



SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁSOK A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIÁN

Guttman András

MINIATÜRIZÁLÁS  
AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKÁBAN



Terintetes Nagy 97

személyi szabályainak 32. és a leg szót:  
újraújra választott tag, a külső kivétel  
szabályába tartozó dolgozat felolvasását,  
személyes megnevezés esetén beüldö  
legfelelő egy év alatt széklet foglalt; külsőben meg

széklet megnevezésén.  
Lehetetlen esetek, melyekben kivált vidéken la  
gátolhatatlan a határvitét megtartani: de hallgat  
elnézni a szabály meg nem tartatását, amelyet  
mint összes szabályzatunkat székletünk tekintet  
következéseire figyelmeztetünk. J. Aladein  
széklettel.

Indoklásba hozatik tehát, hogy egyetlene az  
1861. igt. választott székletfoglalt által meg nem érő  
kettő <sup>rendes</sup> tagok neve a kivételről kitöröltesse, az 1861-  
és 1865-ig választott a szabályokra emeltesse, jö  
vőre pedig a titokzatos hivatal oda utasítsa, hogy  
evidenciában tartás végett az újon választottakat,  
míg széklet nem foglaltat, a sorozatba fel ne vegye.

853  
1865

Jan. 26. 1865.  
Zollner Mór  
Lugany Béla  
Hollán Ernő

Kemény László  
Königsberg László  
Jóshörményi  
r. tag Jolly János utaz  
Gyengyócsanak

Guttman András

MINIATÜRIZÁLÁS AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKÁBAN

Elektroforézis-mikrochipek alkalmazása a modern bioanalitikában

SZÉKFOGLALÓK  
A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIÁN

A 2004. május 3-án megválasztott  
akadémikusok székfoglalói

Guttman András

MINIATÜRIZÁLÁS AZ  
ELVÁLASZTÁSTECHNIKÁBAN

Elektroforézis-mikrochipek alkalmazása  
a modern bioanalitikában



Magyar Tudományos Akadémia • 2014

Az előadás elhangzott 2004. október 12-én

Sorozatszerkesztő: Bertók Krisztina

Olvasószerkesztő: Laczkó Krisztina

Borító és tipográfia: Auri Grafika

ISSN 1419-8959

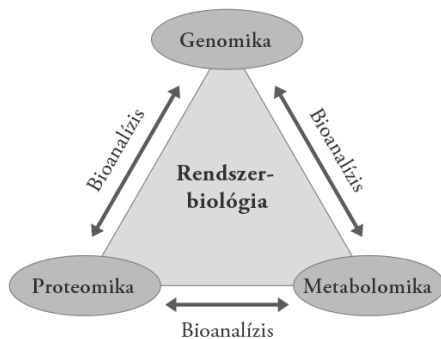
ISBN 978-963-508-737-2

© Guttman András

Kiadja a Magyar Tudományos Akadémia  
Kiadásért felel: Lovász László, az MTA elnöke  
Felelős szerkesztő: Kindert Judit  
Nyomdai munkálatok: Kódex Könyvgyártó Kft.

Napjainkban az újabb és újabb molekuláris biológiai módszerek kidolgozása egyre szorosabb kapcsolatba kerül a műszaki tudományokkal, és az egyre hatékonyabb, egyre jobban automatizált technikák megvalósítása ezen szakterületek közös feladata. A természettudományokban az utóbbi évtizedben bekövetkezett paradigmaváltás következtében a kémiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerek mindinkább a rendszerbiológia (*i. ábra*), az organizmus egy kísérletben történő, globális, átfogó vizsgálata felé tolnak. A genomika, a proteomika és a metabolomika rohamosan növekvő igényeinek és a technikában megfigyelhető általános fejlődési tendenciáknak megfelelően a miniatürizálás az elválasztástechnikák körében is egyre inkább tért hódít, mivel egyre kisebb térfogatú, ugyanakkor nagyszámú minta kis helyen történő, gyors analízisét teszi lehetővé (Heller–Guttman 2002).

Korunkban a komplex biológiai minták vizsgálatánál elengedhetetlen az olyan modern bioanalitikai módszerek alkalmazása, mint a genomterképezés és -szekvenálás, proteomanalízis és -szekvenálás, valamint metabolomanalízis és -azonosítás. Az kapott adatokat bioinformatikai módszerek segítségével hasonlítjuk össze a már meglévő adatbázisokkal, és ez nagymértékben megkönnyíti a differenciáltan kifejezett gének, illetve géntermékek azonosítását és hasznosítását napjaink orvostudományában és a modern gyógyszerkutatás és -fejlesztés során (Darvas–Guttman–Dorman 2004). A múltban a kémiai szintézissel előállított molekulákat egyszerűen próba-szerencse alapon vizsgálták. Ma a nagy mennyiségben rendelkezésre álló kombinatorikus kémiai könyvtárak lehetővé



