Quarterly Bulletin of the Hungarian Biochemical Society

Szerkesztőbizottság:  
ALKONYI ISTVÁN, BÁNFALVI GÁSPÁR, FALUS ANDRÁS, FÉSÜS LÁSZLÓ,  
GERGELY PÁL, HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS

Felelős szerkesztő:  
SZÉKÁCS ANDRÁS

XXVIII. ÉVF. 1. SZÁM

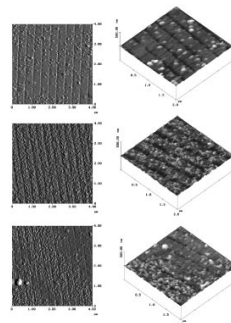
2004. MÁRCIUS

A tartalomról:

- ◇ Atomierő mikroszkóp alkalmazása OWLS alapú immunszenzor felületének vizsgálatára – *Keresztes Zsófia, Kálmán Erika, Ernst András és Székács András*
- ◇ Optikai (OWLS) immunszenzorok fejlesztése makromolekulák és kis molekulájú célvegyületek kimutatására – *Inna Levkovets, Adányi Nóra, Trummer Nikoletta, Váradi Mária, Szendrő István, Nickolaj F. Starodub és Székács András*
- ◇ BioGen tábor – az ötlettől a megvalósulásig... – *Tátrai Ágnes*
- ◇ Új megoldás DNS, RNS és fehérje kapillárelektroforetikus vizsgálatára – *Andrásfalvy Márton*
- ◇ 6. Magyar Ökológus Kongresszus – *Bakonyi Gábor*
- ◇ Sejtspecifikus genomika lézer-mikrodisszekció segítségével – *Holló Róbert*

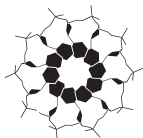
Címlapkép:

Az OWLS chip szilanizált üvegfelületéről nyert atomierő mikroszkópos (AFM) képek két- (balra) és háromdimenziós (jobbra) ábrázolásban a makromolekulák rögzítésének különböző fázisainál. A szilanizált chipfelület a makromolekulák rögzítése előtt (fent), a BSA-trifluralin konjugátum antigén rögzítése után (középen), valamint az antigén és a trifluralinspecifikus antitestek közötti immunkomplex kialakulása után (alul). Az utóbbi fázisnál az immunkomplex jelentős deszorpciója figyelhető meg, amikor a felszíni borítottság a korábbi 50 nm átmérőjű foltok által alkotott, egyenletesnek mondható szintről (~45%) leromlott. Az AFM mérések a MikroVákuum Kft. által gyártott chipokról a gyártó engedélyével készültek (ld. a vonatkozó közleményeket a 2–4. és a 7–15. oldalakon).



Contents:

- ◇ Application of atomic force microscopy for the investigation of OWLS immunosensor surface – *Zsófia Keresztes, Erika Kálmán, András Ernst and András Székács*
- ◇ Development of optical (OWLS) immunosensors for macromolecules and small analytes – *Inna Levkovets, Nóra Adányi, Nikoletta Trummer, Mária Váradi, István Szendrő, Nickolaj F. Starodub and András Székács*
- ◇ BioGen course – from idea to realization... – *Ágnes Tátrai*
- ◇ New approach to capillary electrophoretic analysis of DNA, RNA and proteins – *Márton Andrásfalvy*
- ◇ 6th Hungarian Congress on Ecology – *Gábor Bakonyi*
- ◇ Cell-specific genomics with laser capture microdissection – *Róbert Holló*



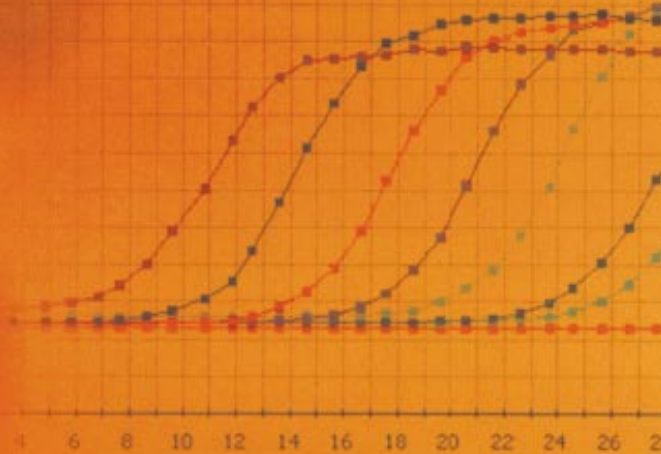
MAGYAR  
BIOKÉMIAI  
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 1518 Budapest, Pf. 7  
e-mail: biokemia@nki.hu <http://www.webio.hu/biokemia>  
Felelős kiadó: Dr. Friedrich Péter

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455  
Készíti és terjeszti a **dART studio** (1137 Budapest, Újpesti rakpart 6. Tel.: 349-3426)  
Ára • a Magyar Biokémiai Egyesület tagjai részére: tagdíj ellenében,  
• nem egyesületi tagoknak: 680 Ft + postaköltség

**WEBio**  
BioScience Portal

Now available for  
Capillary-Based PCR  
Thermal Cyclers



*FailSafe PCR Results in*

**Real-Time!**

### FailSafe™ Real-Time PCR System

- Extends the unsurpassed **specificity, sensitivity, and consistency** of the FailSafe™ PCR System to quantitative PCR applications with a **broader dynamic range**.
- Like our standard FailSafe™ PCR System, this new real-time PCR kit ensures successful quantitative PCR the **first time and every time**.

### What makes the FailSafe™ Real-Time PCR System "fail-safe"?

- **FailSafe PCR Enzyme Mix:** A unique blend of thermostable enzymes that is capable of amplifying the most difficult DNA templates with extremely high sensitivity and fidelity, with no extra "hot start" step.
- **A set of FailSafe PreMixes:** Include SYBR® Green I dye, dNTPs, buffer, and varying amounts of MgCl<sub>2</sub> and the FailSafe PCR Enhancer (with betaine).\*



**EPICENTRE®**  
www.epicentre.com  
888-824-8794

Circle 26 on Reader Service Card

\* The use of betaine in DNA or RNA polymerase reactions is covered by patent rights exclusively licensed to EPICENTRE Technologies.

EPICENTRE is a registered trademark, FailSafe is a trademark of EPICENTRE Technologies. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. SYBR® Green I Dye is covered by patents.

**kvalitex**

Tudományos, Technológiai, Kereskedelmi Kft. • Scientific, Technological, Trading Ltd.

H-1136 Budapest, Pannónia u. 7. Tel.: (36-1) 340-4700 Tel./fax: (36-1) 339-8274 E-mail: kvalitex@axelero.hu

# Atomierő mikroszkóp alkalmazása OWLS alapú immunszenzor felületének vizsgálatára

## Application of atomic force microscopy for the investigation of OWLS immunosensor surface

Keresztes Zsófia<sup>1</sup>, Kálmán Erika<sup>1</sup>, Ernst András<sup>2</sup>, Székács András<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTA Kémiai Kutatóközpont, 1025 Budapest, Pusztaszeri út 59–67., E-mail: zsofi@chemres.hu

<sup>2</sup> MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, 1125 Budapest, Pf. 102, E-mail: aszek@nki.hu

Keresztes, Zs.<sup>1</sup>, Kálmán, E.<sup>1</sup>, Ernst, A.<sup>2</sup>, Székács, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chemical Research Center, Hungarian Academy of Sciences, H-1025 Budapest, Pusztaszeri út 59–67., Hungary, E-mail: zsofi@chemres.hu

<sup>2</sup> Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, H-1125 Budapest, POB 102, Hungary, E-mail: aszek@nki.hu

### Summary

High resolution imaging of an optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) immunosensor surface was accomplished by atomic force microscopy (AFM) in liquid environment. Binding of a bovine serum albumin conjugate of a haptén derivative of the herbicide active ingredient trifluralin to silanized glass surface and the effect of

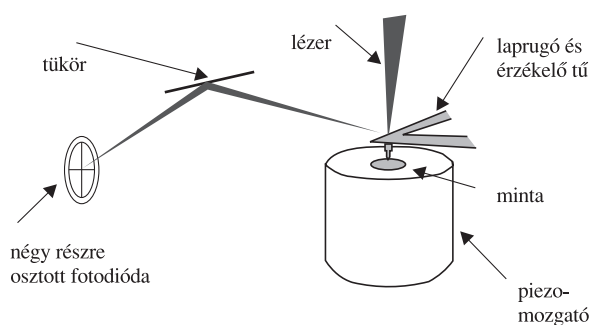
subsequent antibody adsorption was followed in order to relate the detected OWLS spectroscopic signal to real sensor surface coverage by the protein conjugate. AFM gave valuable information for the development of immobilization technique used in the sensor development, by showing the effect of protein aggregation and the consequence of insufficient strength of surface binding.

Az 1986-ban kifejlesztésre került atomierő mikroszkóp [1] (*atomic force microscope*, AFM) nanométer alatti feloldóképességét nem a hagyományos, optikai leképezés elve alapján éri el. A pásztázószondás mikroszkópok – amelyek közé az AFM is tartozik – képalkotásának közös jellemzője, hogy egy mechanikus rendszer egy igen hegyesre kialakított szondát mozgat a felület közelében, miközben érzékeli a szonda és a minta között fellépő kölcsönhatást. Az érzékelt jelet a jelfeldolgozó rendszer a pásztázott kétdimenziós felület harmadik dimenziójaként jeleníti meg, ilyen módon adva térbeli képi formát a detektált információnak. Az AFM esetében a szonda egy laprugó végére rögzített, szilíciumból vagy szilícium-nitridből mikroelektronikai eljárással készült tű. A tű a minta felé közelítve – a minta felületétől függő – különböző nagyságú és irányultságú erővel lép azzal kölcsönhatásba. A tűre ható vonzó- és taszítóerők a

laprugó le-, illetve felhajlását idézik elő, amelynek detektálása a rugónak a tűvel ellentétes, aranyozott felületéről visszaverődő lézernyaláb fotodiódás érzékelésével történik. A mérés elvét az 1. ábra mutatja be.

Mikroorganizmusok, szöveti sejtek és biológiai makromolekulák felületének vizsgálatában számos új megközelítésre ad lehetőséget az AFM technika. A nagyfelbontású elektronmikroszkópiától eltérően nem igényel sem vákuumkörnyezetet, sem vezető felületű mintát. A mérési környezet lehet levegő vagy más gázatmoszféra, illetve a sejtek és biomolekulák természetes környezetének megfelelő folyadék, mely utóbbi körülmény megteremti az *in situ* vizsgálatok lehetőségét.

Biológiai makromolekulák eddig legnagyobb felbontású AFM leképezését kétdimenziós fehérjekristályok vizsgálatával érték el [2]. Ebben az esetben is fontos feltétel olyan mérési folyadékkörnye-



1. ábra Az atomierő mikroszkópia mérési elve.

zet – puffer – választása, amely lecsökkenti a mérőszonda és a vizsgálandó felület töltéséből adódó taszítóerőt, ilyen módon teremtve meg a szonda és a mérendő felület közeledésének lehetőségét. Ilyen típusú minták elektronmikroszkópos felvétellel és röntgenkristallográfiai mérésekkel történő összehasonlításakor igen jó, nanométer alatti felbontásbeli egyezést találtak [3].

Fehérjemolekulák funkcionalitásának, konformációs változásának vizsgálata szintén megvalósítható fiziológiás körülmények között [4]. E folyamatok időbeni követésének gátat szab az AFM szonda mechanikai tulajdonságaiból következő, korlátozott képfelvételi sebesség. Egy kép felvételének átlagos időigénye körülbelül 1 perc, ez az időtar-

tam pedig csak statikus, rögzített konformációk vizsgálatára ad lehetőséget. Speciális szondák fejlesztésével egyes esetekben sikerült ezt az időtartamot töredékére csökkenteni, azonban a jelenlegi másodpercnyi időhossz is túllépi a legtöbb biológiai folyamat lefutási idejét [5].

Az immunszenzorok kialakításának alapja az antigén–antitest komplementer molekulapárok közötti specifikus kölcsönhatás során kialakuló stabil komplexek képződése. Az analitikai mérésekben való alkalmazás a meghatározandó komponensre specifikus antigénhez történő kötődés során előálló komplextermék detektálásán alapul. Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiai (*optical waveguide lightmode spectroscopy*, OWLS) szenzor egyik alkalmazási lehetősége az ilyen típusú immunspecifikus molekuláris rétegek kialakulásának érzékelése [6]. Az antigén, majd az antitest felületi kötődése módosítja a szenzor felületének törésmutatóját, ezáltal megváltoztatja a polarizált fény azon beesési szögét, amely az optikai ráccsal módosított hullámvezető rétegben rezonanciát idéz elő, és amely a módszer gyakorlatában a detektált információt jelenti.

