

Zárójelentés NF 69262 OTKA pályázat

Dr. Gyurcsányi E. Róbert

A pályázat elsődleges célkitűzése a szilárdtest nanopórusok új analitikai alkalmazásainak vizsgálata volt, amely a következő lényegi elemekből állt:

- az egy- és többcsatornás nanopórusos membránok előállítása különböző módszerekkel,
- új szintetikus receptorok fejlesztése,
- nanopórusok kémiai módosítása receptor molekulákkal,
- kémialag módosított nanopórusok analitikai alkalmazása,
- különböző elektrokémiai és optikai detektorok fejlesztése, amelyek alkalmasak a póruson keresztüli ionfluxusok mérésére,
- új érzékelési módok felfedezése és ezek elméleti értelmezése.

Emellett, célkitűzés volt, az NF OTKA pályázatok elvárásainak megfelelően, egy tudományos kutatócsoport, szellemi műhely kialakítása a nanopórusos érzékelés és tágabb értelemben a kémiai és bioszenzorok területén, amely nemzetközi szinten verseny- és pályázatképes. A zárójelentésben a tudományos eredmények mellett ezeket az aspektusokat is röviden ismertetjük.

A kutatási stratégiánk követte a kutatási tervet. A kutatási tervnek megfelelően feltérképeztük a nanopórusos érzékelés biztosította lehetőségeket és ezek alapján olyan érdekes felfedezéseket is tettünk, amelyek előre nem voltak láthatók. Ezeket a felfedezéseket igyekeztünk értelemszerűen kiaknázni és így a futamidő hosszabbításokkal együtt a lezárt kutatás nagyobb területet fed le, mint ahogy az eredetileg tervezve volt. A kutatás során figyelembe vettük ezen a rendkívül kompetitív területen más csoportok által elért eredményeket és ez alapján hangoltuk a prioritási sorrendet.

Nem történt eltérés a tervezettől a résztvevő szenior kutatók (Dr. Fürjes Péter, Dr. Mészáros Tamás) és a doktorandusz hallgatók személyében. Nagy hangsúlyt fektettünk viszont további BSc, MSc, illetve további doktorandusz hallgatók bevonására a kutatásba. A pályázat időtartama alatt közvetlen témavezetéssel 18 szakdolgozat, diplomamunka és TDK dolgozat, illetve 1 PhD értékezés született. További 3 doktori eljárás van jelenleg elindítva.

A beszerzett eszközök esetében voltak eltérések a tervezetthez képest, ami az előzetesen tervezett műszerek mellett további műszerek beszerzését jelentette. Ezekre minden esetben alapos indoklás után, a rendelkezésre álló kereten belül, átcsoportosítási engedélyt kértünk és kaptunk a Kollégiumtól. Az eltéréseket a kutatási munka hatékonyságának növelése indokolta, így a tervezett egy nagyérzékenységű elektrokémiai munkaállomás helyett Csoportunk jelentős bővülése két ilyen műszer beszerzését indokolta. Emellett a korábban nem betervezett mikroceppentő rendszer segítségével a bioreceptorok kötődési tulajdonságainak meghatározásában rendkívüli hatékonyság növekedést.

A tudománymetrikus mutatókat tekintve az OTKA NF pályázat támogatásával az elmúlt öt év alatt 1 könyvfejezet és 28 cikk született, amelyek összesített impakt faktorja 134,3. A pályázat témakörében 20 előadást tartottunk és 21 poszttert mutattunk be nemzetközi konferenciákon. Legjelentősebb eredményeinket a nanotudomány, anyagtudomány és analitikai kémia legrangosabb folyóirataiban közzeltük (Nano Letters (13,198¹), Angewante Chemie (13,455), Advanced Materials (13,877), Advanced Functional Materials (10,179), Chemical Communications (6,169), Analytical Chemistry (5,856), FASEB J (5,712), stb.).

A kutatási eredmények kedvező fogadtatását bizonyítja, hogy a peptid-nukleinsavakkal módosított nanopórusok kvantitatív DNS meghatározására kidolgozott módszerünkről a Nature Nanotechnology a Research Highlights² rovatában közzölt recenziót. Emellett több cikkünkről született recenzió, választották VIP cikknek vagy került a folyóirat fedőlapjára.

¹ 2011 ISI JCR Report szerint

² <http://www.nature.com/nnano/reshigh/2007/0507/full/nnano.2007.177.html>

1. Nanopórusok előállítása

A nanopórusos érzékelés lényege, hogy a nanopórusoknak rendkívül kicsi a belső térfogatuk és ezért a nanopórusokba bejutó komponensek, általában makromolekulák hatékonyan megváltoztathatják a nanopórus belsejének fizikai-kémiai tulajdonságát, pl. a törésmutatóját vagy vezetőképességet. Ennek alapfeltétele, hogy a detektálandó komponens és a nanopórus hasonló mérettartományban legyen és a célvegyület bejusson a pórus érzékelési terébe. Az érzékelés során legtöbb esetben a nanopórusos membrán két oldatot választ el egymástól és általánosságban megfelelő marker ionok átjárhatóságának változásán keresztül detektáljuk a pórusba tartózkodó célkomponenst. A jelváltozás mindenképpen függ a célkomponens tulajdonságaitól, pl. méret, töltés, polaritás, de a szelektivitás biztosításának leghatékonyabb módja a pórus szelektív receptorokkal való módosítása. A detektálás érzékenysége nemcsak a pórus méretétől, hanem annak geometriájától (pl. hengeres vagy kónikus) és felületi funkcionalitásától is nagymértékben függ. Ennek megfelelően a nanopórusok előállításakor a pórus geometriáját és méretét az adott célvegyületre optimálni kell, illetve olyan eljárások kidolgozása szükséges, amely az összes érdemi variációt biztosítani tudja.

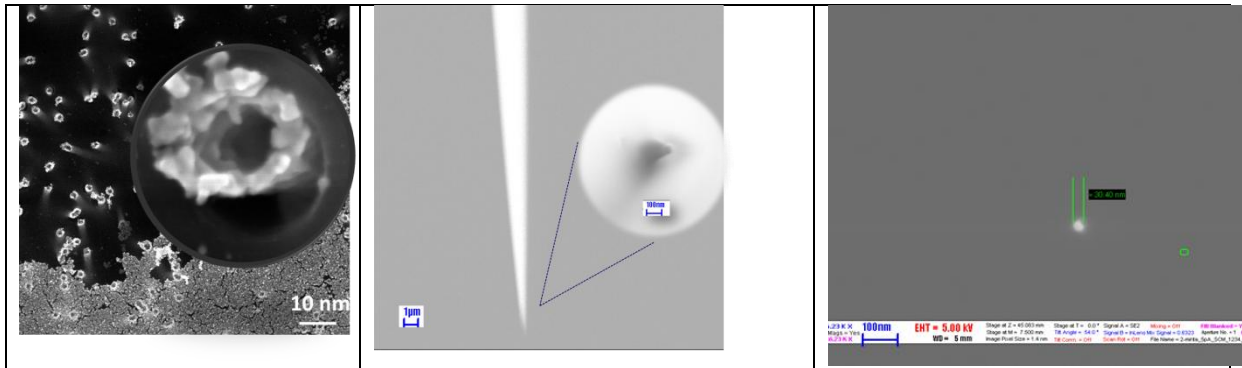
Három különböző nanopórusos platformot állítottunk elő és alkalmaztunk érzékelésre: véletlen elrendezésű, nagy pórus sűrűségű arany nanopórusos membránokat, kvarc nanopipettákat, illetve fókuszált ionnyaláb marással készült egy- és több pórusú membránokat (1. ábra). Az utóbbi nanopórusokat a Természettudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetével (MTA TTK MFA) szoros együttműködésben fejlesztettük ki Dr. Fürjes Péterrel, a pályázatban résztvevő szenior kutatóval. A különböző platformok alkalmazásával biztosítani tudtuk kb. 5 nm és 2 mikrométer között gyakorlatilag bármilyen átmérőjű nanopórust előállítását, változatos geometria és pórusűrűség mellett.

A *kvarc nanopipettákat* mikroprocesszor kontrollált lézeres kapilláris húzóval készítettük, amely módszer lehetőséget nyújtott egy-nanopórusos platformok rendkívül költséghatékony és gyors előállítására. A nanopipetták gyakorlati alkalmazása törékenyséjük miatt nehézkes és ez vonatkozik további kémiai módosításukra is. Ezért volt szükség a nagy pórusűrűségű arany nanopórusos membránok előállítására és a végalkalmazást szemel előtt tartva, a konvencionális szilícium alapú 3D MEMS (mikro-elektromechanikai rendszerek) technológia, illetve nanofabrikációs eljárások ötvözésével kontrollált geometriájú nanopórusok kialakítására. Ugyanakkor a nanopipetták kiváló eszköznek bizonyultak rektifikálási és számlálási jelenségek értelmezésére.^{3,4}

Az *arany nanopórusos membránokat* kereskedelmi forgalomba található nyommaratott polikarbonát membránok elektródnélküli arannyal való bevonásával állítottuk elő. A nyommaratott membránok monodiszperz pórusai jó megközelítéssel szabályos henger alakúak. Ezek a membránok az eredeti ultrafiltrációs alkalmazásukból kifolyólag nagy, akár 6×10^8 pórus/cm² pórusűrűséggel rendelkeznek. Az aranyréteget egy többlépéses, általunk optimált eljárással, nagyon kis sebességgel (tipikusan kb. 10 nm/óra) választottuk le. A nyommaratott nanopórusok nominális kiindulási átmérőjének (10, 30, 50, 80, 100 és 200 nm) és az arany leválasztási időtartamának megválasztásával a pórusok effektív átmérőjét gyakorlatilag tetszőleges értékre tudtuk beállítani, amit gáz permeációs eljárással a Knudsen összefüggés alapján határoztunk meg. Az arany bevonat szükségességét az indokolta, hogy a vastagságával pontosan be tudtuk állítani az effektív pórusátmérőt másrészt az arany kiváló lehetőséget ad a pórusok kémiai módosítására tiol és diszulfid funkciós csoportokkal rendelkező származékokkal.