1. ábra. A bioanalitika szerepe a rendszerbiológiában

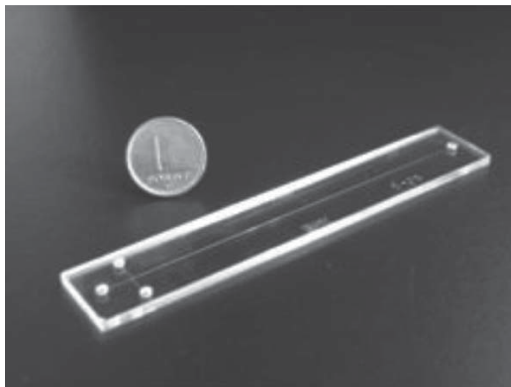
teszik, hogy milliószámra vizsgáljunk újabb és újabb vegyületeket. Így a génszekvenciák és a géntermékek ismeretében egyre inkább áttérünk a biológiai fekete doboz vizsgálatáról a rendszer biológiai megközelítésére. A modern orvostudományi kutatások ennek kapcsán genomikai adatbázisokból kiindulva a transzkriptom, a proteom és a metabolom feltérképezésén keresztül érnek el újabb és újabb eredményeket. E célok eléréséhez azonban feltétlenül szükség van modern és nagy hatékonyságú elválasztási technikák kifejlesztésére. Ezen módszereknek meg kell felelniük korunk és természetesen a vizsgált biológiai rendszer kívánalmainak, úgymint kis mennyiségű minták (mikro- és nanoliter térfogatok) gyors analízise (másodperces elválasztási idők), nagy felbontóképesség és olyan enyhe elválasztási körülmények, amelyek lehetővé teszik a szeparált komponensek további azonosítását, többnyire tömegspektrometriával vagy mikroszekvenálással (Rathore–Guttman 2003). A detektálási érzékenységnek bizonyos esetekben el kell érnie az egy molekula kimutathatósági határát. Ezen modern elválasztási módszereket főleg a rendszerbiológia részterületein használjuk, de ezen túl természetesen alkalmazzuk biomarkerek felfedezésénél, metabolizmusutak analízisében és gyógyszercéltermékek validálási eljárása során.



A korszerű műszeres bioanalitika egyik alapmódszere a nagy nyomású folyadékkromatográfia (HPLC), amelyet Horváth Csaba professzor fejlesztett ki csaknem négy évtizeddel ezelőtt (Karger–Snyder–Horváth 1973). A technika azóta igen komoly fejlődésen ment keresztül, és napjainkban a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiai készülékek világszerte az élettudományokkal és a gyógyszerfejlesztéssel foglalkozó laboratóriumok mindegyikében megtalálhatók. Az utóbbi évtizedben a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiai módszerek továbbfejlesztése két-, sőt többdimenziós rendszerekre komoly előrelépést jelentett a proteomikai és a metabolomikai kutatásokban szükséges nagy felbontóképesség eléréséhez. A modern bioanalitika és molekuláris biológia másik leggyakrabban használt elválasztástechnikai módszere az elektroforézis. A poliakrilamid és agarózgél alkalmazó elektroforézisteknikák alapvető fontosságúak a genomikában és a proteomikában. A konvencionális (lap-) gélelektroforézis lehetővé teszi mind egy-, mind kétdimenziós elválasztási rendszerek alkalmazását. A tömegspektrometria és mágneses magrezonancia-spektroszkópia szintén fontos szerepet játszik a modern bioanalitikában, különösen csatolt módszerek alkalmazásánál, azaz valamilyen elválasztástechnikai módszerrel összekötve. Ezek a modern kapcsolt rendszerek tették lehetővé az olyan nagy hatékonyságú elválasztási és azonosítási módszerek bevezetését, mint például a nanoLC-nanoLC/MS<sup>2</sup>-en alapuló multidimenzionális fehérjeazonosítási technika (MUDPIT), amely napjaink proteomikai kutatásának egyik leggyakrabban alkalmazott módszere. A kapilláriselektroforézist mint elválasztási technikát csaknem két évtizede használjuk főképpen biomolekulák gyors analizésére (Karger–Cohen–Guttman 1989). A Guttman és munkatársai által a 90-es évek elején kifejlesztett, géllal töltött kapillárisok olyan nagy felbontású DNS-elválasztásokat eredményeztek, amely a későbbiekben lehetővé tette a humán genom évekkel a tervezett időpont előtti teljes szekvenálását (Cohen–Najarian–Paulus–Guttman et al. 1988; Guttman 2003). A kapilláriselektroforézissel nemcsak DNS-molekulákat, hanem fehérjéket (Ganzler–Greve–Cohen–Karger–Guttman et al. 1992; Guttman–Horváth–

Cooke 1993) és komplex szénhidrátokat (Guttman 1996) is nagy sikerrel választathatunk el.

A mikrochip-elektroforézis (Khandurina–Guttman 2003) a kapilláris-elektroforézisből fejlődött ki, és napjaink legmodernebb elválasztástechnikai eszközei közé tartozik, amely biológiailag fontos molekulák – úgymint a DNS, fehérjék és komplex cukrok – gyors és hatékony elválasztására alkalmas. A módszer azért kapta ezt a nevet, mert a kémiai chipek előállítása a számítógép-chipek gyártása során alkalmazott technikákat (fotolitográfia, kémiai maratás stb.) használja (Heller–Guttman 2002). A miniatürizálás számos előnnyel jár különösen azon alkalmazások esetében, ahol nagyszámú minta gyors elemzése szükséges, és ez a rendszerbiológia korszakában alapvető fontosságú. Az analízis kisméretű üveg- vagy műanyag lapba maratott csatornában történik (2. ábra), és a néhány cm hosszúságú kapillárisokban a nanoliternyi mennyiségű minták elemzése csupán másodperceket, esetleg perceket vesz igénybe (Rónai–Barta–Sasvári–Székely–Guttman 2001).



2. ábra. Elektroforetikus mikrochip mérete az egyforintos érmével összehasonlítva

