

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar

Tudományos Diákköri Konferencia '25

Válogatás a Mérnöki Kar hallgatói által a 2025. év őszi
Tudományos Diákköri Konferenciákon bemutatott pályamunkákból

A kiadványt összeállította
Dr. Ható Zoltán és Dr. Valiskó Mónika



NTP-HHTDK-25-0008

Polinszky Tehetséggondozó Program a Pannon Egyetem Mérnöki Karán



KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM



Nemzeti Tehetség
Program

Pannon Egyetemi Kiadó 2026

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar

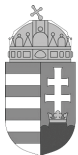
Tudományos Diákköri Konferencia '25

Válogatás a Mérnöki Kar hallgatói által a 2025. év őszi
Tudományos Diákköri Konferenciákon bemutatott pályamunkákból

A kiadványt összeállította
Dr. Ható Zoltán és Dr. Valiskó Mónika

NTP-HHTDK-25-0008

Polinszky Tehetséggondozó Program a Pannon Egyetem Mérnöki Karán



KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM



Nemzeti Tehetség
Program

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar

Tudományos Diákköri Konferencia '25

Válogatás a Mérnöki Kar hallgatói által a 2025. év őszi
Tudományos Diákköri Konferenciákon bemutatott pályamunkákból

Szerkesztette
Dr. Ható Zoltán és Dr. Valiskó Mónika

Kiadja a Pannon Egyetemi Kiadó
8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

© Pannon Egyetemi Kiadó, Veszprém, 2026

ISBN 978-963-396-311-1



Anyanyelvi lektor: Bélafi-Zihár Dóra
Borítóterv és kiadványszerkesztés: Vipler Nikolett
A kiadásért felelős a Pannon Egyetem rektora



Pannon Egyetem
University of Pannonia



Pannon Egyetem
Mérnöki Kar

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----------|
| A konferencia szervezői | 6 |
| Előszó | 7 |
| Balogh Tímea - Higanykötő flagellin-alapú bioszenzor | 8 |
| 1. Irodalmi áttekintés | 10 |
| 1.1. A higany előfordulása, körforgása és hatása | 10 |
| 1.2. A higanyhoz való alkalmazkodás biokémiája | 11 |
| 1.3. Higanykötő fehérjék | 12 |
| 1.2. Higanykötő motívumok a Mer család fehérjeiben | 12 |
| 1.3.2. A lakkáz fehérje higanykötő motívumai | 13 |
| 1.3.3. Putatív higanykötő fehérjék | 14 |
| 1.4. A bakteriális ostor | 15 |
| 1.5. Bakteriális filamentumok | 15 |
| 1.6. A Salmonella flagellin szerkezete és tulajdonságai | 16 |
| 1.7. Bioszenzorok | 17 |
| 1.8. Higany kimutatása | 18 |
| 2. Célkitűzés | 19 |
| 3. Anyagok és módszerek | 20 |
| 3.1. Felhasznált anyagok és eszközök | 20 |
| 3.2. Rekombináns DNS létrehozása | 20 |
| 3.3. Polimeráz-lánreakció | 21 |
| 3.4. Használt génbeviteli eljárások | 21 |
| 3.4.1. Hőtranszformálás | 21 |
| 3.4.2. Elektroporálás | 22 |
| 3.5. Gélelektroforézis | 22 |
| 3.5.1. Agaróz gélelektroforézis DNS elválasztására | 22 |
| 3.5.2. SDS-PAGE gélelektroforézis fehérjék elválasztására | 22 |
| 3.6. Elektrokémiai vizsgálati módszerek | 23 |
| 3.6.1. Ciklikus voltammetria | 23 |
| 3.6.2. Elektrokémiai impedancia spektroszkópia | 23 |
| 4. Elvégzett kísérletek és eredmények | 24 |
| 4.1. Higanykötő fehérjék keresése és flagellinbe építésük megtervezése | 24 |
| 4.2. A potenciális Hg-kötő flagellin variánsokat kódoló plazmidok létrehozása génszabványi eszközökkel | 26 |
| 4.2.1. A higanykötő szekvenciákat kódoló gének felszorzása PCR módszerrel | 26 |
| 4.2.2. A pKOT-delD3-mcs plazmid és a Hg-kötő peptideket kódoló inzertek restriktív emésztése és ligálása | 28 |
| 4.2.3. TOP10 <i>E. coli</i> sejtek transzformálása a módosított plazmidokkal | 29 |
| 4.2.4. Plazmidok izolálása a kolóniákból | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.5. Elektrokompetens flagellin deficiens SJW2536 <i>Salmonella</i> sejtek készítése | 30 |
| 4.2.6. Plazmidok elektroporálása SJW2536 <i>Salmonella</i> sejtekbe | 30 |
| 4.3. A potenciális higanykötő flagellin variánsok termeltetése és polimerizációs képességének vizsgálata | 30 |
| 4.3.1. A flagellin variánsok termelődésének tesztelése kis térfogatú tenyészetben | 30 |
| 4.3.2. Az NmerA flagellin variáns termelődésének vizsgálata | 31 |
| 4.3.3 MerP variáns termelődésének vizsgálata | 33 |
| 4.3.4. Putatív higanykötő variáns termelődésének vizsgálata | 34 |
| 4.3.5. Lakkáz 1 variáns termelődésének vizsgálata | 35 |
| 4.3.6. Lakkáz 2 variáns termelődésének vizsgálata | 36 |
| 4.3.7. A különböző flagellin variánsok termelési hatékonyságát fokozó paraméterek keresése | 37 |
| 4.4. Különböző flagellin variánsokból filamentum termelése nagyobb térfogatban | 42 |
| 4.5. A különböző variánsokból készített filamentumok szenzor felületre rögzítése és higanykötő képességük mérése elektrokémiai impedancia spektroszkópiával (EIS) | 43 |
| 5. Összefoglalás | 47 |
| Köszönetnyilvánítás | 48 |
| Irodalomjegyzék | 49 |
| Függelék | 52 |
| F.1. A 12,5%-os SDS-gél elkészítése | 52 |
| F.2. Lépések az első polimerizációig a nagy térfogatú filamentum termelésben | 53 |
| Zajác Miklós - Kaolinit nanotekercsek előállításának fejlesztése | 54 |
| 1. Bevezetés | 56 |
| 2. Irodalmi rész | 57 |
| 2.1. Kaolinit | 57 |
| 2.1.1. Hinckley-index | 58 |
| 2.1.2. Aparicio–Galán–Ferrell-index | 59 |
| 2.2. Dimetil-szulfoxid | 59 |
| 2.3. Metanol | 59 |
| 2.4. Cetil-trimetil-ammónium-klorid | 60 |
| 2.5. Interkaláció | 60 |
| 2.5.1. Kaolinit-DMSO organokomplex | 61 |
| 2.5.2. Kaolinit-metanol organokomplex | 62 |
| 2.5.3. Kaolinit-CTAC organokomplex és nanotekercs | 62 |
| 2.6. Kaolinit és kaolinit-organokomplexek vizsgálati módszerei | 63 |
| 2.6.1. Röntgendiffrakció | 63 |
| 2.6.3. Infravörös spektroszkópia | 64 |
| 2.6.3. Termikus analízis | 65 |
| 2.6.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia | 65 |

| | |
|--|----|
| 3. Kísérleti rész | 66 |
| 3.1. Kutatási terv | 66 |
| 3.2. Alkalmazott eszközök és műszerek | 66 |
| 3.3. Alkalmazott kaolinok és interkalálószerrek | 67 |
| 3.4. Kaolinit-organokomplexek előállítása | 68 |
| 3.5. Röntgendiffrakciós vizsgálatok | 68 |
| 3.6. Infravörös spektrometriai vizsgálatok | 72 |
| 3.7. Termogravimetriai vizsgálatok | 75 |
| 3.8. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok | 79 |
| 4. Összefoglalás | 84 |
| Irodalomjegyzék | 85 |
| Köszönetnyilvánítás | 87 |