A bemutatásra kerülő vizsgálatunkban egy ilyen típusú, integrált OWLS immunszenzor (gyártó:



**Keresztes Zsófia** 1994-ben végzett a Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki Karán. Azóta az MTA KKKI Felületmódosítás és Nanoszerkezetek Osztályának munkatársa. 2001-ben védte meg PhD-értekezését, amely biológiai eredetű korróziós folyamatok elektrokémiai és felületanalitikai vizsgálatával foglalkozott. Jelenleg posztdoktori tanulmányait végzi *Université Catholique de Louvain, Département de Chimie des Interfaces* biológiai felületkémiai foglalkozó osztályán. Főbb kutatási területei: biomineralizációs folyamatok felületanalitikája, atomierő mikroszkópia biológiai alkalmazása.

**Kálmán Erika** vegyészmérnök, 1971 óta az MTA SzKKL, illetve MTA KKKI kutatója, 1995-től habilitált professzor, egyetemi magántanár, 1996-tól a kémiai tudományok doktora, az MTA KKKI Felületmódosítás és Nanoszerkezetek Osztályának vezetője. Főbb kutatási területei: oldatszerkezet-vizsgálat, fém/oldat határfelületi jelenségek, felületmódosítás. Az általa vezetett iskolából több vegyészmérnök, egyetemi doktor, kandidátus, PhD került ki, jelenleg is több PhD-hallgató témavezetője.



**Ernst András** 2002-ben végzett a Pannon Agrártudományi Egyetem agrármérnöki szakán, vegyész másoddiplomát 2003-ban szerzett, jelenleg PhD-hallgató a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki Karán. Kutatóhelye 2001 óta az MTA NKI, ahol növényvédőszer-hatóanyagok műszeres analitikai vizsgálataival foglalkozik.

**Székács András** vegyészmérnök, 1984 óta az MTA NKI kutatója, 1999-től habilitált egyetemi oktató, 2002 óta az MTA doktora (kémia), az MTA NKI Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai osztályának osztályvezetője. Főbb kutatási területei: immunanalitikai (ELISA) módszerek fejlesztése és környezetanalitikai alkalmazása, növényvédő szerek, toxinok és antropogén szennyezők analitikai kémiai és ökotoxikológiai vizsgálatai. Kutatócsoportjában számos egyetemi és PhD-hallgató témavezetője.



MikroVákuum Kft., Budapest) felületén bekövetkező adszorpciós folyamat nyomon követésére alkalmaztuk az atomerő mikroszkópos technikát. Méréseinkben a szenzor felületén rögzített antigénmolekulák rendezettségét, illetve az antigén-antitest specifikus reakció utáni felületborítottságváltozásokat tanulmányoztuk. A vizsgálatban a korábbiakban a trifluralin gyomirtó szer hatóanyag-kimutatására kidolgozott enzimjelzéses immunoassay (ELISA) [7], valamint OWLS [8] rendszerekben alkalmazott immunreagenseket alkalmaztuk. OWLS immunszenzorok hasonló AFM vizsgálatai [9] a szenzorfelületen rögzített antitest kötőréteg vizsgálataira irányulnak, míg mi a rögzített antigén alapú, versengő OWLS rendszerben vizsgáltuk az immunkomponensek megkötődését. A dinitroanilin-származék trifluralin [(*N,N*-dipropil-2,6-dinitro-4-trifluor-metil)-anilin] *N*-propil-csoportjai helyén hidrogénatomot, illetve karboxi-alkil-csoportot tartalmazó hapténvegyület marhaszérumban (BSA) képzett konjugátuma – amely felületi érzékenyítő antigénként alkalmazható volt a trifluralinspecifikus antitest segítségével kialakított versengő ELISA [7] és OWLS [8,10] rendszerekben – az aminocsoportokkal ellátott szenzorfelületen kovalens kötással rögzíthető. Az így rögzített antigénhez az antitestek nagy affinitással kötődni képesek.

**2. ábra** (lásd a címlapon) Az OWLS-chip szilanizált üvegfelületéről nyert atomerő mikroszkópos (AFM) képek két- (balra) és háromdimenziós (jobbra) ábrázolásban a makromolekulák rögzítésének különböző fázisainál. A szilanizált chipfelület a makromolekulák rögzítése előtt (fent), a BSA-trifluralin konjugátum antigén rögzítése után (középen), valamint az antigén és a trifluralinspecifikus antitestek közötti immunkomplex kialakulása után (alul). Az utóbbi fázisnál az immunkomplex jelentős deszorpciója figyelhető meg, amikor a felszíni borítottság a korábbi 50 nm átmérőjű foltok által alkotott, egyenletesnek mondható szintről (~45%) leromlott. Az AFM mérések a MikroVákuum Kft. által gyártott chipekről a gyártó engedélyével készültek.

A trifluralin herbicid haptén-BSA konjugátuma (~60 kD) szilanizált szenzorfelületre történő rögzítése, majd a módosított szenzorfelület trifluralint kapcsoló antitesttel való (~180 kD) reagáltatása utáni állapotokat az OWLS szenzor mérőcellájában lévő körülményekhez hasonló feltételek között vizsgáltuk. Méréseinkhez Digital Instruments Nanoscope IIIa (Santa Barbara, CA, USA) atomerő

mikroszkópot használtunk, 12,5  $\mu\text{m}$  maximális pásztázási méretű piezo-mozgatóval és 0,12 N/m rugóállandójú  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tűszondával. A felvételek folyadék fázisban, TRIS pufferben, szobahőmérsékleten készültek. A makromolekulák chipfelszínen való rögzítésének egyes fázisairól nyert AFM képeket a 2. ábra mutatja be.

A képek illusztratív példák a mérések során nyerhető morfológiai információkról. A 2. ábrán (A) jól láthatók a szilanizált szenzorfelületen az optikai rács mélyedései, amelyek körülbelül 400 nanométerre helyezkednek el egymástól. Az antigénrögzítés (B) után a szenzorfelület fehérjeaggregátumokkal való körülbelül 45%-os fedettsége állapítható meg VISILOG 5.2 képanalizáló software alapján. Az antigénmolekulák átlagosan 50 nanométer átmérőjű aggregátumokká állnak össze. Az immunreakció bekövetkezte, az antitest-antigén kötődés utáni állapot (C) viszont a felületi borítottság hibáit mutatja, tehát az itt illusztrált esetben a primer antigén felületi kötődési erőssége nem volt elegendő ahhoz, hogy a felületen a specifikus antigén-antitest kötés kialakulása után is teljes mértékben megmaradjon.

## Köszönetnyilvánítás

Az immunreagensek és az OWLS immunszenzor chipfelületek előállítását a BIO-73/2001 és OMFB 02193/1999 (Oktatási Minisztérium), valamint a T032232 és T033021 (OTKA) kutatási programok finanszírozták. A szerzők köszönetüket fejezik ki azért, hogy a MikroVákuum Mikroelektronikai és Vákuumtechnikai Kft. a vizsgálatokat OWLS-chipek és OWLS mérési lehetőség biztosításával támogatta.

## Irodalomjegyzék

- [1] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986) *Phys. Rev. Lett.*, **56**: 930–933.
- [2] Müller, D. J., Baumeister, W., Engel, A. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**: 3025–3030.
- [3] Heymann, J. B., Müller, D. J., Landau, E. M., Rosenbusch, J. P., Pebay-Peyroula, E., Büldt, G., Engel, A. (1999) *J. Struct. Biol.*, **128**: 243–249.
- [4] Engel, A., Müller, D. J. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**: 715–718.
- [5] Viani, M. B., Schäffer, T. E., Paloczi, G. T., Pietrasanta, L. I., Smith, B. L., Thompson, J. B., Richter, M., Rief, M., Gaub, H. E., Plaxco, K. W., Cleland, A. N., Hansma, H. G., Hansma, P. K. (1999) *Rev. Sci. Instrum.*, **70**: 4300–4303.
- [6] Vörös, J., Ramsden, J. J., Csúcs, G., Szendrő, I., De Paul, S. M., Textor, M., Spencer, N. D. (2002) *Biomaterials*, **23**: 3699–3710.
- [7] Hegedűs, Gy., Béla, I., Székács, A. (2000) *Anal. Chim. Acta*, **421**: 121–133.
- [8] Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) *Anal. Chim. Acta*, **487**: 31–42.
- [9] Szalai, B. (2001) Fehérjék felületi kötődésének vizsgálata atomerő mikroszkóppal. Szakdolgozat, ELTE–TTK, Biológiai Fizika Tanszék.
- [10] Levkovets, I., Adányi, N., Trummer, N., Váradi, M., Szendrő, I., Starodub, N. F., Székács, A. (2004) *Biokémia*, **XXVIII**: 7–15.



# sartorius



Protein isolation,  
concentration and  
purification

Monoclonal antibody  
purification from  
tissue culture supernatant

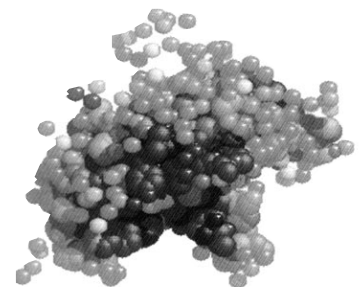
Endotoxin Removal

Charged carbohydrate  
purification

Clinical diagnosis,  
analyses

# membran

Sartorius-Membrán Kft.  
2092 Budakeszi, Kagyló utca 5.  
Tel.: 06-23-457-148, 06-23-457-227, 06-23-457-228  
Fax: 06-23-457-147  
E-mail: [s-membran@s-membran.hu](mailto:s-membran@s-membran.hu)  
web: [www.s-membran.hu](http://www.s-membran.hu)



# VÍZANALITIKA

## WTW

\* mobil  
\* laboratóriumi és  
\* on-line  
kivitelben

### PARAMÉTEREK

\* pH  
\* redox potenciál  
\* kionszelektív mérések  
\* oldott oxigén  
\* vezetőképesség  
\* hőmérséklet  
\* zavarosság  
\* BCI, KCl  
\* NH, NO, NO<sub>2</sub>  
\* Po, P, TOC, SAC  
\* automata  
vízmintazvevők

\* TÜV  
\* ISO  
\* GLP  
\* 3év garancia



**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA

# SZÜRŐPAPÍROK MEMBRÁNSZÜRŐK SZÜRŐKARTONOK

A tradicionális minőség megújult változatai a megbízhatóságot garantálják!



**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

# GYORSTESZTEK



UNIVERSÁLIS UV-TEST  
INDIKÁTOR- ÉS TESZTPAPIROK  
1 - 1000 mg/l

VISOCOLOR  
VIZUÁLIS TESZTKÉSZLETEK  
0,01 - 100 mg/l



FOTOMETRIÁS TESZTKÉSZLETEK  
0,001 - 1000 mg/l

ELÉRHETŐ ÁRON

## Chromatography

## Bioanalysis

Small Chromatography Sample Preparation  
GC / HPLC Sample Preparation

**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

# KÖRNYEZETVÉDELMI MÉRÉSTECHNIKA



## AKTIVIT Kft.

H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.



# VÍZANALITIKA LABORTECHNIKA

## KVALITATÍV TESZTPAPIROK

## PH - PAPIROK

## RENTELTÉNY TESZTPAPIROK

**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

## Az ELEMENTAR GmbH.

## VARIO elemanalizátor családja

vario EL III  
20, 40, 60, 80, 100 mg  
10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg  
vario EL TRACE  
2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mg

vario EL liquid injection  
20, 40, 60, 80, 100 mg  
vario liquid  
vario trace liquid injection  
2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mg

### ELEMENALIZIS FELSORFOKON

vario EL IRMS  
vario MAX  
vario MAX IRMS

**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

## NITROGÉN / PROTEIN tartalom mérése

Dumas módszer szerinti eggyel  
automata analízátorokkal

Rapid N  
Vario MAX

A Dumas módszer előnye:

- \* Nagy körletben kis mennyiségű minta
- \* Gyors (10 perc)
- \* Tökéletes pontosság
- \* Abszolút higiénia
- \* Pontos leolvasás
- \* Nagy mintaszámok (1-20)
- \* Robosztus
- \* Felügyeletmentes

**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

## MEGBÍZHATÓ EREDMÉNYEK A TEREPEN CSÜCSMINŐSÉGŰ ESZKÖZÖKKEL

**AKTIVIT Kft.**  
H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

# Optikai (OWLS) immunszenzorok fejlesztése makromolekulák és kis molekulájú célvegyületek kimutatására

## Development of optical (OWLS) immunosensors for macromolecules and small analytes

*Inna Levkovets<sup>1,2,4</sup>, Adányi Nóra<sup>2</sup>, Trummer Nikoletta<sup>2</sup>, Váradi Mária<sup>2</sup>, Szendrő István<sup>3</sup>, Nickolaj F. Starodub<sup>4</sup>, Székács András<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, 1525 Budapest, Pf. 102.