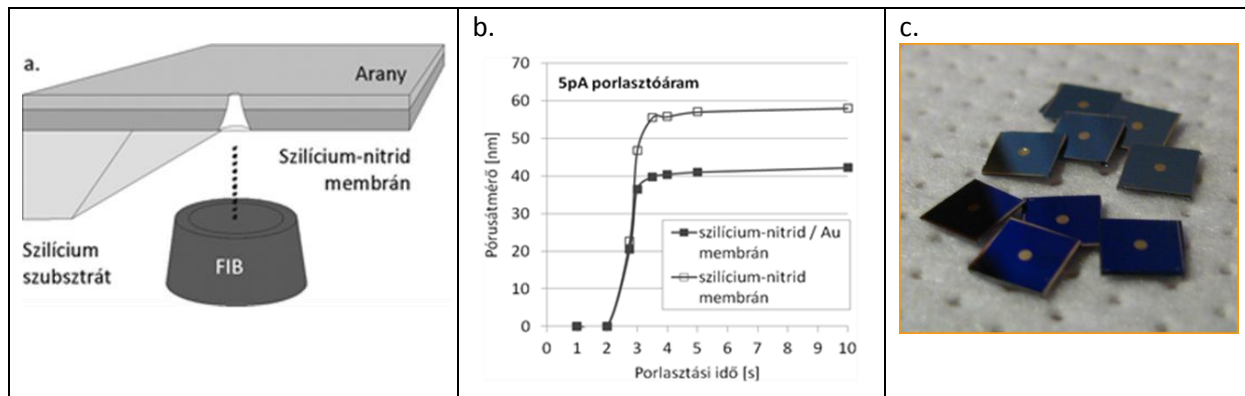
³ Varga Tamás: Nanopipetták gyártása és felületi módosítása (2009, Diplomamunka)

⁴ Fazekas Lilla: Nanopórusok fejlesztése biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára (2010, Diplomamunka)



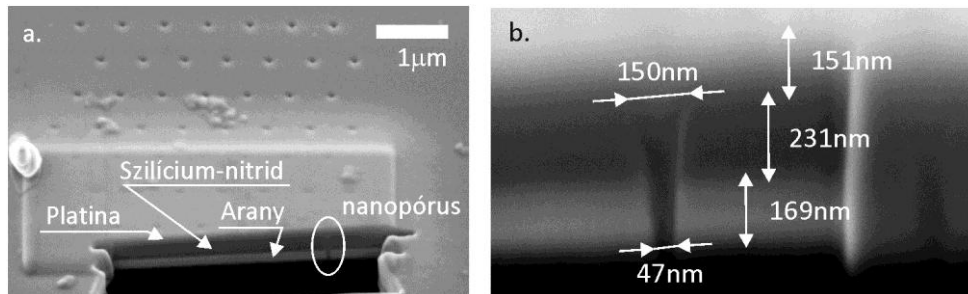
1. ábra Téremissziós pásztázó elektronmikroszkópiás felvételek: (A) nyommaratott polikarbonát membránok felületére elektródnélküli arany leválasztással előállított arany nanopórus membrán. Az ábra felső részén a külső arany membránt eltávolítottuk, hogy jobban látszódjanak a nyommaratott membrán pórusaiba leválasztott arany nanopórusok/nancsövek (beillesztve egy arany nanocső felnagyított képe), (B) kvarc nanopipetta hegye és ennek nagyított képe, (C) 3D MEMS technológia és a fókuszált ionsugár marással készült arany nanopórus ($\phi=30$ nm)

A 3D MEMS technológia és a fókuszált ionnyaláb marás (FIB- Focused Ion Beam) ötvözésével készült pórusok esetében az előállítást a szilícium tömbi megmunkálásával kezdtük az MFA MEMS laboratóriumában. A FIB maráshoz először egy öntartó, kis mechanikai feszültségű membránt kellett előállítani, figyelemmel tartva a hosszú távú stabilitás érdekében a rétegszerkezetben kialakuló deformáció, illetve maximális maradó feszültség csökkentését. Ennek érdekében a rétegszerkezetet LP-CVD (alacsony nyomású kémiai gőzfázisú leválasztás) technikával leválasztott nem-sztöchiometrikus szilícium-nitrid (SiN_x) réteg alkotta. A pórusok biokémiai módosíthatóságának biztosítása érdekében a tartómembránok egy kiegészítő (vákuumgőzöléssel kialakított) arany bevonatot kaptak. Az alap membrán kialakítását a szilícium hordozó egyoldali anizotrop marásával oldhattuk meg, amelyre sikeresen alkalmaztuk az alkáli lúgos marást, illetve a Mély Reaktív Ionmarást (DRIE – Deep Reactive Ion Etching). A kialakított néhány száz nanométer vastagságú membránban a nanopórusokat fókuszált ionsugár (FIB) segítségével martuk ki, amelynek során gyorsított és fókuszált gallium ionok porlasztják a membránszerkezetet alkotó atomokat. Megbízható technológiát dolgoztunk ki a szigorúan kontrollált pórusgeometria kialakítása érdekében. Ennek megfelelően vizsgáltuk az adott ionáram esetén kialakuló időfüggő pórusátmérőt, illetve módszert dolgoztunk ki a marási folyamat *in-situ* követésére és kontrollálására. A technológiai megvalósítást, a fabrikált nanopórusos érzékelőket, illetve a pórusátmérő adott porlasztóáramnál tapasztalt időbeli változását a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra (a) 3D MEMS technológiával kialakított hordozó membrán fókuszált ionsugár marásának sematikus ábrája, (b) az adott ionáramnál tapasztalt időfüggő pórusátmérők, illetve (c) a fabrikált nanopórusos érzékelők fényképe.

A nanopórusok biokémiai érzékelésre történő alkalmazása esetén kritikus jelentőséggel bír az adott molekulára vonatkozó kimutatási érzékenység. Tapasztalataink szerint ez mind a póruszámtól, mind az elektrokémiai jellemzőket is molekuláris szinten befolyásoló pórusgeometriától függ. A kontrollált pórusszám, elhelyezkedés és geometria érdekében dolgoztunk ki automatizált – gyakorlatilag CNC (Computer Numerical Control) – vezérelt „nanofúrás” technológiát. Az így kialakított nanopórus hálózatot és a keresztmetszeti geometriát szemlélteti a 3. ábra.



3. ábra A kialakított nanopórus membrán keresztmetszeti szerkezete (fókuszált ionnyalábbal átvágva – a Pt réteg ebben az esetben csak a vágás miatt kerül a felületre)

2. Új szintetikus receptorok előállítása

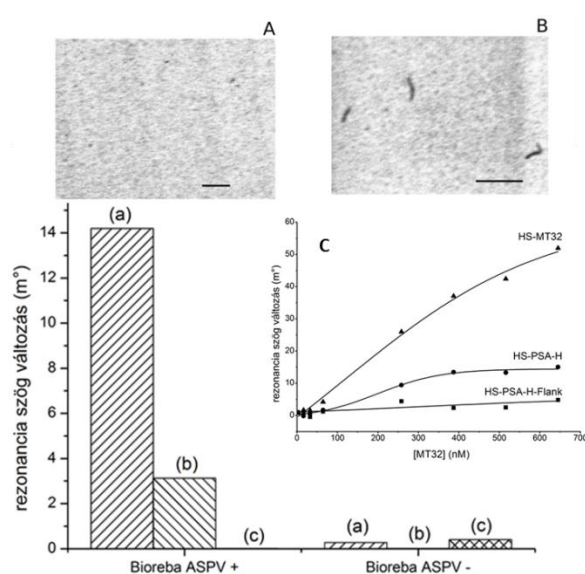
2.1 Aptamerek fejlesztése

A pályázat egyik lényeges célkitűzését az originális aptamerekkel módosított nanopórusok fejlesztése képezte. Az aptamerek olyan rövid DNS vagy RNS szálak, amelyek térbeli szerkezetüknek köszönhetően, nem kovalens jellegű kölcsönhatásokon keresztül egy adott célvegyület szelektív felismerésére, megkötésére alkalmasak. Egy adott molekulát nagy affinitással kötő aptamer azonosítása *in vitro* szelekcióval történik (SELEX- Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) tipikusan 10^{13} - 10^{15} véletlenszerű szekvenciájú oligonukleotid könyvtárból. Az aptamerek kiaknázatlan analitikai potenciálja miatt döntöttünk úgy, hogy a pályázat részét fogja képezni az originális aptamerek szelekciója és analitikai jellemzése. Ezt a munkát Dr. Mészáros Tamással (Simmelweis Egyetem) szoros együttműködésben végeztük. Az Ő csoportja szelektálta az aptamereket és a mi feladatunk volt ezek kötődési tulajdonságainak meghatározása, illetve analitikai alkalmazásuk. Az aptamer fejlesztés területén az alapoktól kellett elinduljunk (az országban ennek legjobb tudomásunk szerint semmi előzménye nem volt) és közel három éves munka után jelent meg az első közleményünk. Ehhez hozzájárult, hogy kiváló szelektivitást csak rendkívül tiszta célvegyület készítményekkel lehet elérni és ez a fehérjék esetében szükségessé tette ezek szintézisét, amit szintén meg kellett oldani. Kísérleteink kiderítették, hogy DNS aptamereket nem annyira a kis molekulatömegű Ochratoxin A-ra érdemes előállítani, amint azt terveztük, hanem makromolekulákra. Míg az első esetben a megfelelő szelektivitás biztosítása nehézkes, addig a proteinek esetében akár az antitesteknél is jobb teljesítményparaméterrel rendelkező aptamereket sikerült előállítani.