A konferencia szervezői

**Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
KTDT elnök:**

Dr. Valiskó Mónika
egyetemi docens

Komplex Molekuláris Rendszerek
Kutatócsoport

**Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
KTDT titkár:**

Dr. Ható Zoltán
tudományos főmunkatárs

Komplex Molekuláris Rendszerek
Kutatócsoport

Előszó

Napjaink rohanó világában egyre inkább fontosságot nyer az utánpótlás-nevelés, legyen szó bármilyen területről. Nincs ez másként a tudományos utánpótlás-nevelés esetén sem, amelynek az elmúlt időszakban jelentős kihívásokkal kellett megbirkóznia. A Tudományos Diákköri (TDK) mozgalom egyik alapvető célja, hogy lehetőséget biztosítson tehetséges, elhivatott, munkájukra igényes fiataloknak, akiket vonz az ismeretlen, és amelynek megismerése nem megijeszti, hanem inkább bátorítja őket.

A TDK-mozgalomban való részvétel már az egyetemi tanulmányokat megelőzően, a középiskolában is elkezdődhet. Az elért eredmények bemutatására a Mérnöki Kar minden félévben konferenciát szervez, ahol mind az alap-, mind az alkalmazott tudományokhoz kapcsolódóan lehetőségük van a résztvevőknek eredményeik bemutatására. A bemutatott tudományos munkákat kutatási területeiken elismert kutatókból álló tudományos bizottságok értékelik, és javaslatot tesznek az országos konferencián való részvételre. A Mérnöki Karon hagyományosan a Biológia, Fizika, Földtudományok és Matematika, a Kémiai és Vegyipari, valamint a Műszaki Tudományi szekciókhoz tartozó tudományterületeken kerül megrendezésre a konferencia.

2018-ban azért hívtuk életre ezt a kötetet, hogy a Karon végzett TDK-munkák közül a legkiemelkedőbbeket bemutassuk, és ezzel is kedvet csináljunk azoknak a hallgatóknak, akik szívesen végeznének ilyen munkát, de nem feltétlenül tudják, hogy mi az, ami leginkább érdekelné őket. Kötetünkben a 2025. november 26-án megtartott Intézményi TDK Konferencián első helyezést elért pályamunkák közül azokat mutatjuk be, amelyek szerzői ehhez hozzájárulásukat adták.

Ezúton is szeretnénk megköszönni a Témavezetőknek, Bírálóknak, Bizottsági Tagoknak a munkát, valamint természetesen a Hallgatóknak az elhivatottságot, lelkesedést és alázatot, amely ahhoz vezetett, hogy tudományos kutatást végezzenek, és annak eredményeit ilyen magas színvonalon bemutassák.

Az olvasónak pedig jó szórakozást kívánunk. Reméljük, hogy kötetünk inspirációul szolgál a jövő kutatói számára.

A szerkesztők

Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri Konferencia
2025

Higanykötő flagellin-alapú bioszenzor érzékelőréteg fejlesztése

Készítette: Balogh Tímea

Mérnöki Kar, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet,
Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

Belső konzulens: Tóth Éva

A pályamunka lezárásának dátuma: 2025. november 10.



Tartalmi összefoglaló

A higany az emberi tevékenységek következtében a levegőben, a talajban és az élővizekben is előfordul elemi, szerves, illetve szervetlen vegyületek formájában. Az élő szervezetekbe könnyen bejut, ott felhalmozódhat, és toxikus hatást fejt ki a bőrre, a vesékre, illetve az idegrendszerre. Emiatt kulcsfontosságú olyan módszerek fejlesztése, amelyekkel detektálni lehet a higanyt már alacsony koncentrációban is. Az elektrokémiai bioszenzorok olyan analitikai eszközök, amelyek a biológiai válaszreakciót elektromos jellé alakítják át. Előnyeik közé tartozik, hogy specifikusak és érzékenyek a célmolekulára, illetve lehetővé teszik a helyszíni gyors detektálást.

A természetben különböző szervezetekben megtalálhatók olyan, higany megkötésére alkalmas fehérjék, amelyek alapul szolgálhatnak annak detektálására. Ezeknek a stabil komplex struktúrák építésére alkalmas fehérjékkel való kombinálása alkalmassá teheti őket bioszenzorok érzékelőrétegeinek kialakítására. Ilyen önszerveződő módon hosszú filamentumok képzésére alkalmas segédfehérje lehet a *Salmonella* baktériumok mozgásszerveinek fő alkotóeleme, a flagellin. A filamentumok felszínén jelenik meg a flagellin D3 doménje. Ezt más fehérjékkel helyettesítve vagy módosítva előállíthatók olyan flagellin variánsok, amelyek a megfelelő célmolekulákat kötik, és ezekből flagelláris filamentumok építhetők, felszínükön több tízezer kötőhellyel.

A munkám célja olyan flagellin variánsok fejlesztése, amelyek polimerizálva és egy bioszenzorra rögzítve képesek a higany különböző formáinak detektálására kis koncentrációban víz- és talajmintákban. A kutatásom során azonosítottam a szakirodalomban öt, a higany kötésére alkalmas fehérjemoitívumot, majd megterveztem és létrehoztam a potenciális Hg-kötő flagellin variánst kódoló génkonstrukciókat. Mindegyik variáns esetén vizsgáltam a fehérje termelődését és polimerizációs képességét. A filamentumképzésre alkalmas variánsok higanykötő képességét aranyelektrod felületére rögzítve, elektrokémiai impedanciaspektroszkópiával vizsgáltuk, amellyel azonosítottam azt a variánst, amely a leginkább alkalmas a szenzorikai alkalmazásra.