<sup>2</sup> Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, 1022 Budapest, Herman O. út 15.

<sup>3</sup> Mikrovákuum Mikroelektronikai és Vákuumtechnikai Kft, 1147 Budapest, Kerékgyártó u. 10.

<sup>4</sup> Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian National Academy of Sciences, 9 Leontovicha, 01601 Kyiv, Ukraine

*Levkovets, I.<sup>1,2,4</sup>, Adányi, N.<sup>2</sup>, Trummer, N.<sup>2</sup>, Váradi, M.<sup>2</sup>, Szendrő, I.<sup>3</sup>, Starodub, N.F.<sup>4</sup>, Székács, A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, H-1525 Budapest, POB 102, Hungary

<sup>2</sup> Central Food Research Institute, H-1022 Budapest, Herman O. út 15, Hungary

<sup>3</sup> Microvacuum Ltd, H-1147 Budapest, Kerékgyártó u. 10, Hungary

<sup>4</sup> Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian National Academy of Sciences, 9 Leontovicha, 01601 Kyiv, Ukraine

### Összefoglalás

Specifikus antitest–antigén kölcsönhatásokon alapuló optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiái (OWLS) szenzorokat fejlesztettünk különböző modell célvegyületek, így két fehérje (marhaszérum-albumin és marha agyi 70 kD hő sokkfehérje), valamint egy növényvédőszer-hatóanyag (trifluralin) kimutatására. Többféle kapcsolási technika alkalmazásával az antitest–antigén komplex mindkét tagját sikeresen rögzítettük kovalens kötéssel a szenzorfelületen, s a kapott immunszenzorok a célvegyületek mind nem versengő, mind versengő rendszerben történő detektálását lehetővé tették. Bár a jelstabilitást hatékonyabb rögzítési módszereket alkalmazva javítani kell, a kifejlesztett immunszenzorok jól alátámasztják az OWLS technika alkalmazhatóságát mind nagy, mind kis molekulájú célvegyületek kimutatásában.

### Summary

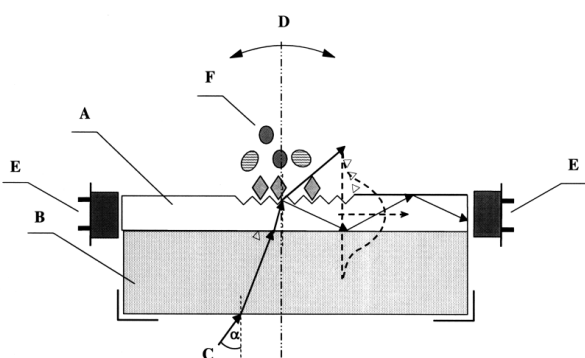
Optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) sensors, based on specific antibody–antigen interactions, were developed for the detection of various model compounds, including two proteins (bovine serum albumine and bovine cerebral heat-shock protein-70), as well as a pesticide active ingredient (trifluralin). Using various immobilization protocols, each component of the antibody–antigen complex could be covalently immobilized on the sensor surface, allowing non-competitive or competitive detection of the analytes. Although signal stability has to be improved by more effective immobilization, the immunosensors developed indicated the utility of the OWLS technique for all three analytes of large and small molecular sizes.

### Introduction

Analytical systems consist, in principle, of three fundamental units: analyte recognition, signal transformation and signal detection. In classical instrumental analyses each of these units are based on physical and chemical processes, in bioanalyti-

cal systems, at least one of them is a biological subsystem. Immunoanalysis is a particular type of bioanalytical systems, based on specific antibody–antigen interactions. In immunoanalytical systems we combine the advantages of natural and artificial (man-made) elements: on one hand, nature (i.e., the immune system) produces certain proteins (immuno-





**Figure 1.** Schematic representation of the OWLS analytical systems. Optical grating is manufactured on the waveguide surface layer (A) of the sensor chip (B). A monochromatic laser beam (He-Ne 632.6 nm) (C) is directed to the sensor at varying angle of incidence ( $\alpha$ ) as the chip is gradually turned around a rotation axis (D) with high precision. The laser beam undergoes diffraction in the optical waveguide layer, and is propagated to the ends of the layer through multiple internal reflections, where light intensity is detected by photodiodes (E) at certain angles of incidence. The resonance angle depends on refractivity features of all layers, including the chip surface with the optical grating. If biomolecules, capable of binding their corresponding substrates or ligands, are immobilized on the surface, such binding phenomena alters the refractive parameters of the waveguide layer, allowing detection of the rate of ligand binding (or adsorption) on the surface.

globulins) that are of outstandingly high specificity for foreign molecules, and on the other hand, man-made instruments are capable of measuring electrical or optical signals with high accuracy. Therefore,

different immunoassays and immunosensors, based on specific antigen–antibody reactions, are wide-spread in environmental, food and clinical analysis.

One type of immunoanalytical systems is represented by immunosensors. These systems use antibodies for recognition, and the biological system is installed on a sensor surface based on electronic or optical signal detection. Evanescent optical sensing techniques as surface plasmon resonance (SPR) [1,2], optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) [3,4] and the resonant mirror (RM) [5,6] offer the ability to perform not only label-free but also real-time qualitative and quantitative macromolecular interaction assays, allowing for the kinetic analysis of reactions. These are generic techniques, applicable to a wide range of assays. OWLS is a particular kind of optical biosensors, using sensor surfaces with optical grating manufactured with high accuracy. The basic principle of this method, depicted on Figure 1, is that a linearly polarized laser light (He-Ne laser), under suitable conditions, is coupled by the diffraction grating into the waveguide layer on the sensor surface. Incoupling is a resonance phenomenon, that occurs at a precise angle of incidence of the laser beam. This angle depends on optical features of the sensor surface (optical grating on the surface and refractive index of the sensor layer) and on the refractive



**Inna Levkovets** (left) graduated as a biologist/ biochemist from the Sevchenko National University of Kiev in 2000, and started her postgraduate studies at the Palladin Institute of Biochemistry in Kiev. Her research topics include novel biotests for general toxicity using the great water flea, *Daphnia magna* (Straus), and enzymatic and immunosensing techniques. Her supervisor, **Nickolaj F. Starodub** (not shown on the picture), D.Sc., Head of the Department of Biochemistry of Sensoric and Regulatory Systems, professor in biochemistry (since 1994), is involved in research in the field of immunochemistry and enzymology, molecular methods of diagnostics and biosensors.

**Mária Váradi** (right), C.Sc. in chemistry, Head of the Analytical Department at CFRI, **Nóra Adányi** (middle), dr. univ., researcher and **Nikoletta Trummer** (second from left), Ph.D. student have been investigating biosensors and immunosensors for different substrates for several years.

**András Székács** (second from right) D.Sc. in chemistry, Head of the Department of Ecotoxicology and Environmental Analysis at PPI-HAS, has long-standing experience in the development of immunoassays for pesticides, toxins and anthropogenic environmental contaminants, and is involved in surveys in environmental analysis and ecotoxicology of such analytes.

**István Szendrő** (not shown on the picture) graduated as a physicist from ELTE, Budapest in 1970. Since 1987 he is Managing Director of MicroVacuum Ltd. His interest is thin film sensor technologies.

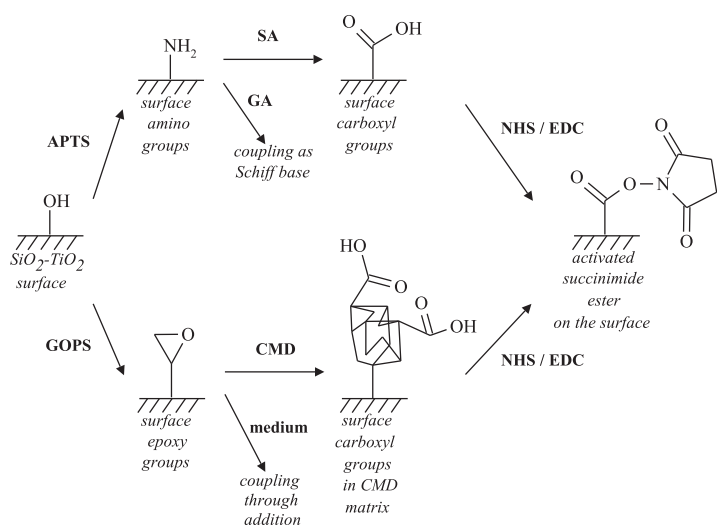
index of the medium covering the surface of the waveguide. In the waveguide layer, the light is guided by total internal reflection to the ends of the layer, where it is detected by photodiodes. By varying the angle of incidence of the laser light, the spectrum (both electric and magnetic modes) can be obtained, from which the effective refractive indices, and in turn, analyte concentrations in the medium are calculated [7,8]. OWLS is a label free technique for investigating surface processes at molecular level (e.g., adsorption, binding and adhesion).

#### Modification of the sensor surface

OWLS allows detection of binding between various biomolecules on the sensor surface. For this purpose, one of the objectives of our work was to introduce different functional groups onto the surface allowing simple covalent immobilization of biomolecules to provide a basis for the application of regenerable OWLS immunosensors in flow-injection analysis (FIA) systems. As the surface of the  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  waveguide contains mainly hydroxyl groups offering few possibilities for covalent immobilization of biomolecules [9], in order to widen the circle of covalent coupling possibilities, the surface of the waveguide was modified. Silanization using reactive silane reagents is one of the commonly used modification methods for introducing functional groups of all sorts (e.g. aliphatic amino, thiol or epoxide, or aromatic amino groups) onto the surface of inorganic materials [10]. Common surface modification processes based

on silane reagents are shown on *Figure 2*, depicting typical functional groups for grating coupler sensors and their activation possibilities. The two groups that furnish the basis for all further modifications are amino and epoxy groups formed by  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTS) and  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS), respectively. The amino functionality is most commonly activated with glutaraldehyde (GA) [11,12] or can be modified to carboxyl groups by derivatization with succinic anhydride (SA). Epoxy functionalized surfaces allow conversion into carboxyl moieties using a hydrophilic branching carboxymethyl dextran (CMD) matrix. Alternatively, surface epoxy groups can be used for direct anchoring of biomolecules carrying amino or hydroxy moieties by nucleophilic addition to them in alkaline (basic) medium (pH > 8.5) [13]. Carboxyl groups, both from SA on amino-modified surfaces or CMD on epoxy-modified surfaces, have to be activated prior to the covalent attachment of biomolecules. A common activating agent is *N*-hydroxysuccinimide (NHS) used with a dehydrating agent [14].

During our work, we focused on the preparation of surfaces containing amino groups in order to form amino functionalized layers by silanization with APTS in inorganic medium and optimizing the method. We have obtained modification of the amino groups on the chip surface in two ways. The first route consists of the use of a homobifunctional reagent, glutaraldehyde, whereupon the protein can be bound to the surface in form of a Schiff basis. The second route consists of two steps: the formation of carboxyl groups on the chip surface with SA, and subsequent activation by formation of a succinimide ester with NHS and a dehydration agent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), whereupon the protein can be bound to the surface as an amide.



**Figure 2.** The most frequently formed functional groups and their activation possibilities in relation with  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  surfaces. Surface hydroxyl groups are converted into amino or epoxy moieties using silane reagents APTS or GOPS. Abbreviations: APTS:  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane, GOPS:  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane, SA: succinic anhydride, GA: glutaraldehyde, CMD: carboxymethyl dextrane, NHS: *N*-hydroxysuccinimide, EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.

### *Immobilization of biomolecules on sensor surface*

If a biomolecule, capable to binding to its substrate or complement element, is immobilized on the sensor surface, and such binding or recombination takes place upon contact with a sample, optical refractivity features of the sensor surface change, causing a characteristic shift in the resonance spectrum. Such biomolecules can be antibodies, receptors or combinatory nucleic acid sequences. With this method, it is possible to carry out direct and indirect measurements of interactions between these biomolecules immobilized on the waveguide surface and given substances (analytes) they are specific to. Each component of the immunocomplex (Ag–Ab) can be immobilized on the sensor surface. Should antibodies be immobilized, a direct measurement of analyte in the sample can be carried out. This method is simple and label-free in OWLS systems, however, may lack sensitivity, for example, for analytes of small molecular size. Therefore, immobilization of the antigen conjugate and the corresponding indirect measurement mode has higher utility. In this latter case, incubation of the analyte in the sample with the antibody is carried out first, and then the quantity on non-bound antibodies is measured.