A miniatürizálás több nagyságrend előrelépést jelent, nemcsak az elválasztás gyorsasága, hanem annak felbontóképesége szempontjából is. Emellett hagyományosan egymást követő kémiai és biokémiai reakciók, valamint elválasztási lépések – úgymint polimeráz-lánreakció (PCR), restrikciós enzimes emésztés (RFLP), DNS-fragmentum-analízis – akár egyetlen monolitikus mikrochipben is elvégezhetőek (Chovan–Guttman 2002). A miniatürizálás előnyei közé tartozik a kis reagensigény, csökkentett oldószer-felhasználás és gyors analízisidő. Ugyanakkor ezen módszer magában hordozza a multiplex, integrált rendszerek kialakításának a lehetőségét is. Sokcsatornás chippek alkalmazásával akár több száz minta párhuzamos vizsgálata válik lehetővé (96, 384 stb.), és mivel ezen új módszer könnyen automatizálható, mindez jelentős munka-, idő-, anyag- és költségmegtakarítást jelent. A kémiai mikrochipek bevezetésével a közeljövőben az analitikai kémiai laboratóriumok gyökeres változásának nézünk elébe (Khandurina–Zhu–Guttman 2003). Hasonlóan a számítástechnika robbanásszerű fejlődéséhez, amely lehetővé tette, hogy Neumann János egykori több szobát elfoglaló számítógépét ma már egy kis laptopszámítógéppel helyettesítsük, az általunk manapság elfogadott analitikai kémiai laboratórium akár hitelkártya méretűre is lekicsinyíthető (Guttman 2000). Abból kiindulva, hogy a számítógépek központi processzorainak sebessége nagyjából 18 havonta megduplázódik, felmerül a kérdés, hogy vajon a kémiai chiptechnológia képes lesz-e felvenni ezt az iramot.

Mielőtt azonban jobban belemertílnék a kémiai chippek részletes leírásába, szeretném megragadni az alkalmat, hogy felhívjam a figyelmet a DNS/fehérje chippek és az elválasztástechnikai kémiai chippek közötti alapvető különbségre. Maga a kémiai chip mindkét esetben speciális mikromegmunkálási eljárással készül, de míg a DNS/fehérje chiphez akár több százezer DNS- vagy fehérjemolekula köthető, lehetővé téve annak tömeges diagnosztikai alkalmazását, addig az elválasztástechnikai mikrochipek magas szelektivitásukkal tűnnek ki (Khandurina–Guttman 2002). A DNS-chipek működésének alapelve azonos

a Southern-blot, illetve a reverse dot blot hibridizációs módszerekével, a legfőbb különbség a méretdimenziókban és ebből következőleg a hatékonyságban van. A módszer lényege ebben az esetben kvázi-szekvencaanalízis: a vizsgált DNS a chip felszínén rögzített – ismert bázissorrendű – próbákhoz kötődik, amelynek alapján a minta szekvenciájára következtetünk. A technika minőségi és mennyiségi analízisre egyaránt alkalmas. Fő felhasználási területe a génexpresszió elemzése és mutációk, illetve egy pontos nukleotid-polimorfizmusok (pontpolimorfizmus, SNP), valamint rövid, 1–5 bázispárt érintő inzerciók, mikroszatellita-polimorfizmusok és deléciók ezreinek, tízezreinek a párhuzamos vizsgálata. Hasonlóképpen a DNS-chipekhez, a fehérjechipekre nagyszámú fehérjét (például antitestet) kötnek, és ezek segítségével vizsgálnak egész sejt kivonatokot, illetve különböző testfolyadékokot (Khandurina–Zhu–Guttman 2003).

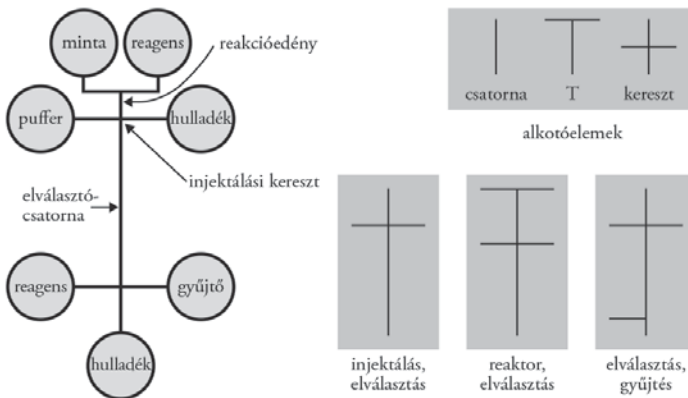
Lényegesnek tartom itt megjegyezni, hogy az úgynevezett „Lab-on-a-chip” megközelítés napjainkban már a realitás szintjén áll, lehetővé téve számos egymást követő műveleti lépés, például kémiai reakciók, mintaelőkészítés, elválasztás és frakcionálás gyakorlatilag egyetlen mikrochipen történő megvalósítását egy megfelelően kialakított monolitikus rendszerben (Chovan–Guttman 2001). Az elektroforézis-mikrochip elkészítésének első lépése a csatornahálózat és a reagenstartó edények elrendezésének a megtervezése annak tudatában, hogy mit várunk el a kémiai chiptől. A következő lépés a terv megfelelő chip-alapanyagra való átvitele, felhasználva a számítógépes mikrochipek gyártásánál bevezetett és ma már nagyiparilag is alkalmazott módszereket. Ezzel a technikával akár több ezres nagyságrendben is előállíthatók elektroforézis-chipek. Megfelelő detektorok alkalmazásával femto- és attomolmennyiségű minta detektálása lehetséges, és az így kialakított mikrochipek 10-szeres, sőt 100-szoros analízisbességet biztosítanak a konvencionális elválasztási módszerekhez képest. Különösen előnyös, hogy már meglévő és beállított folyadékkromatográfiás vagy kapilláris elektroforézis-módszerek egyszerűen átültethetők mikrochipformátumra. Többcsatornás chipek alkalmazásával (96, 384 vagy több

csatorna) akár nagyságrendekkel is megnövelhető a rendszer kapacitása, és az így nyert hatalmas adathalmaz megfelelően gyors számítógépekkel rövid idő alatt kiértékelhető (Darvas–Guttman et al. 2004).