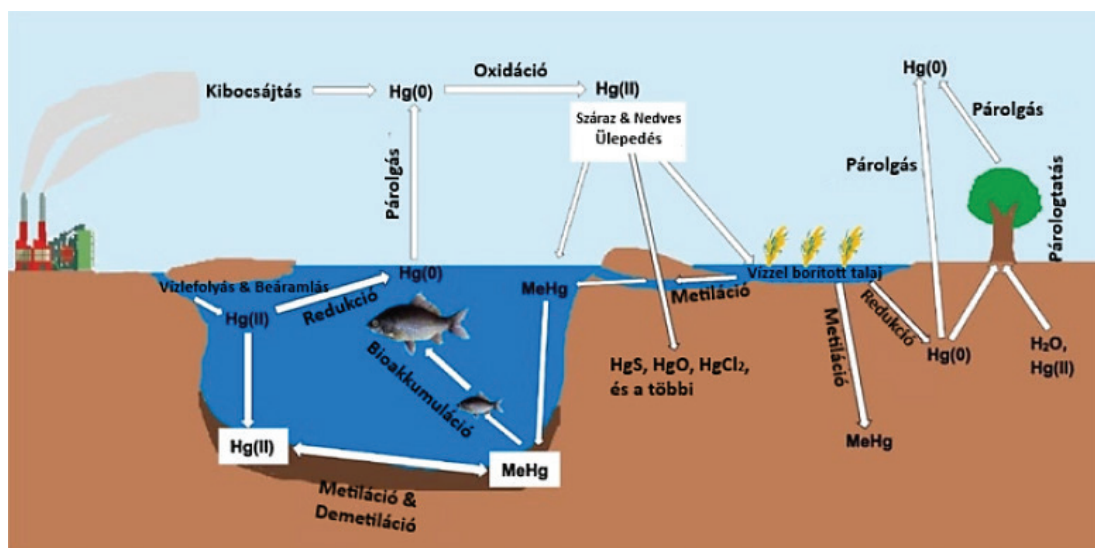
1. Irodalmi áttekintés

1.1. A higany előfordulása, körforgása és hatása

A higany az egyetlen olyan fém, amely szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotban van jelen. Alacsony olvadásponttal ($-38,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) és magas forrásponttal ($356,7\text{ }^{\circ}\text{C}$) rendelkezik. Egy olyan nehézfém, amely a természetben a földkéreg kőzeteiben található meg [1]. Ugyanakkor a környezetünkben, a levegőben, a talajban és az élővizekben is előfordul mint szennyező komponens, elemi, szerves, illetve szervesetlen vegyületek formájában. Természetes úton vulkáni folyamatok, kőzetek mállása és erdőtüzek nyomán szabadul fel, azonban a higanyszennyezések főként olyan emberi tevékenységekből erednek, mint például a bányászat, fosszilis tüzelőanyagok égetése, nátrium-hidroxid előállítás, illetve a higanytartalmú használati cikkek: hőmérőkből, nyomásmérőkből [1,2]. A higany körforgását és megjelenési formáit tehát mind az emberi aktivitás, mind a természeti folyamatok befolyásolják (1.1. ábra). A levegőbe párolgás révén jutó higany többségében elemi formában van jelen, azonban napsugárzás hatására szervesetlen higanyvegyületekké alakulhat, és így hosszú távolságokat képes megtenni. Végül nedves vagy száraz ülepedéssel jut le a földre, így kerül a vizekbe és a talajba. Ezekben a környezetekben egyes mikroorganizmusok átalakítják toxikus metil-higannyá.

A higany a szervezetbe kerülve azért nagyon veszélyes, mivel az élőlényekben felhalmozódik, ami biomagnifikációhoz vezet. Köztudott például, hogy a metil-higany a tengerben élő halakon keresztül, a táplálkozás során az emberi szervezetbe is bejut, toxikus hatást kifejtve az idegrendszerre, a vesékre, illetve terhesség esetén a magzatra. A szervesetlen higanyvegyületek a legnagyobb mértékben a veséből mutathatók ki. Összességében a káros hatások attól függenek, hogy mekkora mennyiségű, milyen típusú higanyvegyületnek, mennyi ideig, milyen úton volt kitéve az adott személy.

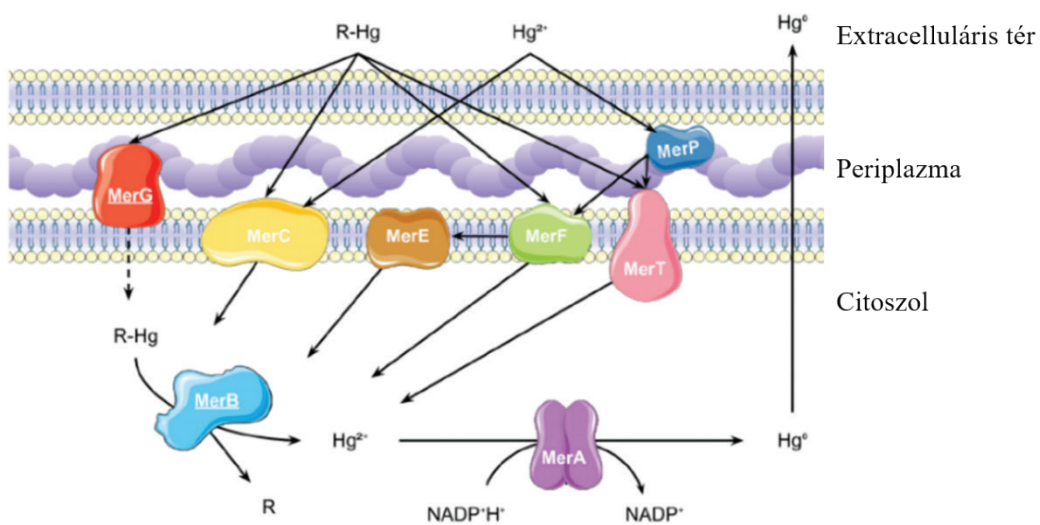
A higanyszennyezés csökkentésére, ezáltal a környezet és az élőlények védelme céljából jött létre a Minamata Egyezmény, amelyet az országok 2013-ban írtak alá. Ennek keretében olyan intézkedéseket hoztak, amelyekkel a higanykibocsátás korlátozása és használatának minimalizálása, megszüntetése valósulhatott meg.



1.1. ábra: A higany körforgása [3].

1.2. A higanyhoz való alkalmazkodás biokémiája

A higany toxikus hatása ellen egyes mikrobák megtanultak alkalmazkodni, még hozzá a *mer* operon rendszerük segítségével [4,5]. Ez a rendszer olyan génekből áll, amelyek által kódolt fehérjék segítik a higannyal szemben való ellenállást, mégpedig a toxikus Hg^{2+} ionok fémes higannyá alakításával. A *mer* operon a sejten belül többféle helyen is elhelyezkedhet, például plazmidban, transzpozonokban vagy a genomiális DNS-ben. Higanymentes környezetben a MerR fehérje represszorként működve gátolja az operon fehérjéinek kifejeződését egészen addig, amíg Hg^{2+} ionok kötődnek hozzá; ekkor átíródhatnak a struktúrgének, ezáltal termelődhetnek a rezisztencia kialakításában részt vevő fehérjék, amelyek működését az 1.2. ábra szemlélteti. A kötőfehérjék közül a MerP a periplazmában, a MerC, MerE, MerF és a MerT transzporterek a belső membránban helyezkednek el, amelyek feladata, hogy a Hg^{2+} ionokat a MerA fehérjének továbbítsák. A MerE még a metilhigany, a MerC, MerF és a MerT pedig a fenilhigany transzportjáért felelős. A MerG szintén a periplazmában található, és a fenilhigany bejutását gátolja oly módon, hogy a sejt áteresztőképességét csökkenti. A MerB a citoplazmába kerülő metilhigany C-Hg kötését hasítja, és az így keletkező Hg^{2+} ion szintén a MerA fehérjéhez kerül. A homodimer protein MerA (higany reduktáz) az operon működésében kulcsszerepet játszik: a Hg^{2+} redukcióját végzi, amely folyamat befejezéséként a Hg^0 el tud távozni a sejtből.