To demonstrate the utility and excellent sensitivity features of OWLS systems, we used both macromolecular and small molecular size analytes with antibodies against them. As model systems, two macromolecular analytes, heat-shock protein-70 (HSP70) and bovine serum albumin (BSA), as well as a small size molecule, trifluralin, were applied. Although the objective of the present work is mostly fundamental, serving the purpose of showing the utility of OWLS analytical systems, the resulting detection protocols offer practical benefits as well. While a detection system for BSA serves almost solely as a model system, monitoring the level of heat-shock proteins as stress indicators [15,16], are useful in certain physiological or environmental studies. The highest practical purpose, and the main analytical gear of the present work is represented clearly by target analyte trifluralin. This herbicide active ingredient is used at high volumes in Hungary and certain European countries since the late sixties, yet has been lately demonstrated to cause endocrine disrupting effects [17], and has been included on the European Union list of assumed or proven endocrine disruptors [18].

### **Materials and Methods**

APTS was purchased from Fluka (Neu-Ulm, Germany). BSA, HSP70 and anti-HSP70 antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MA, USA). Polyclonal antibodies directed against BSA were produced in rabbits at CFRI. Trifluralin was obtained from Budapesti Vegyiművek Rt. (Hungary). Polyclonal antibodies directed against trifluralin were produced in rabbits at PPI-HAS [19]. All other reagents were commercially available and of analytical grade.

#### *Optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS)*

OWLS experiments were carried out using amino functionalized waveguide sensors. To introduce amino groups onto the surface before experiments, a series of sensors were silanized by dipping them into 10% APTS in distilled water and were heat treated at 100 °C overnight [9,10] and were stored at room temperature in a desiccator. Further modifications were carried out by direct immobilization of macromolecules with GA, or by conversion of the amino moieties into carboxyl groups with SA, subsequent activation of these carboxyl groups with NHS and EDC as dehydrating agent, and immobilization of macromolecules to these activated succinimide functionalities. All measurements were made in a flow-through system where a flow-cell (cuvette) was fixed onto the grating area of the sensor. The OWLS100 detector (Microvacuum Ltd. Hungary) was coupled to a FIA system consisting of a peristaltic pump (providing the appropriate flow-rate of buffer solution) and an injector with a 200 µl injector loop.

### **Results and Discussion**

#### *Detection of macromolecules via OWLS*

Macromolecules can be detected, in principle, by two ways in heterogenic phase immunoanalytical, and therefore, in OWLS systems. The first form is based on the immobilization of antibodies on the solid (sensor) surface. Such immobilized antibodies capture their analyte (the antigen or similar immunoreactive compounds) from the sample, therefore, this format is often termed also as a *direct* format. In the second form, in contrast, the antigen is bound on the solid surface. In such cases, antibodies delivered in a later step can interact with the immobilized antigen, and if these antibodies are

allowed to come in contact (in a preceding step or in parallel with the interaction with the immobilized antigen) with a sample containing the target analyte, the antigen–antibody interaction is inhibited by the presence of the target analyte in the sample, therefore, this format is often termed also as an *indirect* format. In our model systems using macromolecular and small molecular size analytes, we investigated both these formats.

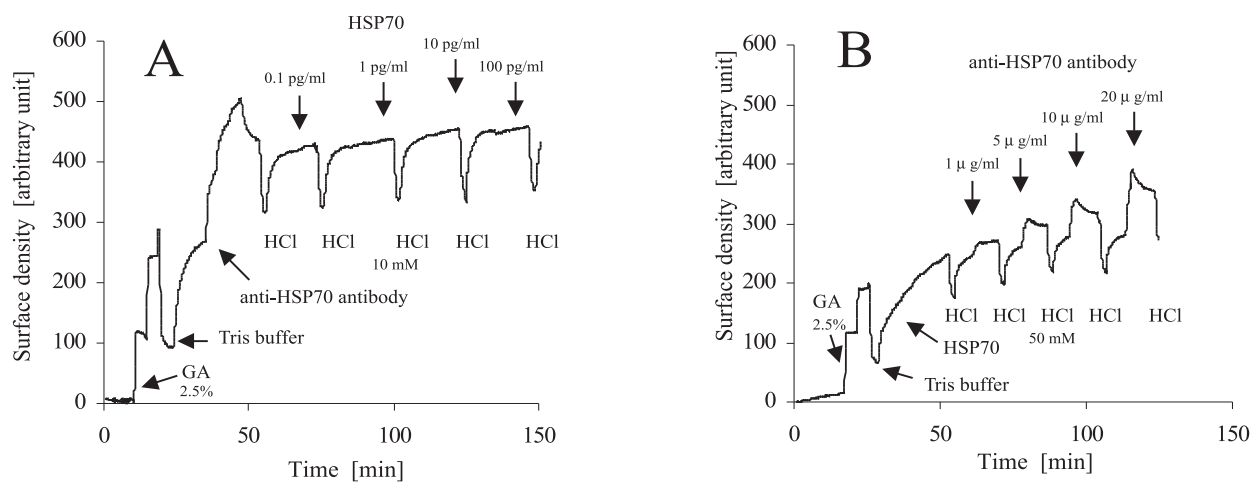
#### Comparison of antigen or antibody immobilization – the HSP model system

The possibilities of the immobilization of antibodies or antigens have been compared to each other using HSP70 as a macromolecular analyte and glutaraldehyde as a binding agent in both cases. Figure 3 depicts the immobilization and measurement protocol when anti-HSP antibodies or HSP70 are immobilized on amino silanized surfaces and OWLS is carried out in a FIA system using stopped-flow mode. Monoclonal anti-HSP antibodies were covalently immobilized on the sensor, and HSP molecules were detected directly as HSP molecules bound to them from the sample (Figure 3A). In parallel, HSP molecules were attached covalently onto the sensor surface, and the specific response of the sensitized surface to standard solutions of anti-HSP antibodies at different concentrations was measured (Figure 3B). The initial section of the curves represent activation of the chip surface amino groups by injecting, in two steps, glutaraldehyde in distilled water. The surface was then

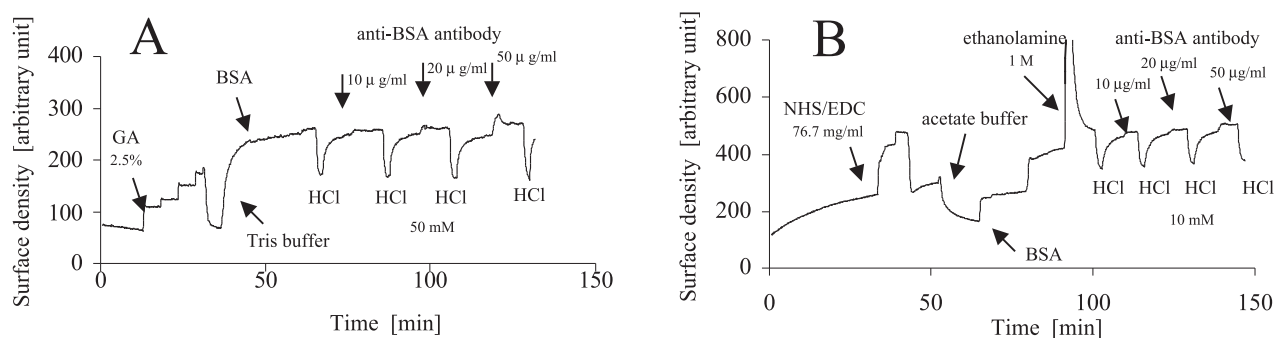
washed with distilled water for a few minutes, the medium was changed to Tris buffer and anti-HSP antiserum (Figure 3A) or HSP70 (Figure 3B) in Tris buffer were added. Upon immobilization, the surface was washed with buffer and with aqueous HCl, and the chip was ready to measure solutions containing HSP70 or anti-HSP IgG antibody, respectively. The peak cycles show sensor responses for HSP70 or antibody standard solutions at different concentrations. The sensitized surface was regenerated in both cases with HCl solution after each measurement. Although the detection protocol for HSP needs further improvements for practical utilization, particularly in the case of the immobilized antibody-based system, the graphs indicate that concentration-dependent binding between HSP70 and antibodies directed against it can be successfully detected on the OWLS chip.

#### Comparison of immobilization of antigen using GA or SA /NHS – the BSA model system

Detectability features of the OWLS system are affected not only by the biochemical nature of the macromolecule immobilized, but also by the chemical method of immobilization. To study the efficacy of various immobilization protocols, OWLS systems based on immobilized antigen on amino-modified sensor surfaces were applied using two methods of conjugation: glutaraldehyde (as before) and SA followed by the activation with NHS in the presence of a dehydrating agent. As antigen, BSA was used in both cases for immobilization, and the



**Figure 3.** OWLS detection systems for HSP based on immobilized anti-HSP antibody (A) and immobilized HSP (B). The first system allows direct measurement of the analyte, while it can be detected indirectly in the second system.



**Figure 4.** OWLS detection systems for BSA based on immobilized BSA using GA (A) or SA with the carboxylated surface activated with the NHS/EDC method (B). Both systems allow indirect measurement of the analyte BSA.

binding of polyclonal anti-BSA antibodies was demonstrated subsequently. Figure 4 demonstrates the immobilization and measurement protocol when BSA is immobilized on amino silanized surfaces and using these two coupling methods, and OWLS is carried out in a FIA system using stopped-flow mode. Immobilization of BSA with GA (Figure 4A) proceeded similarly as in the case of HSP70 (Figure 3B), although the latter system appeared to offer a somewhat lower detection concentration range for the given analyte-specific anti-serum used.

The formation of carboxyl groups on the sensor surface *via* derivatization of the amino groups using alcoholic solutions of SA at different concentrations was also carried out. Subsequently, BSA molecules were coupled onto the surface using the NHS/EDC method (Figure 4B). Carboxylation of amino group containing surfaces was made by immersing the chips into the solution of SA. The surface was washed with Tris buffer, and the layer was treated with the NHS/EDC reagents (in distilled water) to form reactive succinimide esters. The surface was washed with Tris buffer again, following by washing with acetate buffer to ensure the appropriate conditions for immobilization that was undertaken by injecting a BSA solution at a concentration of 0.1 mg/ml. After immobilization the surface was washed with Tris buffer and the free reactive succinimide esters were blocked by injecting aqueous ethanolamine. Finally the layer was washed with Tris buffer and aqueous HCl solution to remove loosely bound molecules, and the surface was ready for measurement. Well-detectable signals during multiple injection and reactivation were obtained, nonetheless, a signifi-

cant difficulty with the use of the OWLS immunosensor remains to be signal stability upon subsequent measurements and reactivation of the sensor surface.

#### *Detection of a small molecule via OWLS – the trifluralin model system*

As it has been demonstrated with macromolecular analytes, the OWLS immunoanalytical systems can, with certain limitations, be applied to the detection proteins, both in immobilized antibody and immobilized antigen formats (as in the case of HSP), and in the latter format with the use of different immobilization protocols (as in the case of BSA). It remained a question, however, whether such an immunoanalytical system is useable for a small molecule, such as the target analyte trifluralin, a nitroaniline herbicide active ingredient. Previous work indicated that a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) allowed a limit of detection of 0.7 ng/ml [19], and that the OWLS analysis offers orders of magnitude better sensitivity for this analyte using the same immunoreagents [20]. It has also been demonstrated from previous work, that the OWLS system based on immobilized antibodies was significantly less sensitive than that based on immobilized antigens [20]. Therefore, immobilization of trifluralin-based antigens has been investigated in more depths in the present study.

Using experience gained in the above macromolecular models and based on the existing ELISA method for trifluralin [19], experiments were geared to evaluate immobilized antibody- and antigen-based OWLS immunosensors for the detection of this analyte. In the case of the immobilized antibody-based, competitive method polyclonal serum

raised against the molecule was immobilized on the sensor surface, and trifluralin standards were measured directly with the OWLS system. When measuring in the immobilized antigen-based, competitive way, a BSA-conjugate of the haptenic derivative of trifluralin was attached onto the sensor surface *via* covalent coupling. Standard solutions of trifluralin were mixed with the appropriate dilution of the polyclonal serum containing known excess amounts of antibodies, the mixtures were incubated for 1 minute and were injected into the OWLS system. Upon incubation, only antibodies remaining in free form in the sample bound to the antigens immobilized on the sensor surface. Thus, the amount of antibodies bound to the surface of the chip was inversely proportional to the trifluralin content in the sample.