Elektroforézis-mikrochipeket mikromegmunkálással készíthetünk üvegből, kvarcból és különböző műanyagokból, úgymint polimetil-metakrilát, teflon, polikarbonát stb. A mikrochipekre jellemző rendkívül magas felület-térfogat arány előnyös az elektroforetikus folyamatban felszabaduló hő gyors elvezetése szempontjából. Ugyanakkor a kémiai chip alapanyagának kiválasztásánál megfontolandó, hogy miniaturizált körülmények között ezen nagy felület anyagi minősége is fontos szerepet játszhat. Ez különösen lényeges lehet fehérjék elektroforézise, illetve kémiai reakciók (polimeráz-láncreakció, restriktációs emésztés) során, amikor a negatív töltésű üvegfelszín esetleg gátló tényezőként szerepelhet (például nem specifikus kötődés). Műanyagok alkalmazása esetén ezzel a kedvezőtlen hatással kevésbé kell számolnunk, emellett a műanyagból készült kémiai chipek olcsók, nem törékenyek és könnyen megmunkálhatók (Berdichevsky–Khandurina–Guttman et al. 2004).

Üvegből készült elektroforézis-mikrochipek esetén a mintakomponensek elválasztása kisméretű üveglapba maratott csatornában történik, amelyek általában 10–40  $\mu\text{m}$  mélyek és 60–200  $\mu\text{m}$  szélesek (2. ábra). A kialakított munkacsatornában egyszerű pufferoldatoktól a bonyolult géleken keresztül a monolitikus elektrokromatográfiás állófázisokig bármilyen elválasztó rendszert alkalmazhatunk. Az elektroforézis-mikrochipek tipikus mérete néhány centiméter, ámbar 96 és 384 csatornás chipek esetén elérheti a 20–30 cm-t is. A csatornák a mikrochip felszínén lévő nyílásokban végződnek, amelyek az oldatok (minta, puffer, szeparáló mátrix) betöltésére szolgálnak (3. ábra). Az ide csatlakozó elektródok segítségével az egyes csatornában különböző nagyságú és polaritású elektromos mezők alakíthatók ki, amelyek alkalmasak a mikrochipben lévő anyagok mozgatására és a mintakomponensek elektroforetikus elválasztására.

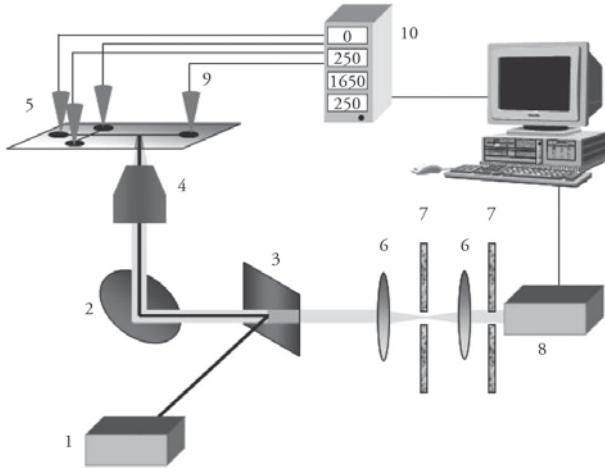
A pufferoldatok és a minta mozgatása az általában alkalmazott elektrokinetikus módon kívül még nyomással/vákuummal is elérhető. A legegyszerűbb mikrochipek két, egymást keresztező csatornát tartalmaznak. A rövidebb csatorna a minta injektálására, a hosszabb az elektroforetikus elválasztásra szolgál. Két mintatartály alkalmazásával egyetlen csatornában is igen pontos molekula-méretmeghatározás válik lehetővé, a minta és a megfelelő molekulatömegű marker egyidejű injektálásával és elválasztásával. A 3. ábrán bemutatott egyszerű alkotóelemek, úgymint egyenes csatorna, T-elágazás vagy kereszt alakú csatlakozás felhasználásával, igen komplikált integrált rendszereket alakíthatunk ki (Guttman 2001). Így egyszerűen összekapcsolható egy kémiai/biokémiiai reaktoregység az injektáló rendszerrel, az elválasztócsatornával és egy esetleges frakciónedővel az elválasztó csatorna megfelelő részén. Ugyanakkor ma már lényegesen összetettebb elrendezésű elektroforetikus mikrochipek is léteznek: 10 cm átmérőjű mikrochip sugárirányú csatornáiban 96 minta egyszerre vizsgálható (Khandurina–Guttman 2002). Az ilyen sokcsatornás mikrochipek a minták felvitele általában folyadékkezelő automatákkal történik, és egy minta analízisének ideje átlagosan 5 másodperc.



3. ábra. Integrált elektroforézis-mikrochip főbb csatornahálózati alkotóelemei (Guttman 2001)

Az elektroforetikus mikrochip tervezése során megfelelő számítógép-programokat is alkalmazhatunk, amelyek segítségével jól szimulálhatjuk a mikrochipen lejátszódó reakciós és elválasztási lépéseket (Chovan–Guttman 2002). A megfelelő tervrajz birtokában első lépésként fotolitográfias módszerekkel elkészítjük a chipen a kialakítandó csatornahálózatot. Ez üveg alapanyag esetén ammónium-fluorid és hidrogén-fluorid keverékkel történő maratással végezhető el. A kívánt csatornamélység elérése után (általában 20–50  $\mu\text{m}$ ), a kialakított csatornahálózatot megfelelően előkészített üveg- vagy műanyaglapal fedjük, és hőkezeléssel ( $\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$ ) vagy ragasztással ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) rögzítjük. Az így kapott zárt csatornarendszer végein megfelelő átmérőjű ( $\sim 1\text{--}2\text{ mm}$ ) lyukakat fúrva oldhatjuk meg a „makro”-világgal való kommunikációt, elektródok, oldatok bevezetését, mintainjektálást stb. (Khandurina–Guttman 2002). Mint korábban már említettem, az elektroforetikus mikrochip előállítására szolgáló két fő alapanyagtípus az üveg és a megfelelő műanyagok. Az üveg előnye jó optikai és hővezető tulajdonságai és a már nagyszámban rendelkezésre álló felületkezelési, illetve derivatizálási módszerek. Hátránya azonban az üvegből készült chipeknek, hogy még tömeges gyártás esetén is igen drágák. Ugyanakkor a műanyagból készült chipék optikai és hővezető tulajdonságai változóak, és bizonyos esetekben még autofluoreszcenciával is számolnunk kell. További hátránya a műanyag chipeknek, hogy a rendelkezésre álló kémiai felületkezelési és derivatizációs módszerek száma korlátozott. Kihangsúlyozom viszont, hogy a műanyag chipék előállítása kifejezetten olcsó, és ez lehetővé teszi az egyszerű használatos, eldobható chipék alkalmazását (Darvas–Guttman–Dorman 2004). A detektálás a mikrochipen főképpen lézerindukált fluoreszcencia (LIF) segítségével történik, de emellett más módszerek, mint ultraibolya fényelnyelés, elektrokémiai és tömeg-spektrometriai technikák is alkalmazhatók (Guttman–Khandurina 2003). A detektálás a HPLC-hez hasonlóan csaknem minden esetben „online” módon történik. Kutatólaboratóriumomban felépített és alkalmazott elektroforézis-mikrochip detektorrendszerének felépítési sémáját a 4. ábra mutatja (Rónai–Sasvári–Székely–Chovan–Guttman 2002).