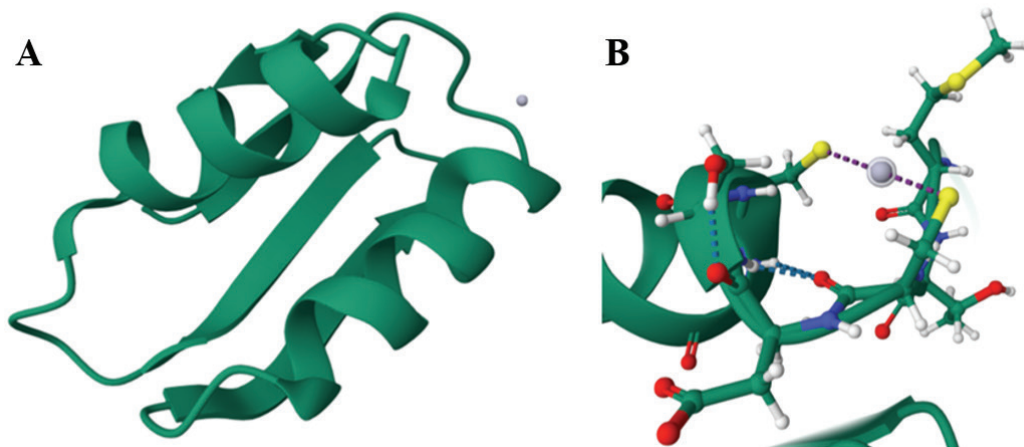
1.2. ábra: A *mer* operon rendszer fehérjéi, azok sejten belüli előfordulása és a Hg-detoxifikálásban betöltött szerepük sematikus ábrázolása [5].

1.3. Higanykötő fehérjék

A higany a fehérjékhez preferáltan azok cisztein oldaláncain keresztül kapcsolódik, mivel a fém nagy affinitással kötődik tiolcsoportjaikhoz [6]. Ez a kötés szerepet játszik különböző élőlényekben a toxikus hatás kialakításában, ugyanakkor ennek köszönhetőek egyes organizmusokban a detoxifikációs mechanizmusok is.

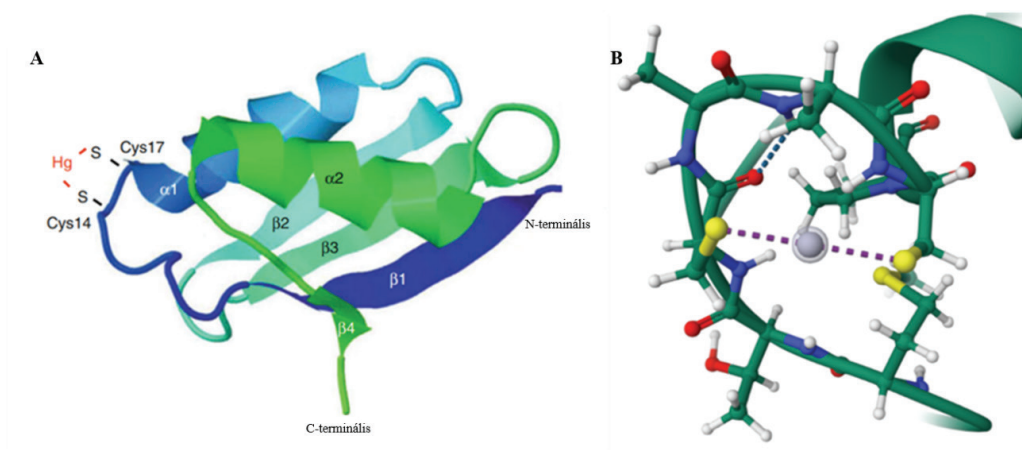
1.2. Higanykötő motívumok a Mer család fehérjeiben

Az 1.2 fejezetben bemutatott Mer család fehérjeinek többsége kimondottan a higany megkötéséért felelős, és a feladatuk inentől ágazik el vagy a nehézfém továbbítására, vagy az átalakítására. A higany reduktáz egy homodimer enzim, amelyben mindkét lánc három pár ciszteint tartalmaz, ezek biztosítják a higany megkötéséhez és redukciójához szükséges helyet [7]. A fehérje N-terminális doménje, az NmerA (1.3. ábra) köti meg először a higany(II)iont két ciszteinjén (C11, C14) keresztül, majd továbbítja azt a másik monomer C-terminális cisztein párjához (C558', C559'). Ezt követően a higany eljut a fehérje belsejébe, és további két cisztein (C136, C141), NADPH és FAD közreműködésével redukálódik.



1.3. ábra: (A) A higany reduktáz enzim 69 aminosavat tartalmazó NmerA doménje, szürkével a higany(II) jelölve. (B) Az enzim kötőmotívuma. A Hg-kötő peptid szekvenciája: GMTCDSC (PDB ID: 2KT3) [8].

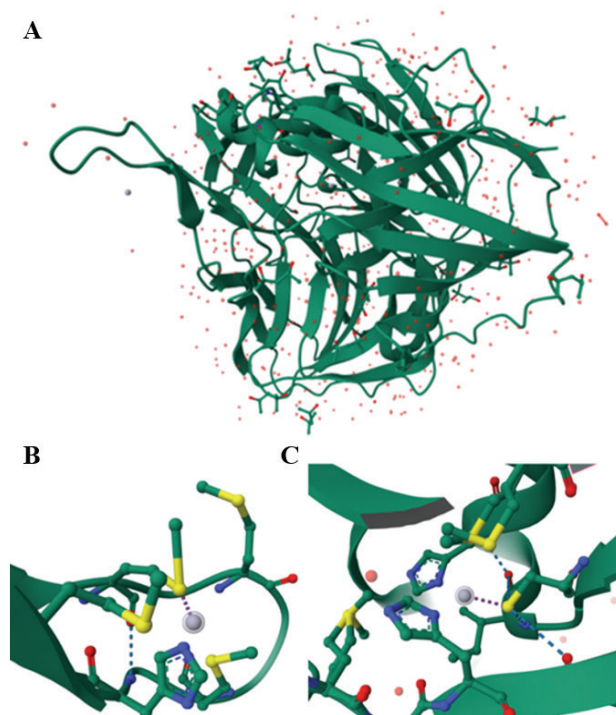
A Mer operonról expresszálandó többi fehérjéjében is ciszteinek kötik a nehézfémet: a 72 aminosav hosszú MerP esetében a kötőmotívum a GMTCXXC szekvencia (1.4. ábra), a dimer szerkezetű MerR-ben az egyik lánc 117., 126., valamint a másik lánc 82'. ciszteinje vesz részt a kötésben [9]. A transzmembrán MerT, MerF és MerC fehérjék N-terminálisán, a membránon belül szintén egy cisztein pár található, továbbá egy másik pár a citoplazmába benyúló hurokban helyezkedik el. A metilhigany demetilációját végző MerB enzim kötőhelye két erősen konzervált ciszteint (C96, C159) tartalmaz, illetve egy aszparaginsavat [10]. A fehérje szekvenciájában a 160. pozícióban található még egy cisztein, azonban kutatások szerint a szerinnel való helyettesítése csak mérsékelten csökkenti az aktivitást [11].



1.4. ábra: (A) A MerP kötőfehérje. (B) A fehérje higanykötő motívuma. (PDB ID: 1AFJ) [9,10].