Calibration curves obtained in the direct OWLS immunosensor for trifluralin indicated a rather poor detection limit of somewhat below 100 ng/ml. In such systems, polyclonal serum obtained against a KLH-conjugate of a trifluralin hapten [19] was applied for immobilization at a dilution of 1:2000. It was, therefore, assumed that the relatively high detection limit was due to the small molecular weight of the antigen (0.34 kD). As it has been pointed out before [20], poor sensitivity is not very surprising as the binding of such a small analyte does not represent a high relative mass increase to the molecular mass of the immobilized immunoglobulin (180 kD), therefore, does not produce strong signals in the OWLS system.

The immobilized antigen-based, indirect method, however, offer much better sensitivity characteristics. In this case, binding of the anti-trifluralin antibodies (180 kD) to the immobilized antigen (69 kD) [20] is allowed or inhibited by the presence of trifluralin (or other immunoreactive substance) in the sample. During the development of the immobilized antigen-based (indirect) method, the sensors were sensitized with a BSA-conjugate of the trifluralin hapten at a concentration of 10 µg/ml, and optimal dilution of the serum was determined. At higher dilution ratios, antibodies poorly saturate the surface, and therefore, minor response can only be obtained. At lower dilution ratios, although the signal obtained is well measurable, the surface is already saturated, and it loses its detection sensitivity. When measuring trifluralin content in samples or standards, these solutions were mixed with

serum at a ratio of 1:1. The concentration range of trifluralin examined was  $10^{-6}$  to 10 ng/ml.

As a reference method, we also measured trifluralin content with the same serum at the same dilution with a previously developed ELISA method [19]. The sensitivity of the detection improved by approximately three orders of magnitude, nonetheless, signal stability remained to present a severe problem to analytical determination. As in the case of the similar, immobilized antigen-based OWLS format for BSA, it has been seen for the small analyte trifluralin, even at a more pronounced level, that assay signals are deteriorating with time i.e., signal levels significantly decrease as the number the sensor chip is reused (and assumedly even more importantly reactivated) increases. To evaluate this effect in detail, the time-dependence of the achievable assay signal was depicted, and it was clearly seen that obtainable signal levels continuously decrease in time (or the number of reuse of the given chip), which draw our attention to actual processes that may take place on the surface of the OWLS biosensor chip. To study the fate of the sensor surface, atomic force microscopy (AFM) studies were carried out using the chip at various stages of OWLS assay performance (Figure 5) [21].

**Figure 5.** (see on the cover) *The silanized glass surface of the OWLS chip, in two- (left column) and three-dimensional (right column) plot, at various stages of macromolecule immobilization, detected by atomic force microscopy (AFM). Silanized chip surface before immobilization of macromolecules (upper row), after immobilization of the BSA-trifluralin antigen (middle row) and after immunocomplex formation between the antigen and the anti-trifluralin antibodies (lower row). Desorption of the immunocomplex is indicated at the last stage, where surface coverage deteriorated in spots of diameters greater than 500 nm, as compared to the relatively uniformly (45%) covered surface before.*

Similar AFM studies on OWLS immunosensor surfaces have been carried out previously [22], yet those studies were directed towards immobilized antibodies on the OWLS chips. It has been clearly demonstrated that after the addition of the antibody solution, significant segments of the immobilized antigen layer are washed off the sensor surface. The continuously decreasing antigen layer on the surface is a very likely cause of the signal deterioration seen in the OWLS experiments. Therefore, studies of more effective and durable immobilization methods are urged.

### Lifetime of the immunosensors

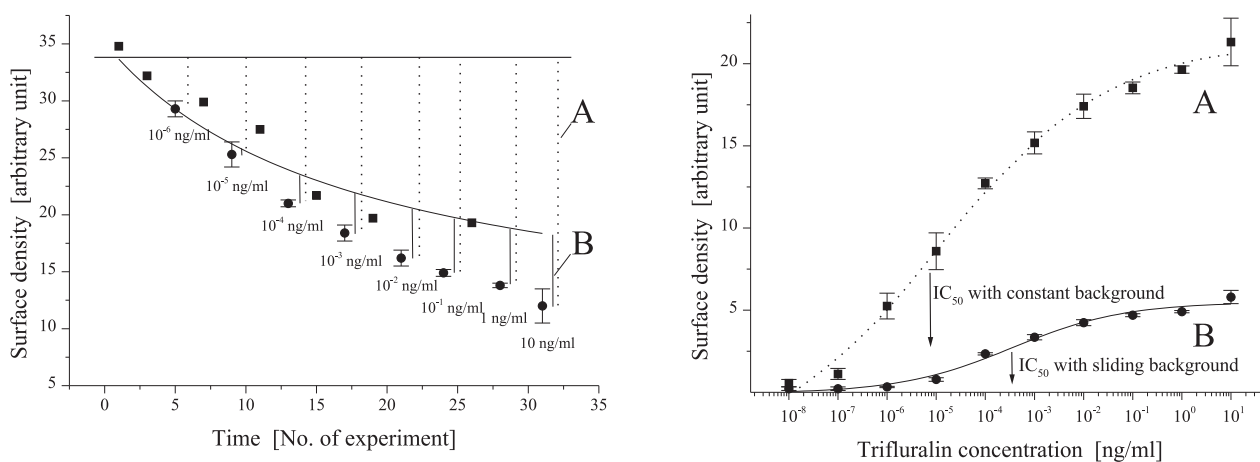
The sensor chips with a single immobilization appear to be reusable for approximately one day in multiple determinations, nonetheless, it is seen that sensor signal decreases both for the background and for standards as the chip is being reused several times. Signal deterioration may lead to miscalculation of assay sensitivity, as the signal drops due to aging of the chip (desorption of the immobilized BSA-trifluralin conjugate from the chip surface as seen from *Figure 5*) may lead to the erroneously conclusion that signal decrease is due to inhibition by the analyte trifluralin. To eliminate such artifacts, standards and blanks were measured consecutively, and results were depicted as a function of time (number of reuse of the trifluralin OWLS chip) as seen on *Figure 6 (left graph)*. The graph obtained clearly indicates that decreases in signal intensity due to the presence of increasing concentrations of trifluralin have to be deducted from decreases in signal intensity due to aging of the chip taking place in parallel. *Figure 6 (right graph)* depicts two possible standard curves for trifluralin determination with constant (A) and sliding (B) background considered. Although overall assay signals (differences to background) vastly drop as correction for sliding background is implemented, the corrected data still indicate a definite correlation of assay signal with trifluralin concentration, and well-defined

sigmoid standard curves can be established, indicating an  $IC_{50}$  value of  $3.5 \times 10^{-4}$  ng/ml for trifluralin determination.

When comparing the two calibrations, it is apparent that a misleading  $IC_{50}$  value is calculated, if constant background is considered, while a more realistic (and approximately 35-times higher) value is calculated with sliding background. Although the immobilization protocol has yet to be improved to eliminate the problem of antigen desorption before a truly applicable OWLS sensor is created, the present results indicate that the modified surfaces formed are suitable for covalent immobilization of biomolecules, and the OWLS method is applicable for the detection of both macromolecules and small molecules in immobilized antibody-based (direct) or immobilized antigen-based (indirect) formats.

### Acknowledgments

This work was supported by Hungarian research grants BIO-73/2001 and OMFB 02193/1999 by the Hungarian Ministry of Education, as well as T032232 and T033021 by the Hungarian Research Fund (OTKA). This research work was also supported by MicroVacuum Ltd. by supplying OW2400 sensor chips and measurement time on an OWLS100 instrument.



**Figure 6.** Left graph: signals obtained with the OWLS sensor for trifluralin in the immobilized antigen-based (indirect) format as a function of time (number of repeated usage of the same chip). Blank signals (squares) indicate a gradual decrease putatively due to desorption of the antigen from the surface. Therefore, greater inhibition of immunocomplex formation due to the presence of trifluralin at increasing concentrations is indicated when actual signals are compared to the initial blank signal (A) the if compared to the corresponding sliding background (B). Right graph: standard sigmoid inhibition curves as a function of trifluralin concentration when actual signals are compared to the initial blank signal (A) the if compared to the corresponding sliding background (B).

## References

- [1] Lukosz, W. (1991) *Biosens. Bioelectron.*, **6**: 215–225.  
 [2] Schuck P. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**: 498–502.  
 [3] Lukosz, W., Tiefenthaler, K. (1983) 2nd ECIO Florence, IEE Conf. Publ. No. 227 (IEE, London) p. 152.  
 [4] Ramsden, J. J. (1999) *Chimia*, **53**: 67–71.  
 [5] Cush, R., Cronin, J. M., Stewart, W. J., Maule, C. H., Molloy, J., Goddard, N. J. (1993) *Biosens. Bioelectron.*, **8**: 347–353.  
 [6] Buckle, P. E., Davies, R. J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P. R., Pollard-Knight, D. V., Lowe, C. R. (1993) *Biosens. Bioelectron.*, **8**: 355–363.  
 [7] Ramsden, J. J., Németh-Sallay, M., Vörös, J., Szendrő, I. (1997) *Fizikai Szemle*, 281–285 (in Hungarian).  
 [8] Vörös, J., Ramsden, J. J., Csúcs, G., Szendrő, I., De Paul, S. M., Textor, M., Spenser, N. D. (2002) *Biomaterials*, **23**: 3699–3710.  
 [9] Weetall, H. H., Filbert, A. M. (1974) *Methods Enzymol.*, **34**: 59–72.  
 [10] Weetall, H. H. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **41**: 157–188.  
 [11] Polzius, R., Bier, F. F., Bilitewski, U., Jäger, V., Schmid, R. D. (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 1287–1292.  
 [12] Bier, F. F., Schmid, R. D. (1994) *Biosens. Bioelectron.*, **9**: 125–130.  
 [13] Polzius, R., Schneider, Th., Bier, F. F., Bilitewski, U. (1996) *Biosens. Bioelectron.*, **11**: 503–514.  
 [14] Spinke, J., Oranth, N., Fattinger, Ch., Koller, H., Mangold, C., Voegelin, D. (1997). *Sensor. Actuat.*, **B 38–39**: 256–260.  
 [15] Sanders, B. M. (1990) In: Biomarkers of environmental contamination (McCarthy, J. F., Shugart, L. R., Eds) (Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA), p 165–191.  
 [16] Kaur, J., Srivastava, A., Ralhad, R. (1998) *Oral. Oncol.*, **34**: 496–501.  
 [17] Rawlings, N. C., Cook, S.J., Waldbillig, D. (1998) *J. Toxicol. Environ. Health*, **54**: 21–36.  
 [18] EC list fort EDCs Commission of the European Communities, Communication to the Council and the European Parliament COM (2001) 262.  
 [19] Hegedűs, Gy., Béla, I., Székács, A. (2000) *Anal. Chim. Acta*, **421**: 121–133.  
 [20] Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) *Anal. Chim. Acta*, **487**: 31–42.  
 [21] Keresztes, Zs., Kálmán, E., Ernst, A., Székács, A. (2004) *Biokémia*, **XXVIII**: 2–4.  
 [22] Szalai, B. (2001) Fehérjék felületi kötődésének vizsgálata atomi erő mikroszkóppal. Szakdolgozat, ELTE-TTK, Biológiai Fizika Tanszék

## Tisztelt Fiatal Kutatók,

a Sigma-Aldrich Nemzetközi Részvénytársaság magyarországi leányvállalata 1997-ben, alapításának ötödik évfordulója alkalmából, pályázatot hirdetett 35 év alatti, Magyarországon vagy ideiglenesen külföldön ösztöndíjasként dolgozó kutatók részére, akik elsőszersős közleményeikben **Sigma, Aldrich, Fluka, Supelco, Riedel-de Haën, RBI** vagy **Genosys** termékekre hivatkoznak. Hagyományteremtő szándékkal, azóta minden évben meghirdetjük pályázatunkat. A nyertesek sorrendjét a közlemények száma dönti el. Holtverseny esetén a társszerzős közleményeket is figyelembe vesszük.

I. díj 150.000 Ft

II. díj 100.000-Ft

III. díj 75.000-Ft

(Az összegek nettó értéket jelentenek, a pénzdíjakat csak egyszer lehet elnyerni.)