Lézerindukált fluoreszcens detektálás esetén a mikrochipet egy fordított konfokális mikroszkóp tárgyasztalára helyezzük, és a megfelelő hullámhosszúságú lézersugarat az objektív segítségével a mikrochip elválasztó csatornájának egy adott pontjára fókuszáljuk.



4. ábra. Az elektroforetikus mikrochip-berendezés felépítésének vázlata. 1: lézer, 2: tükör, 3: kettőtörő tükör, 4: mikroszkópjobjektív, 5: elektroforetikus mikrochip, 6: lencsék, 7: optikai szűrők, 8: detektor, 9: puffertartályok, 10: nagy feszültségű tápegység (Rónai–Sasvári–Székely–Chovan–Guttman 2002)

A mintaadagolás két fő módja az úgynevezett elektrokinetikus és a nyitott/zárt kapus injektálás. Az 1. táblázatban bemutatott konfiguráció esetén a 4. mélyedés a mintát, az 1., a 2. és a 3. mélyedések pedig a futtató puffert tartalmazzák. Elektrokinetikus injektálás során a minta a mintatartó tartályból áramolva (1. táblázat, 4-es pozíció) megtölti a rövid mintatartó csatornát (4 => 2) és ennek megfelelően a rövid (mintatartó) és a hosszú (elválasztó) csatornák kereszteződését. Az ezt követő elektroforézisanalízis során ténylegesen a mintának csak



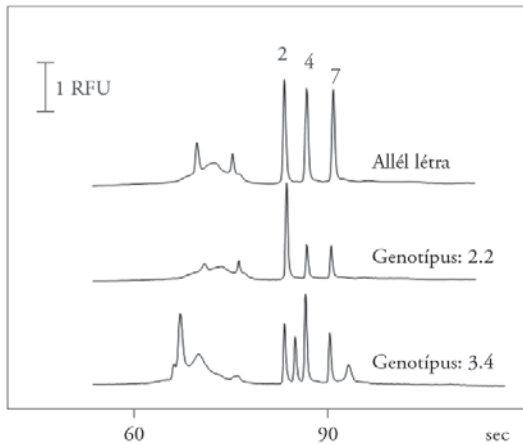
azt a kis részét injektáltuk, és ez a mintatartó csatorna feltöltése után éppen a keresztveződésben van. Nyitott/zárt kapus injektálás esetén ezzel szemben a kapcsolófeszültségek változtatásával tetszés szerint állíthatjuk be az injektált minta térfogatát (Khandurina–Guttman 2002). Mindkét injektálási módot követően az elválasztás során a kapcsolófeszültségeket úgy választjuk meg, hogy a kapillárisok keresztveződésében lévő molekulák az elválasztó csatornában az injektálási pont irányából mozogjanak a detektálási pont felé, ugyanakkor a futtató puffér egy része lassan visszaáramoljon az elválasztó csatornából a minta, illetve a gyűjtőtartályok felé. Ez a beállítási mód a jó felbontású mikrochip-elektroforézis alapfeltétele, mivel ha a minta az elválasztási lépés során folyamatosan „beszivárog” az elválasztó csatornába, akkor éles csúcsok helyett elmosódott, emelkedő alapvonalú elektroferogramot kapunk. Az injektálás és az elválasztás során alkalmazott feszültségértékeket ennek megfelelően kell beállítani, amint azt az 1. táblázat mutatja (Rónai–Sasvári–Székely–Chovan–Guttman 2002).

1. táblázat. Elektrokinetikai injektálás és elválasztás során alkalmazott feszültségértékek egyszerű keresztelrendezésű mikrochip esetén (Rónai–Sasvári–Székely–Chovan–Guttman 2002)

Tartály	1	2	3	4	Negatív töltésű részecskék vándorlása
Injektálás (V)	240	480	240	0	
Elválasztás (V)	0	250	1650	250	

A leggyakrabban használt egyszerű mikrochip-alkalmazások mellett (DNS-fragmentum-analízis, fehérjék SDS-gélelektroforézise, komplex szénhidrátok elválasztása stb.) olyan integrált rendszereket is kidolgozhatunk, amelyek korábban a konvencionális módszerek alkalmazásával elképzelhetetlenek voltak. Egyetlen folyamat részeként a mikrochip csatornáiban polimeráz-láncreakció (PCR), mintakonzentrálás, valamint restrikciós emésztés (RFLP)