1.3.2. A lakkáz fehérje higanykötő motívumai

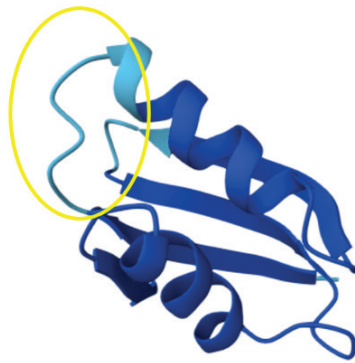
A Protein Data Bank adatbázisban elérhetőek olyan fehérjék, amelyek natív formájukban más fémionokat kötnek, de higany ionokkal is sikerült ezeket kristályosítani és szerkezetüket meghatározni. Erre példa a lakkáz enzim, amely egy réztartalmú oxidáz, és aromás vegyületeket oxidál, miközben a molekuláris oxigént vízzé redukálja [12]. Egy kutatásban a fehérje kikristályosítása során HgCl_2 -ot adtak hozzá, amelyből a higany(II)iont megkötötte több helyen is (1.5. ábra). Az egyik kötőmotívum egy hurokrégióban foglal helyet, ahol metionin koordinálódik a higanyhoz. A másik motívum ciszteint tartalmaz, és a fehérje belsejében helyezkedik el.



1.5. ábra: (A) A lakkáz fehérje térszerkezete. (B) Az első kötőmotívum figyelhető meg, ahol a metionin tölti be a kötő aminosav szerepét. (C) A fehérje belsejében elhelyezkedő kötő régió. (PDB ID: 2XVB) [12].

1.3.3. Putatív higanykötő fehérjék

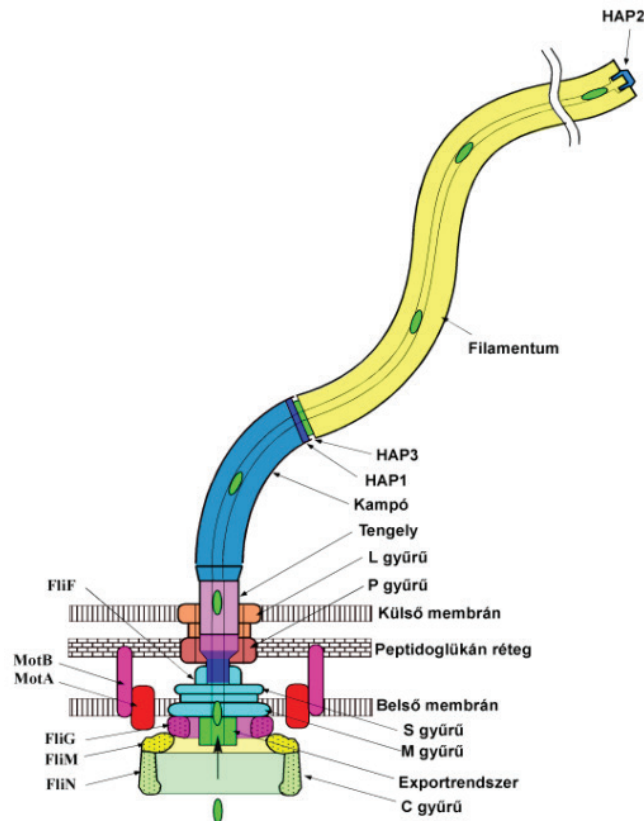
A putatív fehérjék olyan fehérjék, amelyek funkcióját génszekvencia alapján feltételezik, azonban kísérletesen még nem igazolták. Ilyen fehérjeszerkezetek több adatbázisban is megtalálhatók, mint például az AlphaFoldban [13,14] vagy az UniProtban [15]. Az AlphaFold oldalon található egy úgynevezett putatív higanytranszporter periplazmikus fehérje (1.6. ábra), amelynek az elméleti kötőmotívuma a GMHCQGC, és amely a *Salinisphaera shabanensis* E1L3A baktériumban termelődik [16].



1.6. ábra: Az AlphaFold által jósolt putatív higanykötő fehérje térszerkezete, sárgával bekarikázva a valószínűsíthető kötőmotívummal [16].

1.4. A bakteriális ostor

A baktériumok mozgásszervei a flagellumok (1.7. ábra), amelyek szerkezetét egy sejtmembránba ágyazott nanomotor, egy nagyjából 130 fehérjealegységből álló kampó és a hozzá kapcsolódó filamentum alkotja [17]. Minden egyes motorhoz egy filamentum csatlakozik, melyek a baktérium úzásakor képesek összeállni és másodpercenként széttekeredni. A nagyjából 50 μm átmérőjű flagelláris motor hengerszimmetrikus szerkezetű, és protonok hajtják; a forgás fordulatszáma elérheti a 100 000/percet is. Fontos tulajdonsága, hogy mindkét irányba képes forogni, ezáltal lehetővé téve az irányváltást a baktérium számára.



1.7. ábra: A bakteriális flagellum szerkezete [17]

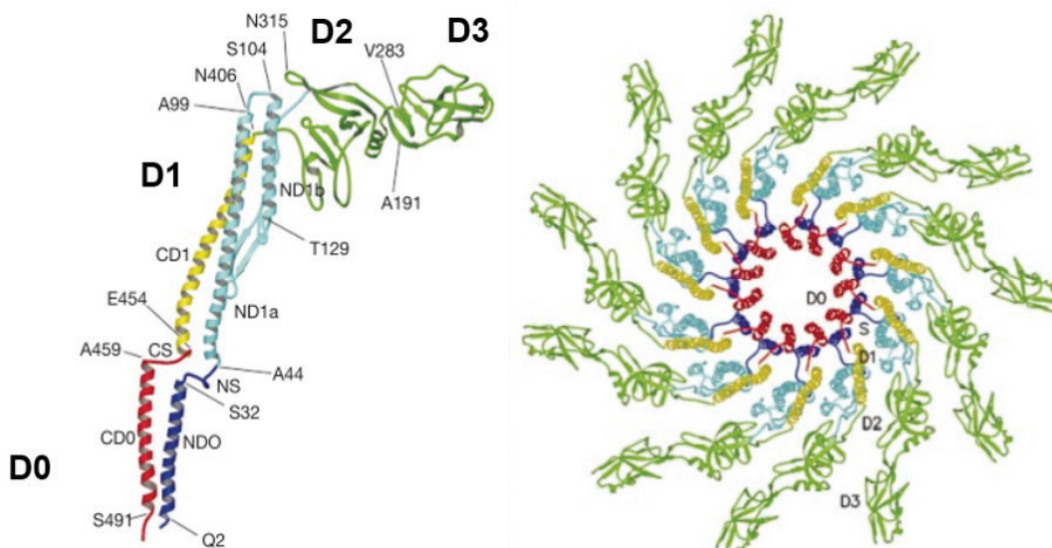
1.5. Bakteriális filamentumok

A bakteriális flagellum fő szerkezeti elemei a flagelláris filamentumok, amelyek körülbelül 10–20 μm hosszúak, átmérőjük 23 nm, és mintegy 10 000 flagellin alegységből épülnek fel [17]. Az alegységek 11 protofilamentumba rendeződnek, melyek kétféle stabil konformációt vehetnek fel. A filamentumok önszerveződő rendszerek. In vivo szerveződéskor az alegységek valószínűleg részlegesen kitekert állapotban, egy szűk belső csatornán keresztül jutnak ki a sejtől, és épülnek be a filamentumok végére. A beépülést az 5 alegységből álló HAP2 molekuláris sapkafehérje segíti, amennyiben ez nincs jelen, a monomer fehérjék szimplán eldiffundálnak a tápközegbe. A filamentumok képződése in vitro is lehetséges, ha a sejtektől izolált monomer fehérjékhez ammónium-szulfátot vagy – akár más baktériumtörzsből származó – filamentum kezdeményeket adagolunk. Ez a folyamat reverzibilis: hőkezelés vagy sav hozzáadására a filamentumok monomerizálódnak.