2.1.1. Aptamerek növényi vírusok meghatározására

Modellként egy növényi patogén vírust, az alma törzsgöndörödés vírust (Apple Stem Pitting Virus – ASPV) választottuk, amely detektálásának gyakorlati jelentősége van. (Lautner et al., 2010) Ennek megfelelően DNS könyvtárból *in-vitro* szelekcióval olyan aptamereket sikerült kinyerni, amely növényi vírusok (almavírus) burokfehérjéinek akár közeli homológjait (PSA-H, MT32) is szelektíven fel tudják ismerni. Ez annak is köszönhető, hogy az antitestek előállításától eltérően az aptamereknél előzetes kontra-szelekcióval ki lehet zárni azokat a szekvenciákat, amelyek a már ismert interferensekhez kötődnek. Az OTKA támogatásával beszerzett mikroceppező rendszer és a

rendelkezésünkre álló nagy áteresztőképességű képpalkotó SPR segítségével sikerült a különböző aptamer szálak kötődési kinetikájának meghatározását, illetve felületi immobilizálásának átfogó vizsgálatát elvégezni. A szelektált originális aptamerek érdekessége, hogy a burokfehérjét minden formájában felismerik („szabad”, vírusban integrált és denaturált fehérje), illetve különböző aptamer szálak használatával meg lehet különböztetni a vírus fragmenseket a „szabad” burokfehérjétől. Ugyancsak meglepő tapasztalat volt, hogy az aptamerek szelektivitását az általunk alkalmazott immobilizációs eljárások esetében az is befolyásolta, hogy csak a 40 bázisos véletlen szekvencia részét alkalmazzuk vagy a szelekció során használt primerekkel közrefogott 80 bázisos szekvenciát. Hasonló jelenségre eddig még nem történt utalás. Kidolgoztunk egy belső referencián alapuló differenciális detektálási módszert, amelynek segítségével a növényi vírust valós növényi mintákból ki tudtuk mutatni (4. ábra). A specifikus aptamerrel módosított felületen megfelelő preparálás után elektronmikroszkóppal is sikerült a bekötődött vírus fragmensek kimutatni, míg a referencia felületeken hasonló kötődést nem tapasztaltunk. Eredményeinket az Analyst folyóiratba publikáltuk. (1) Cikkünket az Analyst címlapjára választották és az RSC Highlights in Chemical Technology recenziót közölt róla (Biochip detects apple virus, 2010.02.18).⁵



4. ábra Fertőzött és a nem fertőzött növényi kivonatokban kapott válaszjelek különböző aptamerek esetében: (a) MT32, (b) HS-PSA-H, (c) HS-PSA-H-Flank aptamerek. (A) Aptamer nélküli referencia felület és (B) HS-MT32 aptamer módosított felület pásztázó elektronmikroszkópiás felvétele ASPV fertőzött növényi kivonattal történő inkubálást követően (a méretvonalak 500 nm-esek). (C) Kalibrációs görbék MT32 burokfehérjére három különböző aptamer esetében.

További összehasonlító vizsgálatok kiderítették, hogy az általunk bevezetett aptamerek jelentősen érzékenyebb detektálást tettek lehetővé, mint kereskedelemben található ASPV fehérje és jó szelektivitással rendelkeztek egyéb almát fertőző vírusokkal szemben. Eredményeinket FASEB J folyóiratba közzétettük. (2)

Az aptamer-protein kölcsönhatások meghatározására bevezettük az ALPHA (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) módszert (3). Az eljárás során egy 250 nm átmérőjű, reagenssel bevont polisztirol donor- és akceptor mikrogyöngy párost alkalmazunk, amelyek a felületükre immobilizált biomolekulák (aptamer és célfehérje) kölcsönhatása következtében egymáshoz közel kerülnek. Nagy intenzitású, 680 nm hullámhosszúságú lézertény hatására a donor gyöngy felületén található fényérzékenyítő ftalocianin származék közreműködésével a környezeti oxigén molekulákból gerjesztett állapotú, szingulett oxigén molekulák jönnek létre. Ezek a szingulett oxigén molekulák élettartamuk alatt akár 200 nm-t is megtehetnek diffúzióval az oldatban. Ha ezalatt az idő alatt találkoznak egy akceptor gyönggyel, reagálnak az abban található oxatiin származékkal,

⁵ http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2010/03/biochip_detects.asp

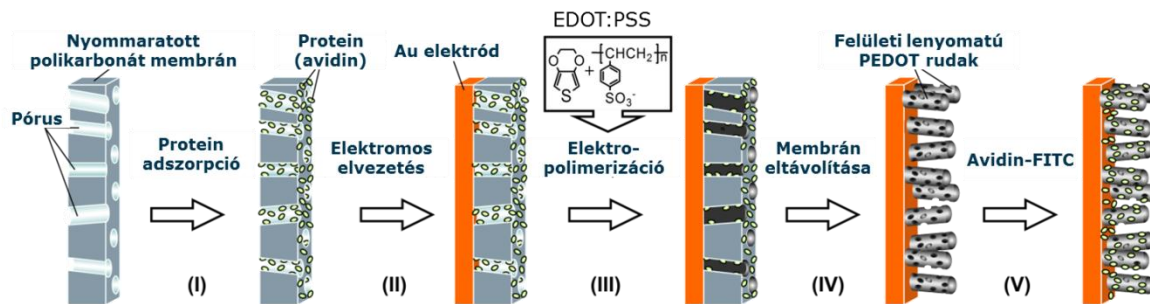
miközben 370 nm-es kemilumineszcencia jön létre, ami aktiválja a szintén az akceptor gyöngyben található fluorofórt (antracén származékok) 520-620 nm hullámhosszúságú fény kibocsátásával. A módszer több lényeges előnnyel rendelkezik: egyrészt homogén módszer, azaz nincs szükség elválasztási/mosási lépésekre, rendkívül érzékeny az időfelbontásos jellegéből eredendően és azáltal hogy a detektálási hullámhossz kisebb, mint a gerjesztő komplex mintákban biztosítja a háttér fluoreszcencia minimalizálását. Ezzel a módszerrel sikerült visszaigazolni a korábban felületi plazmonrezonanciával meghatározott aptamer-MT 32 fehérje komplex disszociációs állandóját ($5,3 \pm 3,9$ nM (ALPHA) és 8 nM (SPR)) és bevezetésével várhatóan nagy mértékben fog nőni az aptamerek szelekciójának hatékonysága. Eredményeinket az *Analyst* folyóiratba közöltük (3).

2.1.2. Aptamerek Troponin I szelektív meghatározására

A pályázat célkitűzésének megfelelően (troponin aptamerek előállítás), a vázizom specifikus troponin I és a szívizom specifikus troponin I3 fehérjéket a megfelelő humán cDNS könyvtárakból amplifikáltuk, és az ily módon nyert DNS fragmentumokat ligálás független klónozással a transzlációs vektorunkba inszertáltuk. Ezt követően, a specifikus aptamerek szelekciójához szükséges troponin I3 fehérjéket *in vitro* transzlációval állítottuk elő. A szelekció során kontraszelektáltunk a vázizom specifikus troponin I3 fehérjére. A szelekció során kapott aptamerek az elvárásnak megfelelően kötődtek a Troponin I fehérjéhez, de nem mutattak megfelelő szelektivitást a szívizom specifikus troponin I3 fehérjére a vázizom specifikus troponin I3 ellenében.

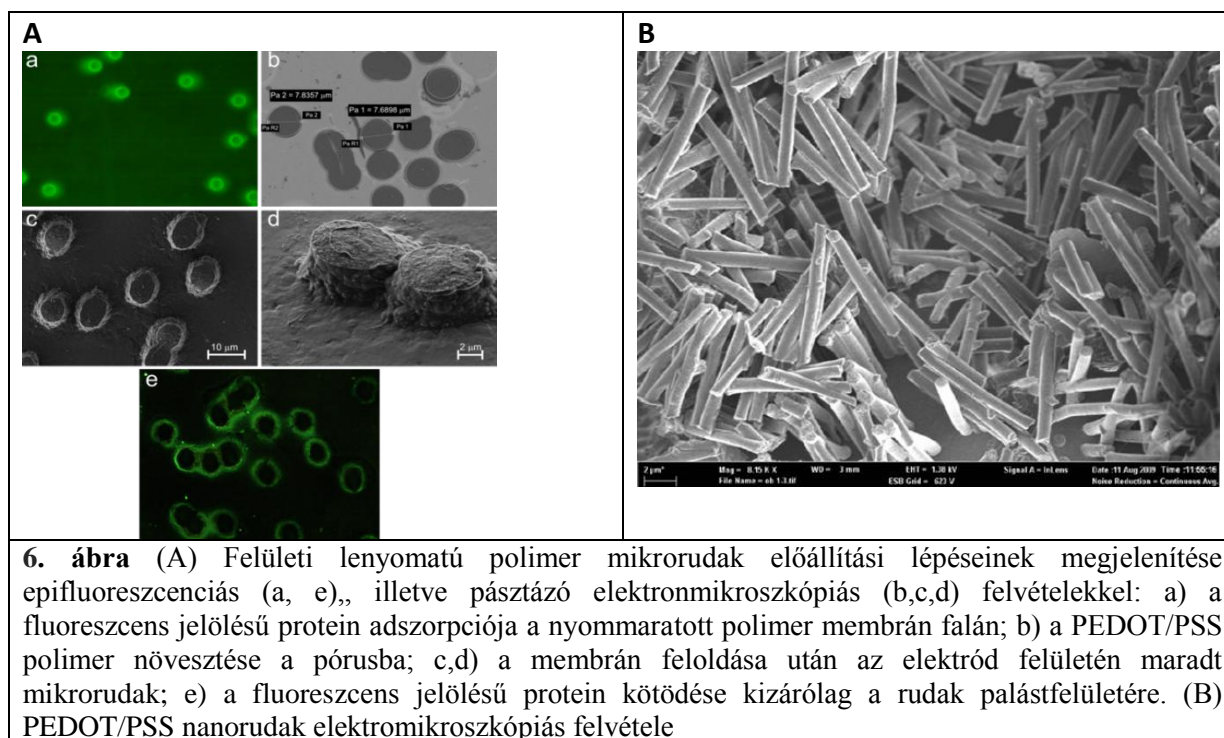
2.2. Pórusok alkalmazása mikro- és nanoreaktorként szelektív molekuláris felismerésre alkalmas polimerek előállítására