Benyújtási határidő: 2004. április 30., eredményhirdetés, ünnepélyes díjkiosztás: 2004. május. A pályázat-hoz kérjük a tudományos közlemények másolatát csatolni, valamint a hivatkozásokat kiemelni. Akik már nyújtottak be pályázatot, csak a benyújtás óta megjelent közleményeket küldjék, a korábbiakat nyilvántartásba vettük. A pályázatokat az alábbi címre kérjük küldeni: Sigma-Aldrich Kft. 1399 Bp. Pf. 701/400.

Eddigi nyertesek:

*I. helyezettek:* Török Béla (Szegedi Tudományegyetem TTK), Szabó Csaba (MTA KOKI), Szöllösi György (Szegedi Tudományegyetem TTK), Balázsik Katalin (Szegedi Tudományegyetem TTK), Filipcsei Genoveva (BMGE), Helyes Zsuzsanna (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), Vásárhelyi Barna (Semmelweis Egyetem), Mócsai Attila (Semmelweis Egyetem) *II. helyezettek:* Acsády László (MTA KOKI), Benyó Zoltán (Semmelweis Egyetem), Buglyó Péter (Debreceni Egyetem TTK), Forró Enikő (Szegedi Egyetem ÁOK), Antal Zsuzsanna (MTA Szegedi Tudományegyetem), Péter Mára (Szegedi Tudományegyetem GYTK), Kocsis István (Semmelweis Egyetem) *III. helyezettek:* Sperlagh Beáta (MTA KOKI), Török Gabriella (Szegedi Tudományegyetem TTK), Pacher Pál (Semmelweis Egyetem), Fási András (MTA KKI), Ungvári Zoltán (Semmelweis Egyetem), Fodor Elfridea (MTA SZBK), Reglődi Dóra (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), Oroszi Gábor (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), Szatmári István (Debreceni Egyetem OEC), Kredics László (MTA Szegedi Tudományegyetem), Lente Gábor (Debreceni Egyetem TTK), Szokodi István (Pécsi Tudományegyetem ÁOK)



**SIGMA-ALDRICH**

Szívélyes üdvözléssel a Sigma-Aldrich összes munkatársa nevében:

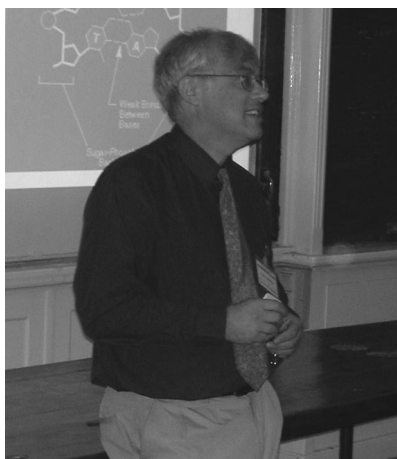
Bodoki Réka  
ügyvezető igazgató

dr. Gráf Márta  
kereskedelmi és marketingigazgató



## BioGen tábor – az ötlettől a megvalósulásig...

Jómagam hosszú éveket töltöttem diákok tanításával, és igen fontosnak tartom, hogy a tehetséges gyermekek megfelelő motivációt kapjanak adottságaik kibontakoztatásához. Vajon milyen szakterület lehet vonzó a biológia iránt érdeklődő diákok számára? Mivel a biotechnológiai kutatások jelenleg az érdeklődés középpontjában állnak, és nem valószínű, hogy a középiskolásoknak módjukban áll e területet mélyrehatóan tanulmányozni, a tavalyi év során felmerült annak a gondolata, hogy szervezzünk nyári tábort. Úgy gondoltam, hogy izgalmas lehet a részt vevő gimnazista tanulók számára megismerni az örökítő anyag fizikai-kémiai tulajdonságait, DNS-t izolálni, majd azt tovább-



*Falus András professzor előadása...*

vizsgálva bepillantást nyerni az alapvető molekuláris biológiai módszerekbe. Így az érdeklődő diákok kiegészíthetnék az iskolában tanultakat, s egy ilyen élmény a pályaválasztásukban is meghatározó lehet.

Ismerve a hazai középiskolák helyzetét, az elképzelhetetlennek tűnt, hogy bármelyik is rendelkezne korszerű, több millió forintos műszerparkkal. Csakis olyan megoldás jöhetett szóba, ahol mindezek már megvannak, és vállalják, hogy helyt adnak kétszer egy hét időtartamra a tábor diákjai számára. A tervhez partnert kerestünk, és így jutottunk el a Genodia Kft.-hez, mivel ők rendelkeznek a legkorszerűbb molekuláris biológiai műszerekkel felszerelt oktatólaboratóriummal és nagy tapasztalattal rendelkező szakemberekkel. A két cég – a Bio-Science Kft. és a Genodia Kft. – összefogásával februárban kezdődhetett meg a több hónapig tartó szervezés. A tábort önköltséges, nonprofit formában tudtuk ajánlani a középiskolák figyelmébe. Csermely Péter professzor úr, a Kutató Diákok Országos Szövetségének alapítója, örömmel értesült kezdeményezésünkről, és támogatását ajánlotta fel. A Kutató Diákokért



*...oldott hangulatban zajlott*

Alapítvány vállalta, hogy a hozzájuk forduló, rászoruló diákoknak segít a részvételi díj kiegyenlítésében. Falus András akadémikus pedig, aki régóta szíven viseli az érdeklődő diákok oktatását, azonnal igent mondott arra, hogy megtartja a nyitó előadást.

Amint a program összeállt, körlevélben értesítettük a középiskolákat a tábor lehetőségéről, s ezzel egyidejűleg elkészült a tábor weboldala is. Izgatottan vártuk, vajon lesz-e elég jelentkező... Minden várakozásunkat felülmúlta az érdeklődés, s az eredetileg tervezett két turnus mellett be kellett iktatni egy harmadikat is, de sajnos így is akadtak olyan diákok, akik még e három csoportba sem értek be.

2003. június 23-án a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Pathobiokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében került sor a tábor megnyitójára, amelyen mindhárom turnus diákjai és számos középiskolai tanár vettek részt. Miért pont itt? Ennek részben személyes okai vannak. Holló Zsolt, a Genodia Kft. igazgatója egyetemi tanulmányai után ebben az intézetben kezdett dolgozni. Nem kis meghatottsággal beszélt professzorairól, akik bíztak benne, lehetőséget biztosítottak számára kutatásai megkezdéséhez. Ezután Falus András professzor úr előadása következett. Bevezetőjében megemlékezett egy kedves gimnáziumi tanáráról, aki felkeltette érdeklődését a biológia iránt. Elmesélte, miért választotta ezt a pályát, kik voltak az évfolyamtársai. Ízelítőt kaphattunk a tudományos kutatások évekig tartó folyamatáról, valamint arról is, hogy sokszor milyen nagy szerepe van a véletlennek egy-egy felfedezésben. Ezután a molekuláris genetika történetével ismertette meg a hall-

Részlet Szilágyi Orsolya (Tóth Árpád Gimnázium, Debrecen) hozzánk érkezett leveléből:

„Tizenhét évesen én is személyesen szembesültem a nagy kérdéssel: „mi leszek, ha nagy leszek?” Szeretem a biológiát, a kémiát, a kutatás érdekel. De vajon tényleg nekem való ez a munka, és mit is csinál egy kutató valójában? Ezekre a kérdésekre szerettem volna választ kapni, amikor jelentkeztem a BioGen táborba.

Prof. Dr. Falus András akadémikus lebilincselő nyitó előadása után kíváncsian vártam az első napot. Mit fogunk csinálni, milyenek lesznek a többiek? Be kell vallanom, izgultam is egy kicsit, pedig igazán nem kellett volna. A társaim egytől egyig nagyon kedvesek voltak, az előadókról és a gyakorlatvezetőkről nem is beszélve. A napok nagyon fárasztóan, mégis kellemesen teltek. Délelőtt előadásokat hallgattunk, majd délután a frissen szerzett elméleti tudásunkat alkalmaztuk a gyakorlatban. Nagy élmény volt, hogy a saját DNS-ünket is vizsgálhattuk, és hogy az eddig olyan misztikus fogalmak, mint például a PCR vagy a szekvenálás végre értelmet nyertek. Eleinte furcsa volt, hogy egy kis „semmisséggel” kellett dolgoznunk, valami olyannal, ami ott volt, de mégsem láttuk. De aztán minden nap végén meggyőződhattünk a munkánk eredményességéről és arról, hogy tényleg volt valami a kis Eppendorf-csővekben és pipettahegyekben.

Öt nap után már „igazi kutatónak” éreztük magunkat, és büszkéek voltunk arra, hogy ízelítőt kaptunk ebből a világból, ami kevés kortársunknak adatik meg. Ez a tábor (aminek remélhetőleg még lesz folytatása) mindannyiunkat segített a pályaválasztásunkban is. Köszönjük!”



A pipettázás rejtelméi

gatóságot. A DNS felfedezésének ötvenéves évfordulója jó ürügyet szolgáltatott ehhez. Lépésről lépésre követhettük nyomon e tudományág fejlődését, miközben a diákok megismerhették az alapvető genetikai fogalmakat.

Az előadás után az első turnus diákjai a Genodia Kft. laboratóriumába mentek, ahol tovább folytatódott a program. A tábor tematikája szerint a laboratóriumi gyakorlatokat mindennap az adott témához tartozó elméleti előadások előzték meg, amelyeket a Genodia Kft. és a Bio-Science Kft. szakemberei tartottak. Az első napon például mindenki saját szájnyálkahártyájából mintát vett, DNS-t izolált, majd a további napokon ezeket a DNS-mintákat vizsgálták. A táborozókra emellett további izgalom is vártak...

Mivel az első év tapasztalatai alapján kezdeményezésünk sikeresnek volt mondható, ezért úgy gondolom, hogy a fiatalság érdekében 2004-ben is lehetőséget kell adnunk a lelkes, tehetséges középiskolás diákoknak a táborban való részvételre. A Bio-Science Kft. 2004-től a BioGen tábort a tavalyihoz képest új formában – s egy ékezetnyivel módo-

sított néven – a Semmelweis Egyetemmel közösen fogja megrendezni. Az egyetem, amely mind infrastruktúráját, mind személyi háttérét tekintve kitűnő adottságokkal és feltételekkel rendelkezik, együttműködését és támogatását adja az elkövetkező BioGén tábor megrendezéséhez. A tábor tervezett időtartama alatt (amely 2 hét, 2004. június 21-től július 2-ig) alkalmanként 16 fő, összesen 32 diák vehet majd részt. A helyszín várhatóan a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika



Az eredményre várva

lesz, melynek előadóterme a délelőtti előadásokra, a Lakatos Péter által irányított molekuláris biológiai laboratórium pedig a délutáni gyakorlatokra nyújt alkalmas helyszínt. A szakmai programban az egyetem más intézetei is részt vesznek egy-egy előadással, gyakorlattal, ezzel is színesebbé és érdekesebbé téve a BioGén tábort.

Tátrai Ágnes

## EGYESÜLETI HÍREK

A Magyar Köztársaság Elnöke 2004. március 15. alkalmából a legmagasabb állami elismeréssel,  
**Széchenyi-díjjal** tüntette ki egyesületünk tagját:

*Spät András-t,*  
az MTA rendes tagját,

a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézete igazgató egyetemi tanárát  
nemzetközileg kiemelkedő tudományos munkásságért, kiváló oktató és iskolateremtő,  
valamint kiterjedt és értékes tudománypolitikai és tudományos közéleti tevékenysége elismeréseként.

*A Magyar Biokémiai Egyesület nevében szívből gratulálunk,  
és további eredményes munkát kívánunk a kitüntetettnek.*

**Kő Boldizsár** 1969-ben született Budapesten. Magáról ezt írja:

Még egészen apró gyermek voltam, amikor Mihály nagybátyám egy forrás mellé guggoltatott. „Nézz a mélybe!” – mondta. A felszín alatt lassított tündérvilágot láttam. Háton úszó poloskák keringtek, bolharások lüktettek, tegzeslárvák araszoltak. Csodálattal lestem a törpevilág minden kis mozdulását. Valami, akkor, eldőlt bennem. Húsz éven át „guggoltam” annál a forrásnál. Az állatok sok mindenre megtanítottak.