1.6. A Salmonella flagellin szerkezete és tulajdonságai

A *Salmonella typhimurium* baktérium helikális filamentumait felépítő flagellin monomer 494 aminosavból áll (1.8. ábra), molekulatömege 51,5 kDa [17–19]. Rendezetlen, konzervált terminális régióinak szerepe annak megakadályozása, hogy a filamentum képződés már a sejt citoplazmájában elkezdődjön. A flagellin alegységet négy domén alkotja: a polipeptidlánc N-terminálisa a D0 doménből indul, a D1–D3 egységeken halad át, majd a D2 és D1 régiókon tér vissza, és a C-terminálisa ismét a D0-ban végződik. Bár a doméneket rövid antiparallel láncpárok kötik össze, a D0 és a D1 közötti összekötő régió hosszabb a többinél. A szerkezeti alegységek közül a D3 domén – amely a polipeptidlánc 189–284. aminosavmaradékait foglalja magában – a filamentum felszínén helyezkedik el, és a szomszédos alegységekkel nincs kölcsönhatásban. Éppen ezért a D3 domén más fehérjékkel való helyettesítésével vagy módosításával előállíthatók olyan flagellin variánsok, amelyek a megfelelő célmolekulákat kötik – illetve alakítják át –, és ezekből flagelláris filamentumok építhetők. Előnyük nemcsak a polimerizációnak köszönhető fokozott stabilitás, hanem a felületen lévő nagy kötőhelysűrűség is.

A flagellin tulajdonságait több korábbi kutatás is kihasználta a fehérje funkcionális módosítására, a D3 domén helyettesítésével. Mivel a polipeptidlánc közepe kerül módosításra, ezért idegen motívumok beépítésekor gyakran linker peptideket alkalmaznak a polimerizációs képesség és a beépítendő motívum funkciójának fenntartása érdekében. A kutatócsoport korábban például sikeresen xilanáz enzimet épített bele ebbe a régióba, amely megtartotta a katalitikus aktivitását, valamint nikkel- és arzénkötő motívumot is, amelyek mindkét esetben megőrizték a fémkötő képességüket, miközben a polimerizációs tulajdonság is változatlanul megmaradt [20–22].

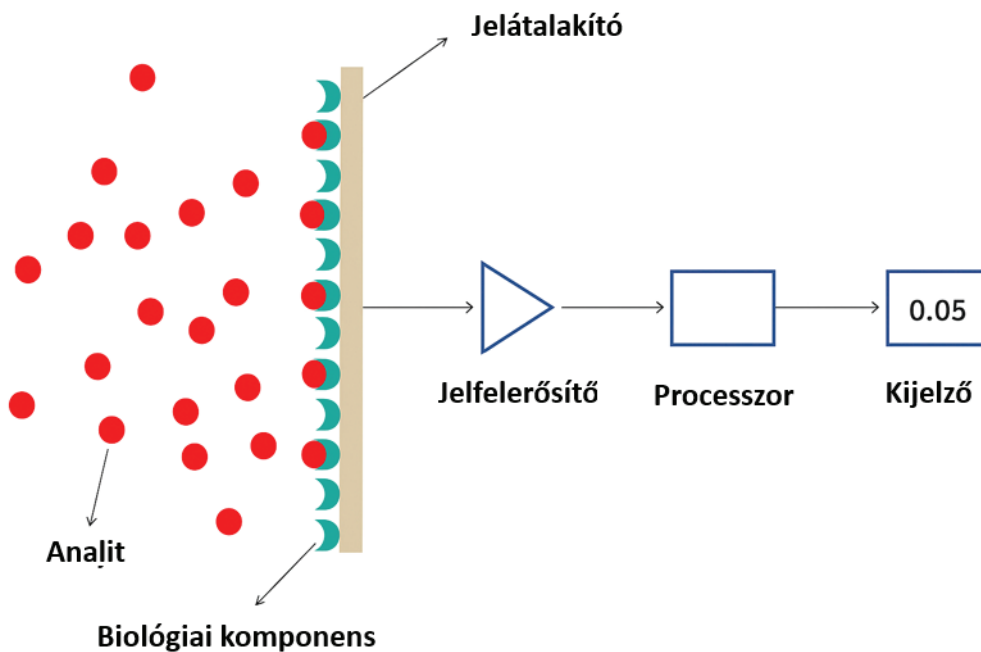


1.8. ábra: A flagellin szerkezete [18].

1.7. Bioszenzorok

A bioszenzorok olyan analitikai eszközök, amelyekben biológiai elemeket alkalmazunk a mintában egy adott komponens jelenlétének vagy mennyiségének meghatározására [23,24]. Működésük alapja (1.9. ábra), hogy a bioreceptor – amely lehet például fehérje, sejt vagy aptamer – megköti, és amennyiben a funkciójához tartozik, átalakítja a célvegyületet.

Ezt követően a transzducer a keletkező biokémiai változást mérhető jellé konvertálja, amelynek felerősítését és feldolgozását követően lehetővé válik a vizsgált anyag koncentrációjának számszerű meghatározása. A bioszenzorok a jelátalakítás módja alapján többféle csoportba sorolhatók, például elektrokémiai, optikai vagy egyéb elven működő rendszerekbe. Ezeknek az analitikai eszközöknek az előnye, hogy nagymértékben specifikussá és érzékennyé tehető a adott célmolekulára, továbbá kis méretűk és az egyszerű detektálási módszer révén hordozhatók, és gyors, helyszíni érzékelést tesznek lehetővé [25]. A bioszenzorok egyik nagy csoportját az elektrokémiai elven működő eszközök alkotják, amelyek a bioreceptor által adott választ elektromos jellé alakítják át. A detektált jel típusa lehet például feszültség, áramerősség vagy impedancia, a választott technikától függően.



1.9. ábra: A bioszenzorok működési elve [24].