Kémialag módosított pórusok egy új alkalmazását vezettük be, amelynek során a pórusokat kémiai reaktorként használva felületi molekuláris lenyomatú polimer mikro- és nanorudakat állítottunk elő. A pórusok belső falának fehérje molekulákkal való módosítása lehetőséget nyújtott fehérjék szelektív felismerésére alkalmas kötőhelyek kialakítására a pórusokban növesztett polimerek felületén (4). Ezek a kötőhelyek molekuláris lenyomat képzéssel készültek, amely során leggyakrabban a funkcionális monomereket egy sablon (templát) molekula jelenlétében polimerizálják. A monomerek nem-kovalens kölcsönhatások kialakulásával előrendeződnek a templát molekula körül, amely rendeződést a polimerizáció rögzíti. Így a templát eltávolítása után a polimerből, térben és funkcionalitásban komplementer molekuláris lenyomatok maradnak a polimerben, amelyek képesek a templát molekulát szelektíven kötni. Ez az általános módszer, amely kis molekula tömegű komponensek esetén rendkívül sikeresnek bizonyult a makromolekulák esetében nem alkalmazható, mert a polimerizáció során a méretükből kifolyólag a makromolekulák bezáródnak a keresztkötött polimer szerkezetében és csereegyensúlyuk a mintaoldattal gátolt. Ezt a problémát oldottuk meg az általunk bevezetett eljárással, amely lehetőséget adott szabályos henger alakú mikro- és nanopórusos reaktorok segítségével a fehérjék lenyomatának kizárólag a polimer mikro és nanoszerkezetek felületén való kialakítására (5. ábra). Az eljárás során a nyommaratott polikarbonát nanopórusos membrán felszínére fizikai adszorpcióval rögzítettük a meghatározandó proteint. Modellfehérjeként avidint használtunk, amely kvarckristály mikromérleges vizsgálataink alapján $8,8 \text{ pmol/cm}^2$ felületi borítottságot biztosít a polikarbonáton, ami gyakorlatilag a kompakt monomolekuláris rétegnek felel meg. Ezután egy elektródfelületre csatlakoztatva a nyommaratott membránt, elektroszintézissel PEDOT/PSS polimer rudakat növesztettünk a pórusokba. A PEDOT/PSS vezető polimer, így a polimer rudakat a membrán $6 \mu\text{m}$ vastagságáig lehetett növelni, hogy a pórusokat kitöltsék (6. ábra). Hasonló vezető polimereket korábban sikeresen alkalmaztunk aminosavak enantioszelektív felismerésére is (5). Mikropórusok esetében a membrán feloldása után a visszamaradt polimer rudak a felületen maradtak, nanopórusok esetében viszont oldatfázisba kerültek.



5. ábra Felületi lenyomatú polimerok előállítása proteinek szelektív felismerésére fehérje módosított mikro- és nanopórusok alkalmazásával

A fehérje visszakötődést fluoreszcens jelölésű avidinnal (Avidin-FITC) ellenőriztük. A kidolgozott eljárás rendkívül sikeresnek bizonyult mert a felületi lenyomatú mikrorudak jó affinitással kötötték a lenyomatnak alkalmazott modell proteint (avidint) (6. ábra). Molekuláris lenyomat nélkül, az alkalmazott polimer anyagán (PEDOT/PSS) a protein adszorpció rendkívül kismértékű.

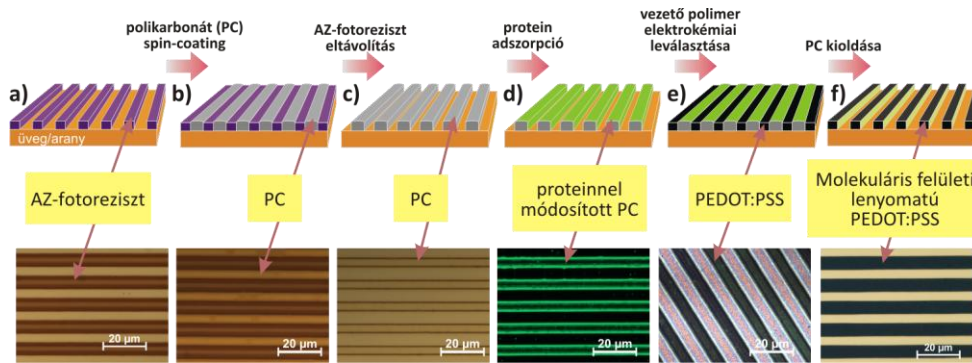


6. ábra (A) Felületi lenyomatú polimer mikrorudak előállítási lépéseinek megjelenítése epifluoreszcenciás (a, e), illetve pásztázó elektronmikroszkópiás (b,c,d) felvételekkel: a) a fluoreszcens jelölésű protein adszorpciója a nyommaratott polimer membrán falán; b) a PEDOT/PSS polimer növesztése a pórusba; c,d) a membrán feloldása után az elektród felületén maradt mikrorudak; e) a fluoreszcens jelölésű protein kötődése kizárólag a rudak palástfelületére. (B) PEDOT/PSS nanorudak elektromikroszkópiás felvétele

Az eredményekről beszámoló közlemény az Advanced Materials (ADMA) folyóiratban jelent meg (4) rendkívül pozitív visszajelzéssel. A folyóirat VIP cikkek választotta és külön recenziót jelentetett meg a Material Views kiadványban⁶, amely a legfontosabb anyagtudományi eredményeket megjelentető fórum.

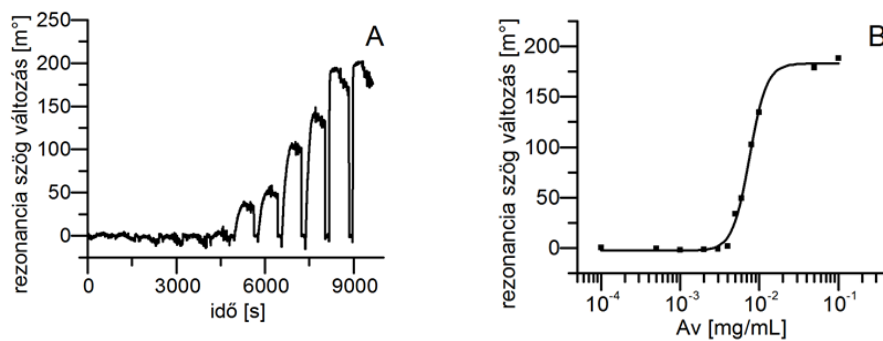
A továbbiakban az elvet megtartva olyan előállítási módszert dolgoztunk ki, amely integrált áramkör gyártási technológiákkal kompatibilis és lehetővé teszi ezen polimerok nagy sorozatú gyártását közvetlenül egy felületi plazmonrezonanciás chip felületére (6). Az előállítás folyamatát a 7 ábra szemlélteti.

⁶<http://www.materialsviews.com/details/news/567373/Selective-Protein-Recognition-by-Polymer-Microrods.html>



7. ábra A molekuláris lenyomatú polimer mikrobarázdák létrehozása során a felületi lenyomatképzés folyamatának sematikus ábrája (a-f, felül), és a megfelelő mikrostruktúrák optikai mikroszkópos képei (a-c, e,f, alul). A (d) ábrán a PC mikrobarázdákon a protein adszorpciót fluoreszcensen jelölt proteinnel (avidin-fluoreszcein izotiocianát – Av-FITC) és epifluoreszcens képalkotással jelenítettük meg.

A fotolitográfias eljárás további előnye, hogy lehetőséget ad az előállított felületi lenyomatú polimerek kötődési tulajdonságainak gyors jelölés nélküli vizsgálatára (8. ábra)



8. ábra (A) A felületi lenyomatú polimer réteg SPR válaszele különböző avidin koncentrációk esetén, az egyes koncentrációk között regenerálva a felületet és (B) a válaszgörbéből szerkesztett kalibrációs görbe

Eredményeinket az Advanced Functional Materials folyóiratban közzeltük (6).

Jelenleg folyamatban van a nanogömb lenyomatú nanokavitások kialakítása protein felismerésre. Az előzetes eredményeinkről nemzetközi konferencián számoltunk be.⁷ Kidolgoztuk a felületi lenyomatú polimer nanorudak szintézisét is, amely lehetővé tenné a szintetikus receptorok oldatban való alkalmazását (6. B ábra). Ezek a nanorudak méretükből eredendően nehezen kezelhetők, mert a nanopórus membrán feloldása után a nanorészecskéket az oldatból kell kinyerni, azaz nem maradnak az elektród felületén mint a mikrorudak. Ennek a problémának a megoldására olyan speciális mágneses nanorészecskével adalékoltuk a polimer rudakat, amelyek felületén negatív töltésű PSS bevonat található. A nanorészecskéket a monomer oldathoz adtuk és a polimerizálás során a PEDOT pozitív töltését kompenzálva kerülnek a nanorudak belsejébe. Így a nanorudak mágneses térben manipulálhatóak, elválaszthatóak az oldattól.

⁷ Júlia Bognár J, Gergely Lautner, Giorgio Ceolin, Vitali Syritski, Viola Horváth, Róbert E. Gyurcsányi: Towards Surface-Imprinted Nanostructures for Selective Protein Recognition Mátrafüred11 International Conference on Electrochemical Sensors, June 19-24, 2011, Dobogókő, Hungary