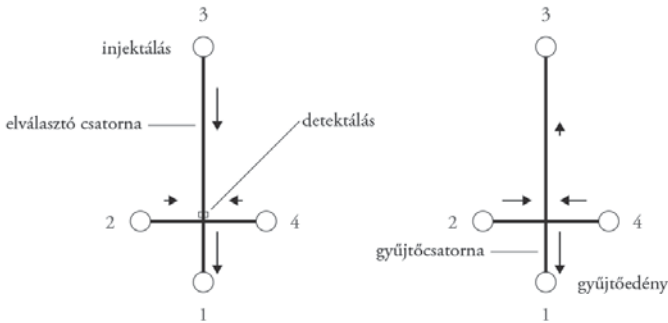
is elvégezhető (Rathore–Guttman 2003), így a módszer igen hatékonyan használható gyors DNS-analízisre, és egyszerűen alkalmazható mind egy pontos nukleotid-polimorfizmusok (SNP), mind pedig hosszúság-polimorfizmusok (VNTR) vizsgálatára és genotipizálásra (5. ábra), ahogy azt munkacsoportommal bemutattuk (Barta–Rónai et al. 2001; Guttman–Khandurina et al. 2003). Megfelelő körülmények között olyan nagy felbontóképességet érhetünk el, hogy bizonyos mikrochip-konfigurációkat DNS-szekvenálásra is alkalmazhatunk (Karger–Guttman 2003). Az elektroforetikus mikrochipek ezen felül nagyszerűen alkalmazhatók a modern gyógyszer kutatás-fejlesztésben nagy kapacitású biológiai szűrésre, dózishatás-elemzésre és tömeges mintaanalízis esetén (Darvas–Guttman–Dorman 2004).



5. ábra. A D<sub>4</sub>-es dopaminreceptor DRD<sub>4</sub>-gén III. exon 48 bp VNTR gyors genotipizálása mikrochip-elektroforézissel (Barta–Rónai–Nemoda–Székely–Kovács–Sasvári–Székely–Guttman 2001)

Az elektroforézis-mikrochipek amellett, hogy kiválóan használhatók kis mennyiségű biológiai minták analizésére, mikropreparatív célokra is alkal-

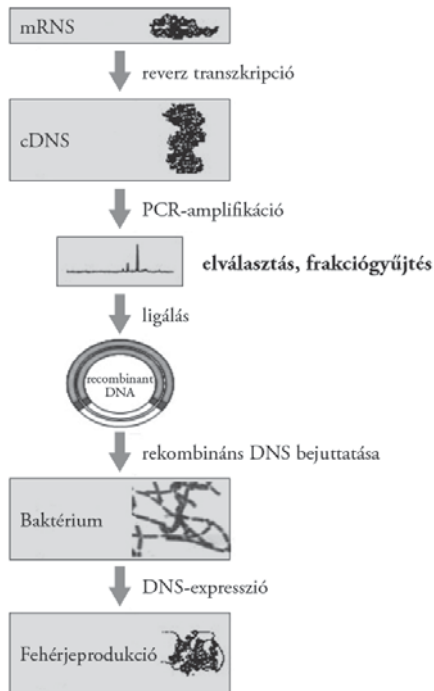
mazhatók. Különösen komplex DNS-minták esetén érdekes ez az elválasztási forma, mivel a polimeráz-lánreakció elterjedése óta gyakorlatilag néhány DNS-molekula is elegendő ahhoz, hogy további szekvenálási vagy klónozási kísérletekhez megfelelő mennyiségű anyagot nyerjünk (Guttman–Fules et al. 2003; Liu–Guttman 2004). Legegyszerűbben a már korábban említett és a 6. ábrán is bemutatott keresztelrendezés használható frakciószedésre (Khandurina–Chovan–Guttman 2002). Ebben az esetben a detektálási lézersugarat pontosan a keresztvezőre irányítjuk, miközben az elválasztási csatornában szétválasztott komponensek egyenként haladnak az elektromos erőter hatására a csatornakeresztveződés és ennek megfelelően a detektálási pont felé.



6. ábra. Preparatív mikrochip-elektroforézis (Khandurina–Chovan–Guttman 2002)

Az első gyűjteni kívánt komponens detektálásakor a keresztveződés egyes végeire adott feszültségeket úgy állítjuk át, hogy az elválasztó csatornában a komponensek lehetőleg ne mozogjanak, ugyanakkor a frakciógyűjtő csatornában a kiválasztott komponens mielőbb elérje a gyűjtődényt. Ezt a műveletet annyszor ismételjük, ahány frakcióra van szükségünk. Külön kihangsúlyozandó, hogy ezzel a módszerrel nemcsak időben, hanem térben is jól elválaszthatók az egymáshoz egyébként közel vándorló mintakomponensek

(Khandurina–Guttman 2002). A vázolt módszer remekül alkalmazható nagyszámú minta klónozása esetén (7. ábra), amikor különösen lényeges az egyes DNS-fragmentumok tisztasága a szintetizálendő fehérje minősége szempontjából (Ronai–Guttman 2000).



7. ábra. Mikrochipalapú klónozás főbb lépései (Ronai–Guttman 2000)

Előadásomat összefoglalva szeretném kihangsúlyozni, hogy a kémiai és a biológiai tudományok rohamos fejlődése új igényeket és ezeknek megfelelő új megoldásokat eredményezett az elektroforetikus elválasztási technikák területén is. Az egyik legújabb módszer gyors analízisek elvégzésére

a mikroelektroforézis, az úgynevezett elektroforézismikrochip-technika (Heller–Guttman 2002). Az elektroforézis-mikrochip lényegében miniatürizált kapilláriselektroforézis-berendezésnek tekinthető, így a már kidolgozott, valamint már részben beállítás alatt álló alkalmazások kiemelkedően széles körűek. A miniatürizálás komoly előrelépést jelent, mivel nemcsak az elválasztás sebessége, hanem annak felbontóképessége is nagyságrendekkel emelkedik. Amennyiben szükséges, kémiai és biokémiai reakcióegységek és elválasztási csatornák integrálhatók egy monolitikus mikrochipre, akár oly módon is, hogy 96 egymástól független rendszer, illetve akár ennek többszöröse (384, 1536 stb.) ráférjen. Ez utóbbi esetben megfelelő folyadékadagoló automata segítségével az összes minta (96, 384, 1536 stb.) egyszerre injektálható. Az eredmények kiértékelése megfelelően gyors és nagy kapacitású számítógép segítségével csupán másodperceket vesz igénybe. Ez a kémiai mikrochipekkel egyszerűen megoldható integráció jelentős idő-, költség- és munkamegtakarítást jelent különösen a rendszerbiológia területén ideértve, a genom-, a proteom- és a metabolomkutatási alkalmazásokat.