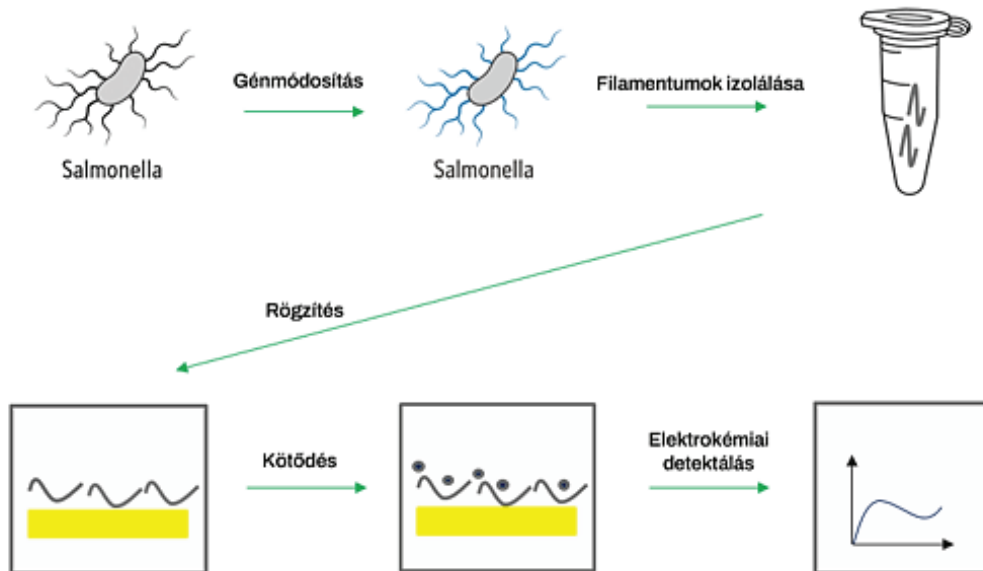
1.8. Higany kimutatása

A higany rendkívül toxikus nehézfém, amelynek koncentrációját az ivóvízben szigorúan szabályozzák. Az Európai Unióban a megengedett maximális higanykoncentráció 1 µg/l. Mivel ez a nehézfém már kis mennyiségekben is káros biológiai hatást fejthet ki, ezért kimutatására és mennyiségi meghatározására többféle analitikai módszer alkalmazható, mint például az atomabszorpciós, a fluoreszcencia- és UV-Vis spektroszkópia [26]. Ezen módszerek hátránya azonban, hogy mintaelőkészítést igényelnek, a műszerek költségesek, és nem alkalmasak hordozható alkalmazásra. Ennek kiküszöbölésére számos kutatás foglalkozik higanykötő bioszenzorokkal. A szakirodalomban a különböző típusú Hg²⁺ ionok megkötésére alkalmas bioszenzorokat írnak le: DNS- és enzimalapú, vagy sejtes érzékelőrétegeket [27–29]. A DNS-alapú bioszenzorok azon az elven működnek, hogy a Hg²⁺ ionok beékelődnek a helytelenül párosodott timin-timin bázispárok közé, ezáltal stabil T-Hg²⁺-T komplexet hozva létre. Cl⁻ vagy CN⁻ ionok hatására a DNS reverzibilisen visszaalakul. Ezen szenzorok, habár stabilan, de kis mennyiségű Hg²⁺ ion megkötésére képesek, ami korlátozza az érzékenységüket. A probléma kiküszöbölésére kidolgoztak érzékenységnövelő stratégiákat, például arany nanorészecskéket vontak be oligonukleotidokkal, amelyeket linker molekulák segítségével rögzítettek a szenzor arany felületére. Ezzel a módszerrel sikerült csökkenteni a kimutatási határt: 0,5 nM detektálási minimumot sikerült elérniük. A bioszenzorok második típusát az enzimalapúak alkotják, amelyekben a bioreceptor szerepét egy enzim tölti be, amelyet a munkaelektrod felületére rögzítenek. Működésük azon alapul, hogy a Hg²⁺ ionok gátolják az enzim működését. Ilyen enzim lehet például a glükóz-oxidáz. A katalizált reakció terméke a hidrogén-peroxid, amelynek mennyisége amperometriásan meghatározható. Amennyiben a mintában Hg²⁺ ionok vannak jelen, akkor azok inhibíciót okoznak, és ez az áramerősség csökkenésében nyilvánul meg. A módszer hátránya, hogy a mintában más inhibítormolekula is jelen lehet, illetve nem szelektív a Hg²⁺ ionokra. Ezenkívül az enzim stabilitásának megőrzése is problémákba ütközik. A harmadik típusba a sejtes bioszenzorok tartoznak, amelyek alapja, hogy egyes baktériumok képesek a nehézfémek toxikus hatásával szemben ellenállni azáltal, hogy azokat kevésbé mérgező formába alakítják át. A higany esetében ezt a folyamatot a *mer* operon szabályozza. *E. coli*-val végzett kísérletek alapján a kimutatási határ viszonylag magas (0,1 mM), így csak korlátozottan alkalmazhatók. Ezzel szemben az algasejtekkel végzett kutatásokban lényegesen alacsonyabb határértéket sikerült elérni. Az élő sejtes bioszenzorok hátránya, hogy érzékenyek a környezeti feltételekre. Habár jól érzékelik a Hg²⁺ ionokat, más nehézfémek jelenlétében is reagálhatnak, ezért a mérés szelektivitása nem megbízható. Amennyiben a mikroorganizmusokat genetikailag módosítják annak érdekében, hogy egyedül a célvegyületet kössék, akkor a fejlesztésük és különösen a terepi használatuk engedélyköteles tevékenységnek minősül az aktuális jogszabályok alapján. Terepi környezetben alkalmaznak még ipari, hordozható műszereket is. Például a NIC EMP-3 „Portable Mercury Survey Meter” egy olyan, kifejezetten gázfázisú Hg⁰ mérésre fejlesztett eszköz, amely 0,1 µg/Nm³ érzékenységgel bír [30]. Ugyanakkor a Lumex RA-915M „Multifunctional Mercury Analyzer” egy hordozható atomabszorpciós spektrométer, amely levegőben, folyadékban és szilárd mintákban is alkalmazható, és kimutatási határa mintánként eltérő (például a víz esetén csupán 1 ppb) [31].

2. Célkitűzés

A kutatásom célja olyan higanykötő flagellin variánsok fejlesztése, melyekből előállított polimerek bioszenzorokba építve alkalmasak akár kis koncentrációjú, akár különböző higanyvegyületek szennyezésének kimutatására, főként víz- és talajminták esetén. A kutatási munkám első lépése a szakirodalomban ismert higanykötő fehérjék és peptidmotívumok felkutatása, majd ezekből a kötőhelyet tartalmazó fehérjerész átalakítása oly módon, hogy beépíthető legyen mind méret, mind morfológiai szempontból a flagellin fehérje D3 doménjének helyére.

A gyakorlatban először a módosított fehérjét kódoló gént kell létrehoznom, és olyan formára alakítanom, hogy abból a fehérjét *Salmonella* baktériumban termeltetni tudjam. Ennek első lépése a megfelelő plazmidok megtervezése és létrehozása génszerkezeti eljárásokkal. Ezt követően célom a plazmidok által kódolt rekombináns flagellin variánsok expresszálása *Salmonella* baktériumokban és a fehérjetermelés optimalizálása. A polimerizációra képes tisztított variánsokból a szenzorra rögzítést elősegítő flagellin variánssal elegyített különböző arányú és kötőtulajdonságú polimereket készítek, amelyek higanykötő képességét a szenzoron való immobilizálás után vizsgálom.