3. Nanopórusos érzékelők és alkalmazásuk

3.1. Peptid-nukleinsavval módosított arany nanopórusok és alkalmazásuk DNS meghatározásra

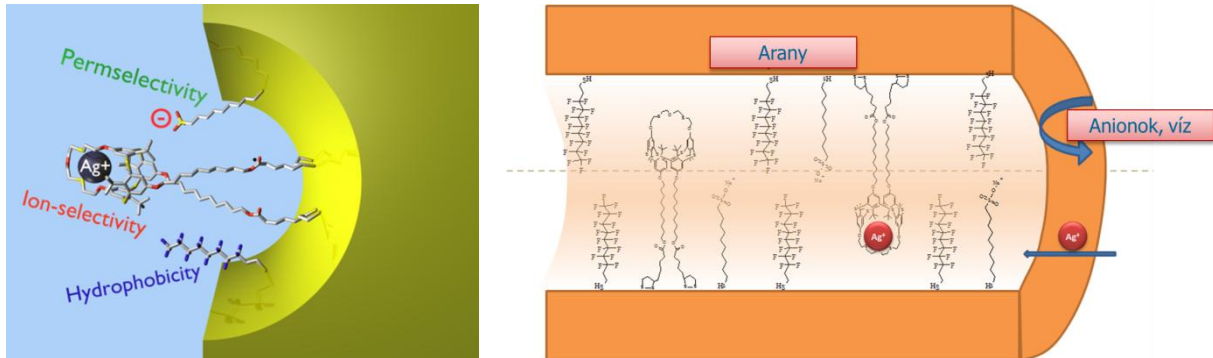
DNS meghatározás céljából olyan nanopórusos érzékelésen alapuló eljárást dolgoztunk ki (7), amely arra a hipotézisre épült, hogy amennyiben egy töltéssel nem rendelkező receptort immobilizálunk a nanopórus belsejében akkor a DNS szelektív bekötődése negatív töltést generál a nanopórusban és ez hatékonyan modulálja a pórus permeabilitását. A szelektív meghatározásra peptid-nukleinsavat (PNS) alkalmaztunk, amelynél a dezoxiribózfoszfát váz helyett a nukleotidok „semleges töltésű” poli[N-(2-aminoetil)glicin] peptid láncon helyezkednek el. A PNS-ek a DNS-ekkel gyakorlatilag azonos módon hibridizálódnak komplementer szekvenciájú DNS szálakkal. Emellett jelentős előnyökkel rendelkeznek, pl. a keletkezett duplex már jóval rövidebb (akár 10 bázisú) PNS láncok esetében is stabil szobahőmérsékleten, illetve a PNS-DNS közötti kölcsönhatást gyakorlatilag nem befolyásolja az ionerősség. A PNS szintézis során egy terminális cisztein aminosav beiktatásával tiol funkció csoportot generálhatunk, amely Au-S kötés kialakításán keresztül lehetőséget ad PNS láncok orientált immobilizációjára az arany nanopórusokban. Ennek megfelelően valósítottuk meg a többcsatornás arany nanopórusos membránok belső falának módosítását peptid-nukleinsavakkal. Első lépésként a külső membrán felületet mikrokontakt nyomtatással biokompatibilis tiolszármazékkal módosítottuk, hogy a meghatározandó DNS ne kötődjön a nanopórusos membrán külső felületére. Ez a kötődés csökkentené a mintaoldatban a DNS mennyiségét anélkül, hogy bármilyen jelváltozást okozna. Eredményeink alapján a külső felület „passziválásával” kb. 2 nagyságrenddel csökkenthető a kimutatási határ. Ezt követően a pórusok belső falát módosítottuk két egymást követő lépésben PNS-el és merkaptohexanollal. A nanopórusban immobilizált PNS és a mintaoldatból származó DNS hibridizációját a nanopóruson keresztül beállított optikai marker anion fluxusának változása alapján sikerült kimutatni. A nem-komplementer szekvenciájú DNS szálak és akár mg/ml-es koncentrációjú bovin szérum albumin nem adtak választ. Különböző ionerősségek mellett végzett mérések egyértelműen kimutatták, hogy az érzékenység rendkívül megnövelhető kis ionerősségű háttér esetében és, hogy az iontranszport modulációt elsődlegesen a bekötődött DNS szál negatív töltése okozza. Planáris felületeken végzett felületi plazmon rezonanciás (SPR) vizsgálatainkkal összehasonlítva a PNS-el módosított nanopórusok válaszideje hosszabb (20-30 perc vs. 1 perc) viszont az érzékenysége a kísérleti körülményektől függően legalább két nagyságrenddel jobb (100 pM). Ez az általunk alkalmazott mintatérfogatok esetében kb. 30 molekula/pórus kimutatásának felel meg.

Összefoglalva, a PNS módosított nanopórusok a komplementer DNS szálak (30 bázis hosszúig bizonyítottan) jelölés nélküli, szelektív és kvantitatív meghatározására alkalmasak. Eredményeinket 2007-ben a Nano Letters folyóiratba közzeltük (8). További részletek a TrAC Trends in Analytical Chemistry folyóiratban jelentek meg egy összefoglaló cikk keretében (9).

3.2. Szelektív szilárdtest ioncsatornák és analitikai alkalmazásuk

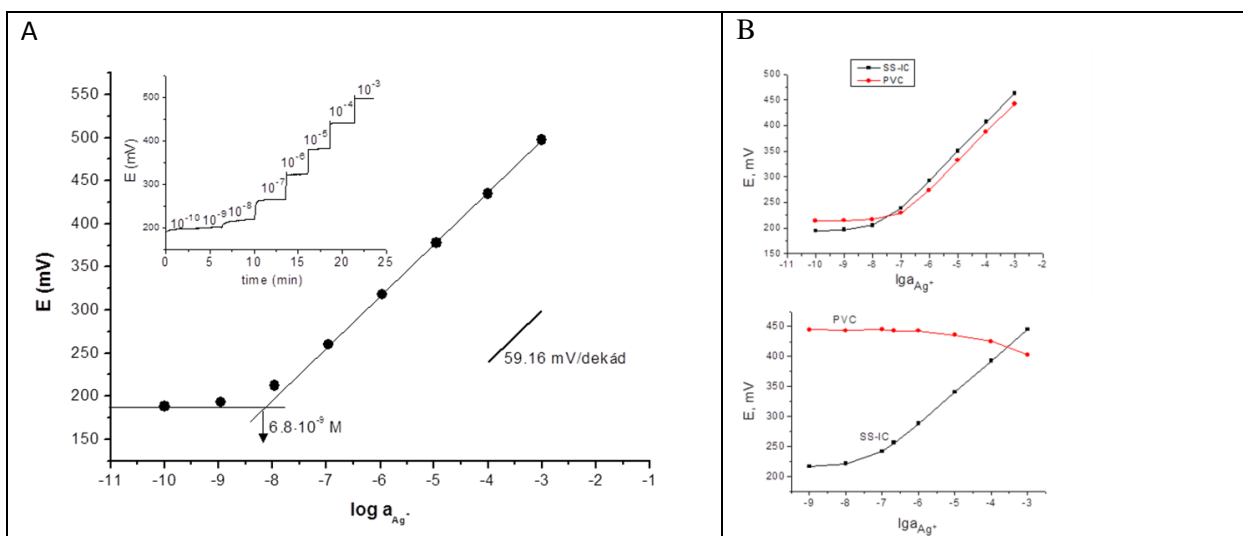
Szilárdtest nanopórusok szelektív ion felismerésre való alkalmazására a biológiai ioncsatornák analógiájára még nem volt példa. Ennek magyarázata, hogy biológiai ioncsatornák esetében a csatornafehéjék szerkezete a szelektív transzportnak megfelelő elrendezésben biztosítja a funkció csoportok jelenlétét a csatornában, amelynek szintetikus kémiai úton történő megvalósítását szilárdtest nanopórusokban a megkívánt molekuláris szintű kontrollal eddig lehetetlennek tartották. Ennek a megoldására az egyedi funkcionalitások kialakítása helyett a nanopórusok szelektív

ionoforokkal/komplekxképzőkkel való módosítását javasoltuk. A polimer alapú ionszelektív membránok analógiájára az ionofor mellett ioncserélőt és hidrofobicitást biztosító komponenseket is immobilizáltunk 6 mikrométer hosszúságú és kb. 4 nm átmérőjű arany nanopórusok belső falára (9. ábra). Ionoforként ditiolán funkcionálissal rendelkező ezüstion tiakalixarén ionofort, kationcserélőként pedig merkaptodecilszulfonsavat alkalmaztunk. A hidrofób jellegét perfluorotiol származékokkal biztosítottuk (10).



9. ábra Szelektív szilárdtest ioncsatornák sematikus ábrája amely az arany nanopórusok permszelektivitást, hidrofobicitást és ionszelektivitást biztosító származékokkal való módosításával állítottunk elő

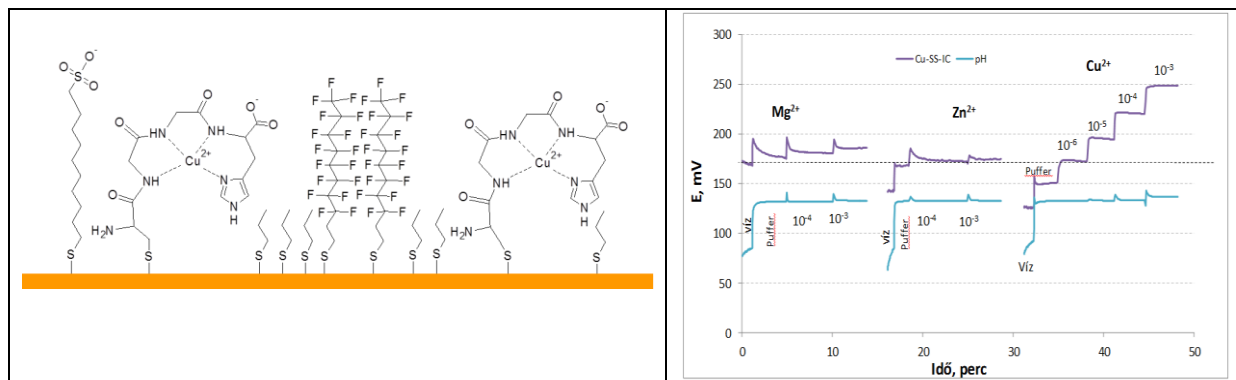
Első lépésben a ditiolán ionofor szelektivitását és a monomolekuláris önrendező rétegek kialakulását Au nanorészecskék módosításán keresztül bizonyítottuk (11). A nanopórust módosító rétegek optimalása után sikerült a csatorna ezüstion szelektivitását potenciometriás úton igazolni, amely a legtöbb tanulmányozott ionra több mint hat nagyságendnyinek adódott. A módosított arany nanopórusokból előállított potenciometriás ezüstion érzékelők nanomólos kimutatási határral rendelkeztek (10. ábra). A nanopórusos ionszenzor egyértelmű előnye a hosszú élettartam és robusztusság, hiszen a kovalens immobilizálással elkerülhető a konvencionális elektródoknál tapasztalt ionofor, lágyító és lipofil ioncserélő kioldódása. Emellett lényeges, hogy a teljesítményük nem csökken lipofil komponensek jelenlétében, amelyek a polimer alapú membránok gyakorlati alkalmazhatóságának egyik legfőbb korlátozó tényezője. Az eredményeinket az Angewandte Chemie folyóiratba közzeltük (12).