## Köszönetnyilvánítás

Előadásom végén szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közvetlenül vagy közvetve hozzájárultak ahhoz, hogy ezt a székfoglalót ma megtarthattam. Elsősorban azoknak a hazai szakembereknek mondanék köszönetet, akik szakmai pályám fejlődésének elősegítésével járultak hozzá eredményeimhez. Középiskolai tanárainmról, Horváth Sándorról és Halász Györgyről való megemlékezés után egyetemi diplomáim témavezetőiről, Pályi Gyuláról és Lengyel Tamásról szeretnék említést tenni. Első munkahelyemen, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Számú Kémiai és Biokémiai Intézetében Staub Mária útmutatásai és Sasvári Mária segítségével meghatározó jelentőségűek voltak későbbi tudományos pályafutásom során. Az elválasztástudomány alap-

jaiba Kalász Huba és Nagy János vezettek be, igazi kutatóvá pedig Magyar Kálmán akadémikus mellett váltam.

Csaknem két évtizede élek az Amerikai Egyesült Államokban, ahová mint posztdoktori ösztöndíjas Benedek Kálmán ajánlásával kerültem ki. Amerikai pályafutásomat Barry L. Karger laboratóriumában kezdtem, aki a mai napig kitüntető figyelemmel kíséri szakmai fejlődésemet. Közvetlenül az Amerikai Egyesült Államokba érkezésem után volt szerencsém megismerni a Yale Egyetemen Horváth Csaba professzort, a modern elválasztástudomány egyik megteremtőjét, a HPLC atyját, aki egészen néhány hónappal ezelőtt bekövetkezett hirtelen haláláig segítette tudományos fejlődésemet. Nagy megtiszteltetés, hogy én vezethetem elsőként a róla elnevezett elválasztástudománnyal foglalkozó intézetet Innsbruckban, a Horváth Institute of Bioseparation Science-t. Külön köszönet illeti Günther Bonnt, aki ezen intézet megalapításában nagy segítséget nyújtott.

Feltétlen köszönettel tartozom Görög Sándor, Pungor Ernő, Kálmán Alajos, Benedek Pál és Hollósi Miklós akadémikusoknak, akik tudományos pályafutásomat évtizedek óta figyelemmel kísérték és segítettek. Hálás köszönetemet fejezem ki Sperling Editnek amerikai kutatási hátterem biztosításáért és Botka Saroltának magyarországi tudományos kapcsolataim ápolásáért. Köszönettel tartozom továbbá Darvas Ferencnek magyarországi utazásaim támogatásáért.

Végezetül az itt ismertetett kísérleti munkában közvetlenül is részt vevő és segítő munkatársaimnak mondok köszönetet, akik nélkül ez az előadás sem születhetett volna meg. Elsőként Magyarországról vendégprofesszorként: Sasvári-Székely Mária, Rónai Zsolt, Takács László, Chován Tibor, illetve akkor még doktoranduszként: Barta Csaba, Szőke Melinda, Csapó Zsolt, Lengyel Tímea, Gerstner Árpád, látogató és hosszabb-rövidebb időt laboratóriumomban töltő kollégáimnak. Természetesen köszönet illeti amerikai munkatársaimat

is: Julia Khandurina, Peter Domaille, Aran Paulus, Robert Nelson, Eugene Berdichevsky, Bart Wanders, Sarah Sandrick, Paul Budworth és Antonius Koller.

## Irodalom

- Barta, C. – Rónai, Z. – Nemoda, Z. – Székely, A. – Kovács, E. – Sasvári-Székely, M. – Guttman, A. 2001. Analysis of the Dopamine D<sub>4</sub> receptor gene polymorphism using microchip electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 924, 285–290.
- Berdichevsky, Y. – Khandurina, J. – Guttman, A. – Lo, Y. H. 2004. UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidics channels. *Sensors and Actuators B* 97, 402–408.
- Chovan, T. – Guttman, A. 2001. Microfabricated reactor technology. *Integrated microfabricated biodevices*. Eds.: Heller, M. – Guttman, A. New York, Marcel Dekker, 351–370.
- Chovan, T. – Guttman, A. 2002. Microfabricated devices in biotechnology and chemical processing. *Trends in Biotechnology* 20, 116–122.
- Cohen, A. S. – Najarian, D. R. – Paulus, A. – Guttman, A. – Smith, J. A. – Karger B. L. 1988. Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (24), 9660–9663.
- Darvas, F. – Guttman, A. – Dorman, G. 2004. *Chemical Genomics*. New York, Marcel Dekker.
- Ganzler, K. – Greve, K. S. – Cohen, A. S. – Karger, B. L. – Guttman, A. – Cooke, N. C. 1992. High-performance capillary electrophoresis of SDS-protein complexes using UV-transparent polymer networks. *Analytical Chemistry* 64 (22), 2665–2671.
- Guttman, A. 1996. High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis. *Nature (London)* 380 (6573), 461–462.
- Guttman, A. 2000. Electric field mediated separation of biopolymers on planar glass microchips. *Planar Chromatography*. In: Nyiredy, S. (ed.): Budakalász, Res. Inst. Med. Plans., 47–56.
- Guttman, A. 2001. Integrated microfabricated device technologies in chromatography. *A century of discovery 1900–2000*. In: Gehrke, C. W. – Wixom, R. L. – Bayer, E. (eds): Amsterdam, Elsevier, 200–205.
- Guttman, A. 2003. DNA sequencing: from capillaries to microchips. *Journal of Chromatography Library* 68 (Emerging Technologies in Protein and Genomic Material Analysis), 11–20.
- Guttman, A. – Horvath, J. – Cooke, N. 1993. Influence of temperature on the sieving effect of different polymer matrixes in capillary SDS gel electrophoresis of proteins. *Analytical Chemistry* 65 (3), 199–203.
- Guttman, A. – Khandurina, J. 2003. Microfabricated bioanalytical devices. In: Heftmann, E.: *Chromatography*. Amsterdam, Elsevier, 431–467.
- Guttman, A. – Khandurina, J. – Rónai, Z. – Sasvári-Székely, M. – Guttman, A. 2003. High throughput genotyping by microchip electrophoresis. *Journal of Capillary Electrophoresis* 8, 77–80.