- 6 évesen volt első akváriumom, razbórákkal, vízi rovarokkal.
- 8 éves koromban édesanyámtól megkaptam a Brehm-összest, bőrkötésben.
- 10 évesen, nyáron dolgoztam a veszprémi állatkertben Melocco Sárival. Megfogadjuk, felnőttkorunkban együtt megyünk Afrikába.
- 12 évesen már öt terráriumom van, békák, kígyók a lakói.
- 13 évesen találok egy erdélyi patakban egy vaskos csabakot, mely utána egy évig a Fővárosi Állatkert lakója. (Hazánkban 100 éve fogták az utolsó bizonyító példányt.)
- 14 évesen, Vitárus Balázssal belépünk a TIT terrorista klubjába.
- 15 évesen kialakítunk barátommal egy kis állatkertet a padlástérben. Több mint ötven rovarfajt, több tucat csúszómászót, halat tartunk itt, négy éven át. Megfigyeléseinkből folyamatos kutatási naplót vezetünk.
- 18–21 éves koromig a Kaposvári Agrártudományi Egyetemre járok, kisállattenyésztő szakra.
- 21 évesen kirúgnak az egyetemről, kémia okán.
- 22 évesen ápolóként dolgozom a régi majomházban, a Fővárosi Állatkertben.
- 23 évesen utolsó eredménytelen felvételim az ELTE TTK biológuskarára. Utána hippis utazásokat tettem Svédországba, Törökországba, Mongóliába, Grúziába, Kínába.

Már felnőtt férfi voltam, mikor édesapám elvitt Fáskesti István kőfaragó műhelyébe, s így szólt: „Nézz a magasba!” A telek az erdő szélén volt, füves térség, tele hatalmas sziklákkal. Vörös és fekete gránitok, vajszerű és fehér mészkövek, zöld és szürke márványok. Élettelen óriások, amik a Föld időtlenségéről mesélnek. Kaptam egy kis sámlit, s mikor vésőmmel pattintgatni kezdtem a megkeményedett anyagot, valami újra eldőlt bennem.

- 24 évesen kőfaragást tanulok Fáskesti István műhelyében. Esténként rajzolni járok Benedek Györgyhöz.
- 25 évesen a Képzőművészeti Főiskola képgrafika szakára járok, mestereim: König Róbert és Pásztor Gábor. Első fiam, Lázár születik, összeházasodunk Annával.
- 28 évesen lakást építek, megszületik Ábel fiunk.
- 29 évesen mintázást tanítok az Illatos úti Kézműipari Szakközépben.
- 30 évesen a Veres Pálné Gimnázium rajz–művészettörténelem szakos tanára vagyok, mellette délutánoként az „Orbis pictus” művészeti iskolában „Vándor” című drámajáték-sorozatot vezetek.
- 31 évesen megkapom a Derkovits-ösztöndíjat.
- 32 évesen a „Védegyelet” zöldmozgalom tüntetésén 15 perces performanszot adok elő „Magad alatt...” címmel.

Az utóbbi tíz évben sokat rajzolok, festek. Munkáim lelki folyamatokkal, álmokkal, szorongásokkal, örömmel, vonzódásokkal, taszításokkal foglalkoznak. Számos kiállítást, illusztrációt készítettem az utóbbi néhány évben, rajzaim sokfelé megjelentek. 31 éves koromtól, Balla Gábor szobrászművész barátommal számos tematikus játszótér tervezünk, és sokat közülük el is készítettünk (a „Méhék” játszótér / Kispesti Családepítő Központ; „Halászvilág” (csak terv); „Fémfák” felnőtt-játszótér / Westend; Zöld Péter népmese-játszótér / Millenáris Park; Fehérló fia (terv); Esőerdő játszótér (terv); Pető falva / Pető Intézet; Évkerék tér / Érdi út).



Kő Boldizsár, *A tudománytó horgászai* (2004), tus, akvarell

# Új megoldás DNS, RNS és fehérje kapillárelektroforetikus vizsgálatára

## Lab-on-a-chip technológia, Agilent 2100 Bioanalyzer

A mikroméreték gyártástechnológiájának előnyeit kihasználva napjainkra lehetővé vált, hogy egy teljesen automatizált laboratóriumot *chip*en valósítsanak meg. A minta-előkészítés, folyadékvezérlés és biokémiai analízis munkafolyamatát integrálva, a *lab-on-a-chip* forradalmasítja a tudományos orvosi-biológiai kutatást. Az Agilent 2100 Bioanalyzer egyedi mérőeszköz nukleinsavak, fehérjék és sejtek azonos műszeren történő vizsgálatára. A különböző fajta minták analízisére a specifikus alkalmazhatóságot különböző kitek biztosítják, amelyek mintaspecifikus reagenseket és chipeket tartalmaznak. A *LabChip* kitek RNS, DNS, fehérje és sejtek vizsgálatához állnak rendelkezésre.



1. ábra A lab-on-a-chip mikro-gélelektroforetikus feltét.

A biomolekulák vizsgálata során az RNS-, DNS- és fehérjeminta automata minőségellenőrzése, méret- és mennyiségi meghatározása történik. A cserélhető feltétlen (1. ábra) elhelyezkedő elektródok között generált feszültség mozgatja a töltéssel rendelkező molekulákat a mikrokapilláris rendszeren keresztül, mely során az elektroforetikus elválasztás a frissen feltöltött gélben játszódik le. Az elektródák között létrehozott áramerősség és feszültség automata szabályozása határozza meg a molekulák sebességét és irányát. A miniatürizált folyadékutak miatt lényegesen lecsökken a futás-ideje és nő az elválasztóképesség.

Az *RNS Nano LabChip kit* segítségével teljes és mRNS mennyiségi és minőségi analízisét a „nano” koncentrációtartományban végezhetjük el, míg a *Pico kit* 200 pg/μl RNS-t is képes kimutatni. A teljes RNS RN-áz enzim degradációja könnyen kimutatható az RNS méreteltolódás, valamint a riboszomális csúcsok fluoreszcenciaintenzitás-csökkenése alapján. Az Agilent 2100 Bioanalyzer szoftver az mRNS

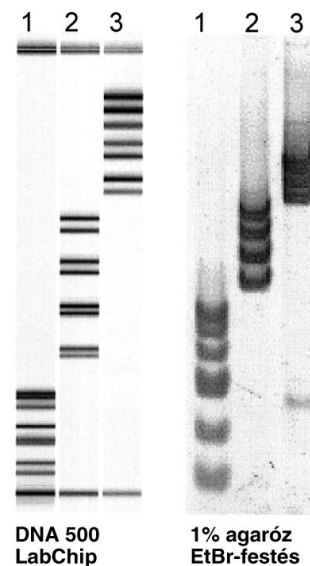
görbe alatti területét képes meghatározni, és százalékban adja meg a riboszomális RNS-szennyezést.



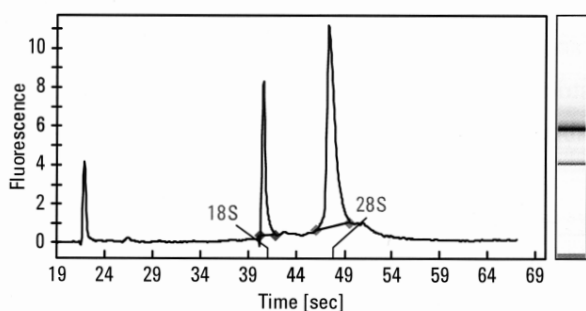
2. ábra Az Agilent 2100 Bioanalyzer műszer

A PCR és RT-PCR módszer a molekuláris biológiában a legelterjedtebb technikák közé sorolható. Olykor elegendő a PCR-termék jelenlétét vagy hiányát kimutatni, sokszor azonban szükség van a termék kvantifikálására és a nem specifikus amplikon detektálására.

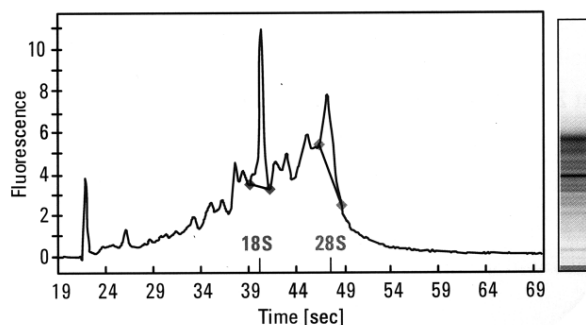
Az Agilent 2100 Bioanalyzer alkalmas PCR-termékek mennyiségi meghatározására és egyes vagy multiplex RT-PCR-termékek példátlan pontossággal történő mérésére (3. és 4. ábrák). A jobb érzékenység, széles lineáris dinamikus tartomány és a csíkok élessége a kisebb mennyiségben előforduló – agarózgélben nem látható – termékek kimutatását is lehetővé teszik.



3. ábra PCR-fragmentumok keveréke. 1. minta: 25, 35, 50, 53, 70, 90, 100, 105 bp; 2. minta: 150, 158, 200, 210, 250, 263, 300, 315 bp; 3. minta: 350, 368, 400, 420, 450, 478, 500 bp.



jó minőségű tRNS cc. 100



részlegesen degradált RNS

**4. ábra** Az izolált teljes RNS elektroforetikus vizsgálata az RNS 6000 Nano Labchip kittel. Az RNS minősége, genomális DNS-szennyezettsége mellett mennyiségi adatot is nyerünk a görbe alatti terület alapján, amely ez esetben 100 ng/ml tRNS-t jelent.

Nyers kivonatokból vagy sejtlizátumból a fehérjetisztítás igen hosszadalmas, kényes munka, számos lépést foglal magában. A *bioanalyzer* műszer segítségével a kívánt fehérje jelenlétét és mennyiségét minden egyes tisztítási lépés után ellenőrizhetjük, mindezt gyorsabban és kevésbé munkaigényes eljárással oldhatjuk meg, mint a konvencionális SDS-PAGE módszerrel. 10 mintáról 30 perc alatt digitálisan tárolt adatokat kapunk, elkerülve a festés, differenciálás, szárítás, digitalizálás, denzitometrázás több órát igénybe vevő folyamatát.

A *lab-on-a-chip* technológia segítségével lehetővé válik a sejtparaméterek mérésére alkalmas műszer és teszrendszer miniatürizálása. A *chipen* a sejtek mozgatása nyomás segítségével történik. A legtöbb molekuláris és sejtbiológia-laboratóriumban nélkülözhetetlen olyan eszköz, amellyel nyomon lehet követni a célfehérje expresszióját, egy sejtpopuláció transzfektáltságát vagy az apoptózis folyamatát.

Az *Agilent 2100 Bioanalyzer* előnye a hagyományos technikákkal szemben elsősorban a gyorsaság, a

teljes automatika és digitális adattárolás, a reprodukálhatóság, az igen jó érzékenység és felbontás, valamint az, hogy nem alkalmaz karcinogén anyagokat. Emellett a molekulák kvantifikálhatósága sem hagyható figyelmen kívül. A technológia alkalmazási területei:

- RNS:
- *microarray* kísérlet előtt az RNS integritásának vizsgálata
  - az RNS jelölésének optimalizálása
  - az RNS-fragmentáció optimalizálása
  - rRNS szennyezésvizsgálata, mRNS-koncentráció meghatározása
  - siRNS tisztaságvizsgálata
  - az RNS genomális DNS-szennyezettsége
- DNS:
- restrikciós enzimek emésztése után kapott DNS-termékek kimutatása
  - PCR-termékek tisztasága, multiplex PCR-termékek elválasztása, kvantitálása
  - génexpresszió-analízis multiplex RT-PCR-termékek mérésén keresztül
  - génmódosított szervezetek (GMO) kimutatása
- Fehérje:
- fehérjeexpresszió-vizsgálat sejtlizátumból
  - a fehérjetisztítás különböző lépéseinek ellenőrzése
  - rekombináns és tisztított antitestek mennyiségi és minőségi vizsgálata
- Sejt:
- sejtfelszíni markerek kimutatása antitestjelöléssel
  - transzfektációhatékonyság meghatározása
  - az apoptózis nyomon követése

Andrásfalvy Márton

Kromat Kft.

Tel.: 248-2110

E-mail: [marton.andrasfalvy@kromat.hu](mailto:marton.andrasfalvy@kromat.hu)



**Agilent Technologies**

Innovating the HP Way

## 6. Magyar Ökológus Kongresszus



Immáron hatodik alkalommal rendezték meg a magyar ökológusok háromévenkénti tudományos seregszemléjét, ezúttal Gödöllőn, 2003. augusztus 27–29. között (a konferencia honlapja: <http://bio.univet.hu/mok>). A kongresszus központi témáját a címe fejezte ki legjobban: „Biodiverzitás – Magyarország hozzájárulása az Európai Unió gazdagodásához”.