10. ábra (A) Ionofor módosított nanopórusokon alapuló érzékelők potenciometriás válasza és kalibrációs görbéje. (B) Összehasonlító mérések hagyományos PVC alapú ionszelektív elektródokkal. A kezdeti válaszok meghatározása után a két elektródot 4 óra metanolba helyeztük. A PVC

membránon alapuló ionszelektív membrán ezüstion válasza megszűnt, ugyanakkor a nanopórusos érzékelőké változatlan maradt.

Az érzékelési elv kiterjesztését vizsgáltuk biológiai eredetű komplexképzők így Cu^{2+} felismerő peptidek alkalmazásával (11. ábra), illetve a nanopórusok egyéb szintetikus ionoforokkal klick kémiai módosításán keresztül. Az utóbbi ionoforok esetében azokat az ionokat céloztuk meg, amelyek a vér elektrolit analízis szempontjából jelentőséggel bírnak (pl. Na^+). Úgy véljük, hogy sikeres végkifejlet esetében, az ionérzékelésen túlmenően, az ionszelektív szilárdtest nanopórusok más területen is jelentős előrelépést jelenthetnek, így akár szelektív ipari méretű elválasztások (radioaktív ionoktól való mentesítés, dúsítás) esetében is.



11. ábra Cu^{2+} -szelektív peptidekkel módosított nanopórusok sematikus ábrája és az így készített nanopórusok szelektív potenciometriás válasza az elsődleges ionra (Cu^{2+}).

3.3. Aptamer módosított nanopórusos érzékelők

Az ASPV növényi vírus felismerésére alkalmas szenzor fejlesztéséhez az arany nanopórusost a vírus burokkéregjére specifikus aptamert immobilizáltunk. Ennek érdekében 3' végén tiol funkció csoporttal jelölt aptamer szálát alkalmaztunk (5'-ggg gtg gtg ggt tct ttt tgt ggt att ggt gtg ggg ggc a-tttt-C6-SH-3'), amely lehetőséget adott az aranyfelületre való közvetlen rögzítésre. Azt találtuk, hogy az aptamer módosított nanopórus bizonyos körülmények között képes volt specifikusan kimutatni, hogy az adott növényi minta a vírussal fertőzött volt vagy sem. A kutatás egy diplomamunka alapját képezte, de további kísérletek szükségesek az eredmények publikálásához.⁸ Vizsgálatot végeztünk irodalmi adatok alapján előállított IgE aptamerrel is, amelynek megfelelő működését dot-blot mérésekkel igazoltuk (13). Az IgE-re szelektív aptamerre való módosítás után (5'-GGGG ACGT TTAT CCGT CCCT CCTA GTGG CGTG CCCC TTTT TTT-C6-SH-3') vizsgáltuk az IgE bekötődésére bekövetkező fluxus csökkenést. Az eredmények alapján 64 nm átmérőjű pórusok esetében szignifikáns jelcsökkenést tapasztaltunk, de hasonlóan további mérések szükségesek még az eredmények közléséhez.⁹

3.4. Nanopórusok alkalmazása nanorészecskék számlálására

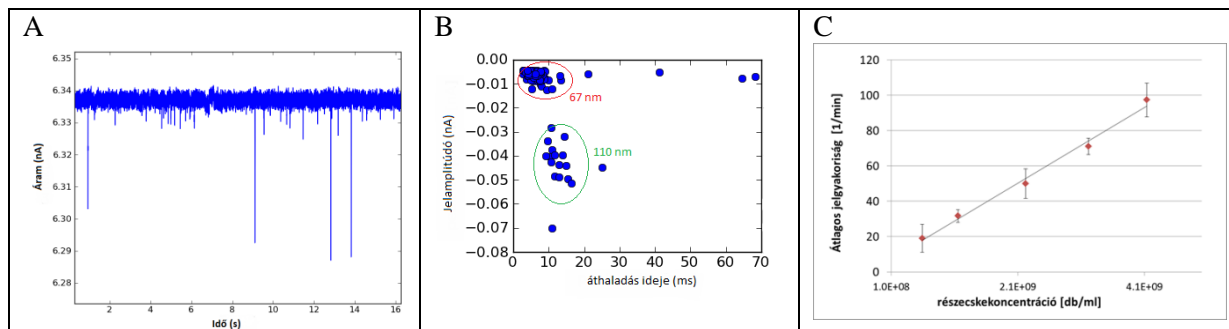
Kutatásaink során kiderült, hogy a nanopórus érzékelés talán egyik legígéretesebb alkalmazási területét a jövőben a vírusszámlálás/vírus meghatározás fogja képezni. Ez irányban tettük meg az első lépéseket a nanorészecske számlálási kísérletekkel, amelynek során egy nanopórusos membránokon

⁸ Terstyánszki Anna: Aptamerekkel módosított nanopórusos érzékelő fejlesztése (2011, MSc dolgozat)

⁹ Szabó Zsófia: Biomolekuláris érzékelés kémiai módosított mesterséges ioncsatornákkal (2011, BSc szakdolgozat)

keresztülmenő nanorészecskék számlálása és méret szelektív elkülönítése volt a célunk.¹⁰ A különböző platformok közül a nanopipettákat találtuk a legmegfelelőbbnek az adott fejlesztési szinten a nanorészecskék számlálására. Hosszas optimalás után sikerült azt a mérési elrendezést és kísérleti körülményeket megtalálni, amely mellett latex nanorészecskék számlálása lehetővé vált.

A 13. ábra szemlélteti a számlálási kísérlet során kapott jelet, amikor is a nanopipetákra alkalmazott negatív nyomás hatására az oldat a pipettába áramlik és közben a nanopipettára feszültséget adva mérjük az áramjelet. A nanorészecskék bekerülése a pórusba megnöveli a pórus ellenállását, amely negatív áramimpulzusok formájában jelentkezik (12 ábra). Az áramimpulzusok amplitúdója és időtartama (a részecske áthaladási ideje) a részecskeméret függvénye és ezáltal a különböző méretű részecskék külön számlálhatók. Az impulzusok átlagos gyakorisága lehetőséget ad a részecskeszám meghatározására.



12. ábra Nanorészecskék számlálása nanopipettával. (A) tipikus áramtranziensek egy 67 és 110 nm átmérőjű latex részecskekeverék esetében kb. 300 nm átmérőjű nanopórus alkalmazásával, (B) a különböző méretű nanorészecskék azonosítása az áramimpulzus amplitúdója és időtartama alapján, (C) 300 nm átmérőjű nanorészecskék darabszámának meghatározására alkalmas kalibrációs görbe.

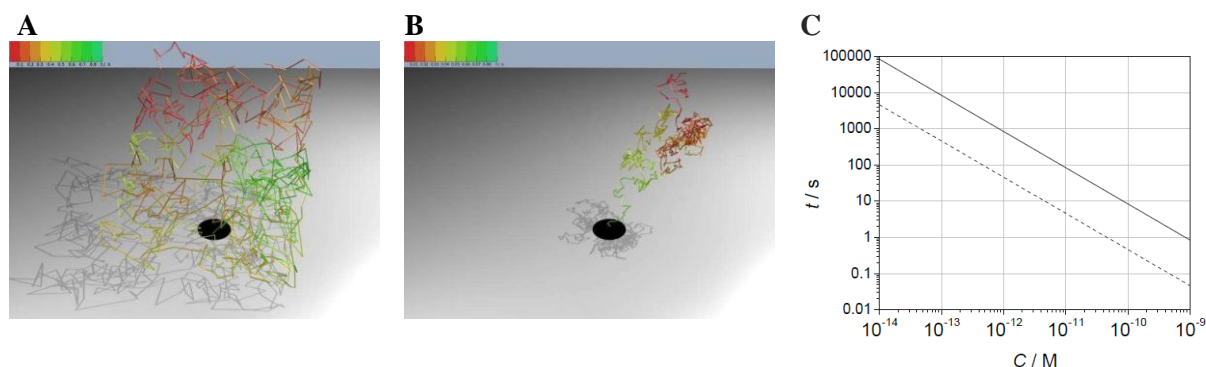
4. Nanopórusos érzékelők/számlálók válaszanak elméleti leírása

4.1. Nanopórusos érzékelők elvi kimutatási határa

Egy-nanopórusos membránok esetében már egy molekula is modulálni tudja a nanopórus átjárhatóságát, azaz ezek az érzékelők akár egy-molekula detektálására alkalmasak. A meghatározandó komponens detektálásának szükséges (de nem elégséges) feltétele, hogy a komponens „találkozzon” az érzékelő felülettel. Ugyanakkor a nanopórusok, és általánosságban a nanoszenzorok, egyik sajátossága, hogy az érzékelő részük infinitezimálisnak tekinthető a vizsgált oldat térfogatához képest. Ezért ennek a találkozásnak a valószínűsége adott idő alatt a meghatározandó komponens koncentrációjával együtt drámaian csökken. Az átlagos találkozási idő ennek megfelelően a mintaoldat koncentrációjának függvénye és értéke egyáltalán nem közömbös az analízis szempontjából. A találkozási időt nyilván lehet csökkenteni a mintaoldat térfogatának csökkentésével, de nagyon híg oldatok esetében a mintaoldat térfogatának csökkentése oda vezethet, hogy egy meghatározandó molekula sem lesz a vizsgált térfogatban. Ennek megfelelően, a találkozási idő az egyik legfontosabb tényező, amely a nanopórusos érzékelők kimutatási határát meghatározza. A találkozási idő meghatározásához véletlen bolyongás (random walk) szimulációkat végeztünk egy kocka alakú szimulációs térben, amelynek egyik oldalán helyeztük el a nanopórust. Ebbe a térbe mindössze egy

¹⁰ Bakk Teodóra Diána: Nanopórusok fejlesztése nanoméretű részecskék számlálására- Útban a vírus számlálás felé (2012, MSc dolgozat)

molekulát helyeztünk el, amely a kocka térfogatából számolva egy adott oldatkonzentrációt eredményezett. Véletlen bolyongás szimulációkkal sikerült egy egyszerű összefüggésben megadni az átlagos találkozási idő koncentráció és a pórusátmérő függését. Kidolgoztunk egy torzított véletlen bolyongás szimulációs eljárást, amely alkalmazásával lehetőség nyílt külső erők hatásának figyelembe vételével a találkozási idő meghatározására. Szimulációkkal bizonyítottuk a transzmembrán feszültség gyorsító hatását negatív töltésű célvegyületek esetében (egyszálú DNS oligonukleotid) (13. ábra) és szemi-empirikus összefüggést vezetünk be a találkozási idő meghatározására, amely a koncentráció és pórusátmérő mellett a célvegyület mobilitásának és az alkalmazott transzmembrán feszültség függvénye. Eredményeinket az *Analytica Chimica Acta* folyóiratba közöltük. (14)