- Guttman, M. – Fules, P. – Guttman, A. 2003. Rapid analysis of site-directed mutagenesis constructs by capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1014, 21–27.
- Heller, M. – Guttman, A. 2002. *Integrated Microfabricated Biodevices*. New York, Marcel Dekker.
- Karger, B. L. – Cohen, A. S. – Guttman, A. 1989. High-performance capillary electrophoresis in the biological sciences. *Journal of Chromatography* 492, 585–614.
- Karger, B. L. – Guttman, A. 2003. Capillary electrophoresis and the human genome project. *Genomic and Proteomic Technology* 3 (3), 12, 14–16.
- Karger, B. L. – Snyder, L. R. – Horváth, Cs. 1973. *An Introduction to Separation Science*. New York, Wiley-Interscience.
- Khandurina, J. – Chovan, T. – Guttman, A. 2002. Micropreparative fraction collection in microfluidic devices. *Analytical Chemistry* 74 (7), 1737–1740.
- Khandurina, J. – Guttman, A. 2002. Bioanalysis in microfluidic devices. *Journal of Chromatography A* 943, 159–183.
- Khandurina, J. – Guttman, A. 2002. Microchip based high throughput screening analysis of combinatorial libraries. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 359–366.
- Khandurina, J. – Guttman, A. 2002. Micromachined capillary cross-connector for high-precision fraction collection. *Journal of Chromatography, A* 979 (1–2), 105–113.
- Khandurina, J. – Guttman, A. 2003. Microscale separation and analysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 7 (5), 595–602.
- Khandurina, J. – Zhu, T. – Guttman, A. 2003. Microchip based HTS analysis of combinatorial libraries. In: Darvas, F. – Guttman, A. – Dorman, G. (eds): *Chemical Genomics*. New York, Marcel Dekker, 101–136.
- Liu, S. – Guttman, A. 2004. Electrophoresis microchips for DNA analysis. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* 23, 422–431.
- Rathore, A. – Guttman, A. 2003. *Electrokinetic Phenomena: Principles and Applications in Analytical Chemistry and Microchip Technology*. New York, Marcel Dekker.
- Rónai, Z. – Guttman, A. 2000 Analytical and micropreparative capillary gel electrophoresis of DNA fragments, *American Laboratory* 32, 28–31.
- Rónai, Z. – Barta, C. – Sasvári-Székely, M. – Guttman, A. 2001. DNA analysis on electrophoretic microchips: effect of operational variables. *Electrophoresis* 22 (2), 294–299.
- Rónai, Z. – Sasvári-Székely, M. – Chován, J. – Guttman, A. 2002. Elektroforetikus mikrocseppek alkalmazása gyors DNS analízisre. *Biokémia* 26, 26–32.







Erdy János  
Bochtovich Ruffözse

Wenzel Gusztáv

Jábiar Gabon  
Nagy János

Terintetes Nagygyűlés! Arany János

Minia felemelő szabályainak 32. §-a egy szót:  
Mindem sijnomon választott tag, a külső kövétel  
lével, osztályába tartozó dolgotat felolvasásával,  
vagy személyes meg nem jelenhetős esetén beüldé  
sével, legfeljebb egy év alatt sörét foglat; külsőben meg  
választása meg nem működően:

Tehetnek esetek, melyekben kivált vidéken la  
kolé gátolhatatlan a határidőt megtartani: de hallga  
tag elvérsni e szabály meg nem tartatását, amlyet  
tesz, mint örves szabályzatunkat erőlköndt terintetes  
át sörétségtelen.  
Judithányba koratit tehát, hogy egyelőre a  
határidőt s sörétfoglalás által meg nem  
határidőket, az 186

Terintkezés...

mindelő szabályainak 32. §-a egy szót: "újra" választott tag, a hűtlősé kivétel szabályába tartozó dolgot felolvasásában, melyes meg nem jelenhetés esetén beüld. felelt egy ératatt szót foglat; hűtlőben meg a meg nem misistoon."

Lehetetű esetek, melyekben hívott vidéken la atoltatnak a határidőt megtartani: de hallgatású a szabály meg nem tartatását, amig mint őrszet szabályzatokat erőlfonud beüld. eketkezésügre figyelmeztetnő J. Aladon ürségtelen.

Judikációba hozakirtek, hogy egyelőre a igt választott s szót foglatás által meg nem ttt <sup>rendis</sup> tagok nevica hírlönyből hűtlőskereset, ar 1861-ig választottak a szabályokra emeltessemet, ar 1861-re pediga titolnoki hivatal oda utasittasich, jövidentiában tartás végett az újdon választottakat, mig szót nem foglatat, a sorozatba fel ne vegye.

jan. 26. 1865.  
Zalaj Mór  
Loyay János  
Hollán Ernő

853  
1865

Kemény Sigmund  
Wintner Lissly  
Jolly Frank stg  
Geyer Antal