Hazánk flórája és faunája fajokban különösen gazdag. Pontos szám nem ismert, de az itt élő fajok számát 50–80 ezerre becsülik. Az ismertek mellett minden évben számos, a tudományra nézve is új magyarországi fajt írnak le. Sok értékes és különleges élőhely is található az országban. Joggal mondhatjuk tehát, hogy – a Kárpát-medence adottságai következtében – jelentős természeti értéket képviselünk Európa „vagyonában”. A kongresszus ennek a vagyonnak a bemutatásához, értékeinek feltárásához járult hozzá.

A kongresszuson, melyet Damjanovich Sándor, az MTA Biológiai Osztályának elnöke, Persányi Miklós környezetvédelmi és vízügyi miniszter, valamint Szendrő Péter, a házigazda Szt. István Egyetem rektora nyitottak meg (1. ábra), több mint száz előadás hangzott el, és 160 posztert mutattak be. A plenáris előadások az ökológia jelenlegi központi problémáiról szóltak: az élőhelyek feldarabolásának hatásától a természeti vagyon megismerésének szükségességén át a biodiverzitás jelentőségének bemutatásáig. Szekcióüléseken tárgyalták meg az elméleti ökológia, a biodiverzitás (fajgazdagság), a természetvédelem és konzervációbiológia, a környezetvédelem és tájökológia, a vizek ökológiája, a növényökológia, a növényi ökofiziológia, az állatpopulációk ökológiája, a paleoökológia, a talajökológia legújabb problémáit és kutatási eredményeit.

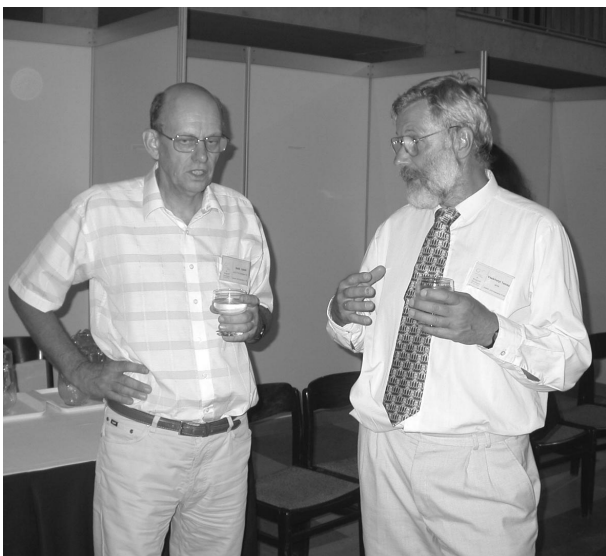
A kongresszuson nem volt *sensu stricto* biokémiai ökológia [1] szekció. Gondolhatnánk azért, mert a biodiverzitásnak nincs sok biokémiai vonatkozása, vagy pedig azért, mert a két tudományág – már az organizációs szintek közötti távolság miatt is – túlságosan távol áll egymástól. Valójában azonban számos prezentáció tarthatott számot a biokémiku-



1. ábra Persányi miniszter úr nem formális beszédet mondott ... és szemmel láthatóan jól is érezte magát a megnyitón (balról jobbra, Fekete Gábor akadémikus, Damjanovich Sándor az MTA Biológiai Osztályának elnöke, Persányi Miklós miniszter).

sok érdeklődésére is. Elsősorban a növényi ökofiziológia szekcióban, ahol Tuba Zoltán (aki a Magyar Biokémiai Egyesület Környezetbiokémiai Szakosztályának vezetőségi tagja) kutatócsoportja (SZIE, Növénytan és Növényélettani T., Gödöllő) több prezentációban is foglalkozott a növényi társulásokban a CO<sub>2</sub>-gázcserenek a globális hatások nyomán bekövetkező változásaival. Fák élőhelytől függő ökofiziológiai (vízforgalom) viselkedését mutatta ki Gáspár A. és mtsai (DE, TTK, Növénytan T., Debrecen). Csak sajnálhatjuk, hogy az állatok ökofiziológiájával kapcsolatos hazai kutatások, szerényen szólva is, gyermekcipőben járnak.

Számomra váratlan módon olyan sok paleoökológiai előadást jelentettek be, hogy ezek külön szekcióba kerültek (Sümegei P. csoportja, SZTE, Földtani és Őslénytani T., Szeged, Füköh L., Mátra Múzeum, Gyöngyös, Joó K., SZIE, Tájökológiai T., Gödöllő). Valószínűnek tartom, hogy biokémiai módszerekkel hasznos információkat lehetne nyerni különböző korok flóráinak és faunáinak rokonsági viszonyairól. (Hasonló területről – a fosszilis DNS kutatása – valóban jelent már meg cikk folyóiratunkban [2] – a szerk.) Úgy, ahogy recens fajok taxonómiai helyzetének tisztázásához az enzimpolimorfizmust (Nédli J. és mtsai, Magyar Természettudományi Múzeum Állattára, Budapest), genetikai témintázat kiderítéséhez a RAPD polimorfizmust (Krizsik



**2. ábra** Az igazi tudósok még a fogadáson is pezsgő tudományos eszmecserét folytattak. Gallé László tanszékvezető (balra) és Vásárhelyi Tamás (MTM főigazgató-helyettes) a problémára koncentrálnak.

és *mtsai*, ELTE, Genetika Tanszék, Budapest) vizsgálják vagy ektomikorrhizák biodiverzitásának megállapítására PCR, RFLP és DNS-ITS szekvenenciaanalízis módszereit használják (Jakucs E., ELTE, Növény szerkezet Tanszék, Budapest).

A környezetszennyezési problémák jelentősége miatt érthető, hogy sokan foglalkoztak a nehéz-

fémek hatásaival. A Nyíregyházi Főiskola kutatói (Kaluczka L. és *mtsai*, mely kutatócsoport „érintőleges” résztvevője Kiss Ferenc, a Magyar Biokémiai Egyesület Környezetbiokémiai Szakosztályának vezetőségi tagja is) vizsgálták a szénhidrátok lebontásában szerepet játszó enzimek aktivitása és a nehézfémek közötti kapcsolatot. Nehézfémekről szólva előadás ismertette a kadmium, króm és ólom hatását a vadkacsa embrionális fejlődésének kezdeti szakaszára (Kertész V., SZIE, Állattani és Ökológiai Tanszék, Gödöllő). A szakmai megbeszélésekre az egyes előadás-ülésszakok mellett a poszterszekció és a fogadás is kiváló lehetőséget teremtettek (2. ábra).

A két szakterület kutatóinak közeledése egymáshoz, közös kutatások végzése kétséget kizáróan ígéretes eredményekkel kecsegtet. Ezt mutatják a nemzetközi trendek is. Talán a hetedik ökológus kongresszuson már egy „valódi” biokémiai ökológia szekciót is láthatunk. Ennek elősegítésére írtam ezt az ismertetést.

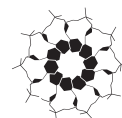
### Irodalmi hivatkozások

- [1] Harborne, J. B. (1993) Introduction to Ecological Biochemistry. (4th ed.) Academic Press, N.Y.
- [2] Nagy, T. (2001) „Szent László Pénze” (*Nummulites*) kémiai analízise. *Biokémia*, XXV: 53–58.

Bakonyi Gábor



A Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE)  
és a Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) szakosztályai  
az **Analitikai Vegyészkonferencia (Balatonföldvár, 2004. június 30–július 2.)**  
keretén belül közös szervezésben rendezik meg a



## Bioanalitika 2004

szimpóziumot, melyre ezúton hívjuk fel valamennyi MBKE-tag figyelmét.

A szimpózium tematikája felöleli a bioanalitikai módszerek fejlesztésének és alkalmazásának körét, műszeres (HPLC, CE), immunanalitikai (RIA, ELISA) és molekuláris biológiai (PCR, NASBA) eljárásokat, alkalmazott genomikai és proteomikai vizsgálatokat, valamint analitikai célzatú molekuláris modellezési technikákat.

Felkérjük a szimpóziumon részt venni szándékozókat, hogy jelentkezési szándékukat s megtartani kívánt előadásuk/poszterük címét juttassák el az [aszek@nki.hu](mailto:aszek@nki.hu) elektronikus levelezési címre.

Meghosszabbított jelentkezési határidő: 2004. április 30.

Jelentkezési lap letölthető a <http://www.vegkonf2004.mke.org.hu> internetes címről.



# Sejtspecifikus genomika lézer-mikrodisszekció segítségével

A sejtspecifikus molekuláris biológiai változások vizsgálatához a szövetminták nem jelentenek ideális alapanyagot. A specifikus sejtpopulációk kiválogatása viszont reménytelennek tűnő vállalkozás volt mindaddig, amíg a sejtek metszetekből való eltávolítására alkalmas módszereket ki nem dolgozták. A lézer-mikrodisszekciós (*laser capture microdissection*, LCM) eljárás gyors és egyszerű megol-



1. ábra A PixCell II kézi vezérlésű LCM készülék.

dást kínál ehhez. Az Arcturus cég, amely úttörő szerepet játszott a metodika kidolgozásában, egy kézi vezérlésű és egy nagy kapacitású automata készüléket kínál erre a célra. Azonban itt nem ér véget a cég ajánlata, hiszen a kimetszett sejtekből izolálni kell a DNS-t, RNS-t, de a kimetszés előtt is szükséges a célsejtek megjelölése, láthatóvá tétele. Az Arcturus nagy hangsúlyt fektetett mindezek kidolgozására, s így mára nem csupán a készüléket, de a teljes vizsgálati rendszert is kínálja.

Az első lépés a megfelelő minta-előkészítés (metszetkészítés, fixálás, dehidratálás), amihez RN-ázmentes oldatokat biztosít a cég. A célsejtek vizualizálására kétféle megoldást kínálnak: általános sejt-festési metodika fagyasztott metszetekhez, illetve immunfluoreszcenciás festés, ahol a felhasználó által tetszőlegesen kiválasztott biotinilált elsődleges ellenanyaghoz kötünk Cy3 reagenssel konjugált sztrepavidint. Mindkét eljárás kialakításakor nagy figyelmet fordítottak a nukleinsav- és fehérjemole-

kulák intaktságának megőrzésére, de főleg az RNS védelmére (RN-áz-mentes oldatok).

Az LCM eljárás a PixCell II. kézi vezérlésű, valamint az Autopix automata készülékekben hajtható végre (1. ábra). A többlépéses kimetszés során a teljes metszetből kívánt sejtcsoportokat, sejteket emelhetünk ki.

A sejteket tartalmazó fej pontosan illeszthető az extrakciós feltéthez (*ExtracSure Sample Extraction Device*), amelyben a sejtek lízise és az extrakció történik. Ez utóbbi lépéshez *Picopure* kitek használhatóak. Az RNS-izoláló kittel akár egyetlen sejtől is kinyerhetők intakt molekulák, míg a DNS-izolálás „csak” mintegy 10 sejtől eredményes. Az RNS-izoláló kit speciális oszlopot tartalmaz, amelyről 10 µl térfogatban történik az elúció. A DNS extrahálása egy proteináz-K reagenssel végzett feltárást követően történik, és az extraktum közvetlenül használható PCR-vizsgálatokra. Az izolált RNS mennyisége sokszor oly kevés, hogy közvetlenül nem lehetne további vizsgálatokra felhasználni. A *RiboAmp* kitek lineáris amplifikációval egyetlen lépésben ezerszeresére növelhetik az RNS mennyiségét. A kit speciálisabb változata olyan körülményeket biztosít, hogy az aRNS (lineárisan amplifikált antiszenz RNS) kereskedelmi kitekkel jelölhető és oligoarray rendszerben felhasználható. A HS verzióval akár 10 sejtől (!) is oligoarray módszerre alkalmas RNS-t tudunk előállítani. Ezen rendszer génextpressziós kutatásokban való eredményességét több mint 100 tudományos dolgozat bizonyítja.

Holló Róbert



**BIO-SCIENCE**

1119 Budapest, Andor u. 47-49.  
Tel.: 463-5077, Fax: 463-5261  
E-mail: [bio-sci@bio-science.hu](mailto:bio-sci@bio-science.hu)  
[www.bio-science.hu](http://www.bio-science.hu)

 **NOVO-LAB**



*T*personal

# BIOMETRA THERMOCYCLEREK



*T*3



*T*gradient



*T*1

**Gyorsaság és pontosság  
5 variációja**



*T*robot

Whatman

**Biometra®**

 **NOVO-LAB**

1191 Budapest, Üllői út 200. Tel/Fax: 281-3692  
Levél cím: 1068 Budapest, Pf.: 21 e-mail: info@novolab.hu



# Készülékek és reagensek felsőfokon