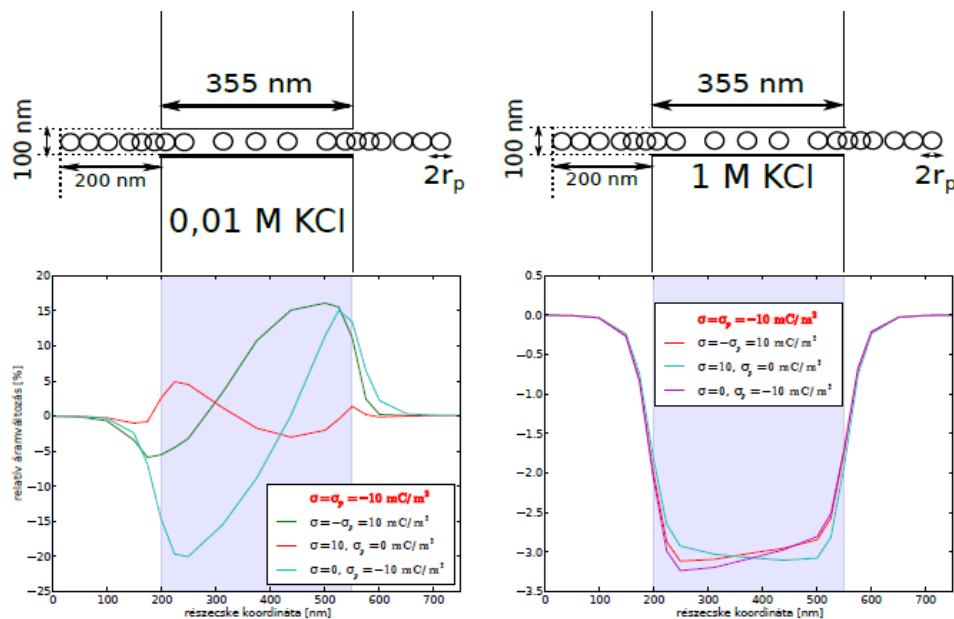
13. ábra 30 bázisú DNS szál mozgási pályája egy 1000 nm élhosszúságú kockában, amelynek egyik oldalán egy 10 nm sugarú és 8° nyílásszögű csonka kúp alakú pórus bemeneti nyílása található: (A) külső erőtér hiányában és (B) 0,5 V transzmembrán feszültség alkalmazásával. (C) a 30 bázisú DNS szál 10 nm sugarú pórusal való találkozásához szükséges átlagos idő függése a DNS koncentrációtól: külső erőtér hiányában (folytonos vonal) és 0,5 V transzmembrán feszültség mellett.

4.2. Durva szemcsézetségű molekulamodellezés

A bioérzékelésre használt nanopórusok mérete legtöbb esetben túl nagy ahhoz, hogy leírásukra atomi szintű molekuladinamikát lehessen alkalmazni, viszont a makroszkopikus fizikai törvények nehezen alkalmazhatóak egyedi molekulák és molekularészek vizsgálatára. Az általunk kidolgozott nanopórus reprezentáció durva szemcsézetségű molekulamodellezés alkalmazásával áthidalást képez e két elméleti módszer között. Durva szemcsézetségű molekulamodelléssel lehetséges viszonylag nagy rendszerek viselkedésének (20 nm) megfelelően hosszú idejű (50 ns) vizsgálata. A modell esetében 4-5 atom (a H atomot nem számítva) képez egy szemcsét. A szemcséknek 4 fő típusa van polarizálhatóság szerint, és további 4 altípus van a H-kötés kialakítási képessége szerint. Egy molekula durva szemcsézetségű reprezentációját kvantumkémiai számítások felhasználásával lehet megalkotni. A számításokat a GROMACS molekuladinamikai software-csomaggal végeztük. A kiindulási rendszerek elkészítéséhez egy külön szoftvert fejlesztettünk, amely képes létrehozni a GROMACS által értelmezhető állományokat. A modell alkalmasnak bizonyult csonka kúp nanopórusokban és azok környezetében immobilizált DNS szálak elektromos térben történő orientációjának szimulációjára. Így modellezni tudtuk a DNS szálak orientációjából eredő elektromechanikai effektusokat, amely lehetőséget adott korábbi irodalmi eredmények helyes értelmezésére. Kiderült, hogy gyakorlatilag csak a csúcsonyílás közvetlen környezetében immobilizált DNS szálak befolyásolják az ionáramot. Eredményeinket az *Electroanalysis* folyóiratban közöltük (15).

4.3. Multifizikai szimulációk

Multifizikai szimulációkat végeztünk (csatolt Poisson-Nernst-Planck Navier-Stokes egyenletek numerikus megoldásával) egy-nanopórusos molekuláris számlálók válaszána optimalására. Vizsgáltuk a nanopórusok geometriájának és felületi töltésének hatását a mért áramjelre és a blokkolási események amplitúdójára. Mélységében tanulmányoztuk a pórusátmérő meghatározásának lehetőségét az áram-feszültség görbe alapján.¹¹ Eredményeink azt mutatják, hogy amennyiben a pórus felületén lévő töltések száma elhanyagolható a pórust kitöltő térfogatban található töltések mellett (pl. tömény oldatok esetén), úgy a fenti összefüggések jelentősen egyszerűsödnek. Ekkor a blokkolási események amplitúdójára érvényes marad a mikrométeres tartományban alkalmazott Coulter-számlálóknál alkalmazott összefüggés és a pórus elektromos válasza jól közelíthető egy változó keresztmetszetű de homogén fajlagos vezetőképességű vezetőével. Hígabb oldatok használatakor (vagy nagy töltéssűrűségű pórusoknál) az ionoknak egyre jelentősebb része azért tartózkodik a pórusban, mert annak felületi töltését árnyékolja le. Ekkor a pórust kitöltő térfogat már nem tekinthető homogénnek és semleges töltésűnek, ami eltérő elektromos választ eredményez és előjeltől függően vonzza/taszítja a pórus közelében tartózkodó, töltéssel rendelkező vegyületeket/részecskéket. Ennek következménye lehet, hogy egy vegyület bár méretét tekintve áthaladhat a póruson, azonban a pórus elektromos tere és/vagy az elektrooszmózis ezt megakadályozza (14. ábra).



14. ábra Az $r_p=25$ nm sugarú és σ_p felületi töltéssűrűségű részecske $r=50$ nm sugarú, σ felületi töltéssűrűségű és $l=355$ nm hosszú, hengeres póruson való áthaladása alatt mérhető áram százalékos eltérése a részecskét nem tartalmazó póruson keresztül folyó áramtól. A membránra kapcsolt feszültség 1V, az elektrolit 0,01 M (bal) vagy 1 M (jobb) KCl oldat. A piros kiemelés jelöli azt a töltés konfigurációt, amelynél a részecske nem volt képes bejutni a pórusba.

A Nernst-Planck/Poisson egyenlet numerikus megoldása adott geometriájú és felületi töltéssűrűségű nanopórusos membránokra rendkívül jól korrelált a kísérletileg meghatározott potenciál válaszokkal. Nagy ionerősségek esetében Donnan hibát tapasztaltunk a permszelektív nanopórusok esetében, amely annak tulajdonítható, hogy az ionerősség növekedése csökkenti a Debye hosszt a pórusban. Ennek eredményeképpen a nanopórusok permszelektivitása részben vagy teljesen megszűnik és a

¹¹ Makra István: Nanopórus alapú bioszenzorok válaszmekanismusának vizsgálata (2011, MSc dolgozat)

válaszgörbe eltérést mutat a nernsti potenciál választól. Ezt a jelenséget használtuk ki a pórusok felületi töltéssűrűségének meghatározására. Ennek érdekében a kísérleti görbékre a Nernst-Planck/Poisson egyenlet numerikus megoldásával kapott görbékkel illesztettük. Ismerve a pórusok átmérőjét, a felületi töltéssűrűséget meg tudtuk határozni az illesztésből. A belső fal kémiai módosításának függvényében a felületi töltéssűrűség 5 és -40 mC/m^2 között változott. Eredményeinket az *Electrochimica Acta* folyóiratban közöltük (16).

5. Potenciometriás detektorok fejlesztése

A kutatási terv szerint a nanopórusokon keresztüli iontranszport detektálásának egyik lehetőségeként rendkívül kis kimutatási határú anyagtranszport kontrollált ionszelektív elektródokat kívántunk alkalmazni. Ezeknek az elektródoknak a robusztussága azonban még nem megfelelő a gyakorlati célra való alkalmazásra és ezért vizsgáltuk az anyagtranszportot meghatározó tényezők hatását. Elektrokémiai eljárást dolgoztunk ki az ionofor és az ion-ionofor komplex diffúzió együttthatójának mérésére és megfelelő minőségbiztosítási paramétereket állítottunk fel. Eredményeink az *Analyst* (17), *Electroanalysis* (18,19) és *J. Solid State Electrochemistry* (20) folyóiratokban jelentek meg. Vizsgáltuk az ionszelektív elektródok kimutatási határának csökkentésének lehetőségeit (21,22), illetve szisztematikusan tanulmányoztuk az általánosan használt membránösszetételek és új membránanyagok vízfelvételét, amely a potenciál válasz stabilitásának egyik legfontosabb tényezője a szilárd belső elvezetésű elektródok esetében (23-26). Új -az ioncserélő alapú potenciometriás alapérzékelővel kompatibilis -biomolekuláris felismerési sémát dolgoztunk ki és alkalmaztunk PSA szérumból való meghatározására (27). A közleményt Hot Article-nek választották az *Analyst* folyóiratba.

A pályázat keretében készített dolgozatok és doktori értékezések:

1. Cserkaszky Áron: Transzport-moduláción alapuló nanopórusos érzékelők kimutatási határának értelmezése Monte-Carlo szimulációval (2008, TDK dolgozat)
2. Varga Tamás: Nanopipetták gyártása és felületi módosítása (2009, Diplomamunka)
3. Sidney Goiaime: Development of nano and microstructured devices for nanopore based sensing (2009 MSc Thesis)
4. Horváth Klára: Ionszelektív nanopórusok vizsgálata (2009, Diplomamunka)
5. Makra István: Nanopórusban jelentkező egyenirányító hatás és nanorészecske transzlokáció molekuladinamikai szimulációja (2009, BSc Szakdolgozat)
6. Takács Ágoston: Nanopórus alapú potenciometriás ionszenzorok fejlesztése (2009, TDK dolgozat)
7. Makra István: Nanopórusban jelentkező egyenirányító hatás és nanorészecske transzlokáció molekuladinamikai szimulációja (2009, BSc szakdolgozat)
8. Makra István: Egy-nanopórusos elektrokémiai érzékelők válaszmechanizmusának modellezése (2010, TDK dolgozat)
9. Terejánszki Péter: Nanopórusos számlálók fejlesztése (2010, BSc szakdolgozat)
10. Fazekas Lilla: Nanopórusok fejlesztése biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára (2010, Diplomamunka)
11. Kiss Tamás: Felületi plazmonrezonanciás aptamer alapú szenzorok alkalmazása vérszérumban történő detektálásra (2010, BSc szakdolgozat)
12. Szabó Zsófia: Biomolekuláris érzékelés kémiaailag módosított mesterséges ioncsatornákkal (2011, BSc szakdolgozat)
13. Terstyánszki Anna: Aptamerekkel módosított nanopórusos érzékelő fejlesztése (2011, MSc dolgozat)

14. Makra István: Nanopórus alapú bioszenzorok válaszmechanizmusának vizsgálata (2011, MSc dolgozat)
15. Stangl Péter: Aptamer módosított arany nanorészecskék szintézise és bioanalitikai alkalmazásai (2011, BSc szakdolgozat)
16. Bakk Teodóra Diána: Nanopórusok fejlesztése nanoméretű részecskék számlálására- Útban a vírus számlálás felé (2012, MSc dolgozat)
17. Gyönyörű Anikó: Kémiaiilag módosított nanopórusokon alapuló potenciometriás érzékelők (2012, BSc Szakdolgozat)
18. Batjargal Nominzul: Kémiaiilag módosított egy-nanopórusos érzékelők fejlesztése DNS meghatározásra (2012, MSc dolgozat)

PhD értekezés

1. Höfler Lajos: Ionofor alapú folyadékmembrán elektródok és nanopórusos szenzorok anyagtranszport tulajdonságainak vizsgálata és modellezése (2009, PhD értekezés)

Kiemelkedő TDK eredmények

Takács Ágoston: Nanopórus alapú potenciometriás ionszenzorok fejlesztése
 BME TDK 2009: Kiemelt első díj, Rektori Különdíj
 XXX. OTDK 2011: Pro Scientia Aranyérmesek Társaságának Díja
 Makra István: Egy-nanopórusos elektrokémiai érzékelők válaszmechanizmusának modellezése
 BME TDK 2010: Első díj, VBK Analitikai és Fizikai Kémia Szekció

Nemzetközi pályázati tevékenység

Az OTKA pályázat beadásakor ígértük, hogy az elvégzett munka alapot fog képezni további nemzetközi pályázatok elnyeréséhez. Ennek megfelelően 2011-ben elnyertük a Bill&Melinda Gates Foundation pályázatát (először Magyarországról) nanopórusos vírusszámláló fejlesztésére, illetve ENIAC 2009 pályázaton egy ipari konzorcium keretében további jelentős támogatást nyertünk el nanopórusos érzékelők diagnosztikai alkalmazására (2012-től finanszírozva).

Tudományos közlemények

1. Lautner G, Balogh Z, Bardóczy V, Meszáros T, Gyurcsányi RE. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst* 2010;135:918-926.
2. Balogh Z, Lautner G, Bardóczy V, Komorowska B, Gyurcsányi RE, Meszáros T. Selection and versatile application of virus-specific aptamers. *Faseb Journal* 2010;24:4187-4195.
3. Lautner G, Balogh Z, Gyurkovics A, Gyurcsányi RE, Meszáros T. Homogeneous assay for evaluation of aptamer-protein interaction. *Analyst* 2012.
4. Menaker A, Syritski V, Reut J, Öpik A, Horváth V, Gyurcsányi RE. Electrosynthesized Surface-Imprinted Conducting Polymer Microrods for Selective Protein Recognition. *Advanced Materials* 2009;21:2271-+.
5. Syritski V, Reut J, Menaker A, Gyurcsányi RE, Öpik A. Electrosynthesized molecularly imprinted polypyrrole films for enantioselective recognition of L-aspartic acid. *Electrochimica Acta* 2008;53:2729-2736.
6. Lautner G, Kaev J, Reut J, Öpik A, Rappich J, Syritski V, Gyurcsányi RE. Selective Artificial Receptors Based on Micropatterned Surface-Imprinted Polymers for Label-Free Detection of Proteins by SPR Imaging. *Advanced Functional Materials* 2011;21:591-597.
7. Jagerszki G, Gyurcsányi RE, Hofler L, Pretsch E. Hybridization-modulated ion fluxes through peptide-nucleic-acid- functionalized gold nanotubes. A new approach to quantitative label-free DNA analysis. *Nano letters* 2007;7:1609-12.
8. Jagerszki G, Gyurcsányi RE, Höfler L, Pretsch E. Hybridization-modulated ion fluxes through peptide-nucleic-acid-functionalized gold nanotubes. A new approach to quantitative label-free DNA analysis. *Nano Letters* 2007;7:1609-1612.

9. Gyurcsányi RE. Chemically-modified nanopores for sensing. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2008;27:627-639.
10. Lindner E, Gyurcsányi RE, Pretsch E. Potentiometric Ion Sensors: Host–Guest Supramolecular Chemistry in Ionophore-Based Ion-Selective Membranes. In: Schneider H-J, editor. *Applications of supramolecular chemistry for 21st century technology*. Boca Raton: Taylor & Francis; 2012. p xi, 441 p.
11. Jágerszki G, Grün A, Bitter I, Tóth K, Gyurcsányi RE. Ionophore-gold nanoparticle conjugates for Ag(+)-selective sensors with nanomolar detection limit. *Chemical Communications* 2010;46:607-609.
12. Jágerszki G, Takács Á, Bitter I, Gyurcsányi RE. Solid-State Ion Channels for Potentiometric Sensing. *Angewandte Chemie-International Edition* 2011;50:1656-1659.
13. Szűcs J, Gyurcsányi RE. Towards Protein Assays on Paper Platforms with Potentiometric Detection. *Electroanalysis* 2012;24:146-152.
14. Höfler L, Gyurcsányi RE. Nanosensors lost in space. A random walk study of single molecule detection with single-nanopore sensors. *Analytica Chimica Acta* 2012;722:119-126.
15. Höfler L, Gyurcsányi RE. Coarse grained molecular dynamics simulation of electromechanically-gated DNA modified conical nanopores. *Electroanalysis* 2008;20:301-307.
16. Makra I, Jágerszki G, Bitter I, Gyurcsányi RE. Nernst-Planck/Poisson model for the potential response of permselective gold nanopores. *Electrochimica Acta* 2012;73:70-77.
17. Bodor S, Zook JM, Lindner E, Tóth K, Gyurcsányi RE. Chronopotentiometric method for the assessment of ionophore diffusion coefficients in solvent polymeric membranes. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2009;13:171-179.
18. Zook JM, Buck RP, Gyurcsányi RE, Lindner E. Mathematical model of current-polarized ionophore-based ion-selective membranes: Large current chronopotentiometry. *Electroanalysis* 2008;20:259-269.
19. Zook JM, Bodor S, Lindner E, Tóth K, Gyurcsányi RE. Assessment of Ion-Ionophore Complex Diffusion Coefficients in Solvent Polymeric Membranes. *Electroanalysis* 2009;21:1923-1930.
20. Lindner E, Gyurcsányi RE. Quality control criteria for solid-contact, solvent polymeric membrane ion-selective electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2009;13:51-68.
21. Lindfors T, Szűcs J, Sundfors F, Gyurcsányi RE. Polyaniline Nanoparticle-Based Solid-Contact Silicone Rubber Ion-Selective Electrodes for Ultratrace Measurements. *Analytical Chemistry* 2010;82:9425-9432.
22. Höfler L, Bedlechowicz I, Vigassy T, Gyurcsányi RE, Bakker E, Pretsch E. Limitations of Current Polarization for Lowering the Detection Limit of Potentiometric Polymeric Membrane Sensors. *Analytical Chemistry* 2009;81:3592-3599.
23. Sundfors F, Höfler L, Gyurcsányi RE, Lindfors T. Influence of Poly(3-octylthiophene) on the Water Transport Through Methacrylic-Acrylic Based Polymer Membranes. *Electroanalysis* 2011;23:1769-1772.
24. Lindfors T, Sundfors F, Höfler L, Gyurcsányi RE. The Water Uptake of Plasticized Poly(vinyl chloride) Solid-Contact Calcium-Selective Electrodes. *Electroanalysis* 2011;23:2156-2163.
25. Lindfors T, Höfler L, Jágerszki G, Gyurcsányi RE. Hyphenated FT-IR-Attenuated Total Reflection and Electrochemical Impedance Spectroscopy Technique to Study the Water Uptake and Potential Stability of Polymeric Solid-Contact Ion-Selective Electrodes. *Analytical Chemistry* 2011;83:4902-4908.
26. Sundfors F, Lindfors T, Höfler L, Bereczki R, Gyurcsányi RE. FTIR-ATR Study of Water Uptake and Diffusion through Ion-Selective Membranes Based on Poly(acrylates) and Silicone Rubber. *Analytical Chemistry* 2009;81:5925-5934.
27. Szűcs J, Pretsch E, Gyurcsányi RE. Potentiometric enzyme immunoassay using miniaturized anion-selective electrodes for detection. *Analyst* 2009;134:1601-1607.