2.1. ábra: A Hg²⁺ ionok detektálásához vezető út.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A kísérleteim során használt eszközöket és tápoldatokat a Sanyo Labo Autoclave-val sterilizáltam. A fehérjemotívumokat kódoló szekvenciákat a pKOT-delD3-mcs plazmidba építettem be, amelyet korábban a kutatócsoport hozott létre [20]. A PCR-reakciót a Biometra T-personal készülékkel végeztem. A DNS-ek restrikciós emésztéséhez a New England Biolabs által gyártott XhoI-, AgeI-HF- és SacI-restrikciós endonukleázokat, valamint a hozzájuk tartozó puffereket alkalmaztam. A PCR-termékek tisztításához a Monarch PCR&DNA Cleanup Kit-et (New England Biolabs) használtam. Az agaróz gélelektroforézishoz a Cleaver Scientific LTD Power Pro készüléket alkalmaztam, amelyhez az általam felhasznált agarózt a Nippon Genetics Europe GmbH gyártotta. A géleket GelRed DNA Gel Stain (Biotium) festékkel festettem meg. Markerként a GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) szolgált.

A munkám során a plazmidokat TOP 10 *Escherichia coli* sejtekbe transzformáltam. A plazmid DNS-ek kinyerését a Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs) segítségével végeztem el. Elektroporálás során a géneket a Bio-Rad GenePulser Xcell elektroporátor készülékkel a flagellin deficiens *Salmonella typhimurium* SJW2536 baktériumtörzsbe juttattam. A baktériumok lemezen való tenyésztéséhez LB/Amp táptalajt használtam (Luria Bertani - AppliChem és Ampicillin Sigma-Aldrich; Amp törzsoldat koncentráció: 100 mg/ml). Az anyagokat az Ohaus Explorer analitikai és a Kern PCB táramérleggel mértem ki. A sejtek átoltását a Merck Novagen Calbiochem Biosciences lamináris fülke alatt hajtottam végre. Az inkubációs lépésekhez az IKA KS 4000 i control, illetve egy MRC gyártmányú orbitális rázóinkubátort használtam. A tenyésztett sejtek mennyiségéről a Jasco V-630 spektrofotométert alkalmazva nyertem információt. A minták centrifugálásához a Beckman Coulter Optima™ MAX-XP, a Beckman Coulter Optima MAX-E és a Sorvall Discovery 90SE (Hitachi) ultracentrifugákat, valamint Heraeus Biofuge Primo R, Heraeus Multifuge 3S-R és Eppendorf 5415R centrifugákat használtam. A filamentumok a Lab-Line Multi-Blok Block Heaterben kerültek monomerizálásra 70 °C-on.

A mikroszkópos vizsgálatok az Olympus B201 optikai mikroszkóppal történtek. A fehérjéket SDS-PAGE gélelektroforézissel a Bio-Rad Mini-PROTEAN II készülékkel választottam el egymástól, markerként a PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 kDa) használtam. A géleket a Bio-Rad Gel Doc EZ Imager segítségével értékeltem ki.

3.2. Rekombináns DNS létrehozása

A biotechnológiában széles körben alkalmazzák a rekombináns DNS-technológiát, amelynek eszköztára lehetővé teszi új genetikai konstrukciók létrehozását, rekombináns fehérjék előállítását, valamint gének mennyiségi felszaporítását és szekvenciájuk meghatározását [32]. A rekombináns DNS egy a vektorból (hordozóból) és az abba beépített inzertből áll. Bakteriális expressziós rendszerekben a vektor általában egy plazmid, amely egy kétszálú, cirkuláris DNS-molekula. A rekombináns technika fontos elemei a restrikciós endonukleáz enzimek: ezek a fehérjék felismernek egy specifikus, legtöbbször palindrom jellegű, 4–8 bázispár hosszúságú DNS-szekvenciát, és a meghatározott helyen elhasítják a DNS mindkét szálát. A hasítás eredményeképp a szálak végei lehetnek tompák, illetve túlnyúló nukleotidszakasszal rendelkező ragadós végek is kialakulhatnak. Az utóbbi esetben, ha a vektort és az inzertet egymástól elkülönítve, de ugyanazzal a restrikciós endonukleázzal

hasítjuk el, akkor a két DNS-vég komplementer módon bázispárosodásra képes. A kapcsolódáshoz DNS-ligáz enzimet szükséges használni, amely kovalens kötés létrehozásával összeköti a szálon belül a szomszédos nukleotid egységeket.

Én vektorként a kutatócsoportban korábban kialakított pKOT-delD3-mcs plazmidot használtam [20], és ebbe a higanykötő peptidmotívumokat kódoló géneket az XhoI (felismert szekvencia: C'TCGAG) és a SacI (vágóhely: GAGCT'C) restrikciós endonukleázok hasító helyei közé építettem be. Ez a pBR322-alapú plazmid a *Salmonella typhimurium* baktérium génexpressziós szabályozó régióin kívül tartalmaz egy olyan flagellin gént, amelyben a D3 domént kódoló régió helyére egy többszörös klónozó helyet építettek (Multiple Cloning Site, MCS).

3.3. Polimeráz-láncreakció

A polimeráz-láncreakció alapelve, hogy egy egyszálú templát DNS tetszőleges részére komplementer szálat lehet szintetizálni, ezáltal pedig az adott DNS-szakaszt felszorzósítani [33]. A folyamatot három részre lehet osztani: denaturálásra, anellálásra és polimerizációra. Az első lépésben 92–98 °C-os hőmérsékleten a DNS-t denaturáljuk, azaz a kettős hélixet szétválasztjuk. A folyamat azért megy végbe, mivel hő hatására a szálak közötti hidrogénkötések felszakadnak. A második lépésben, az anellálás során a primerek odatapadnak a DNS-hez, amelynek hőmérséklet optimuma az 55–65 °C-os tartományba esik. Végül a polimerizáció lépése következik: a lánchosszabbítás során a DNS-polimeráz enzim a primer 3' végéről indulva beépíti a soron következő komplementer nukleotidokat. Ezt a lépést a polimeráz enzim működéséhez optimális hőmérsékleten, tipikusan 68–72 °C-on hajtjuk végre. A három lépést 25–35-ször ciklikusan ismétljük, és a felszorzósítani kívánt DNS mennyisége minden ciklusban megduplázódik. A PCR során ma már hőstabil baktériumokból izolált DNS-polimeráz enzimeket alkalmazunk, amelyek képesek ellenállni a denaturációs szakasz magas hőmérsékletének, ennek köszönhetően nem szükséges minden ciklus után új enzimet adni a rendszerhez. A módszer során egy forward és egy reverz primerre van szükség. Mivel a forward és reverz primert egy reakcióban használjuk, fontos, hogy a két oligonukleotid tapadási hőmérséklete közel egyenlő legyen, illetve guanin-citozin százalékos arányának 40–60%-os tartományba szükséges esnie a megfelelő stabilitás érdekében.

3.4. Használt génbeviteli eljárások

A génbeviteli eljárások során DNS-t juttatunk valamilyen módon a sejtekbe [34]. Ezen módszerek közül a kísérleteimhez kettőre volt szükség: a hőtranszformálásra és az elektroporálásra.

3.4.1. Hőtranszformálás

A hőtranszformálás egy elterjedt módszer a plazmid DNS baktériumokba történő bevitelére. A folyamat során kompetens sejteket hozunk létre: a sejtek CaCl₂-os kezelése következtében a Ca²⁺ ionoktól pozitív töltések lesznek a sejt felszínén, amelyek odavonzzák a negatív töltésű DNS-t. Ezt követően a sejteket rövid ideig magas hőmérsékletre kell helyezni, amely hő sokkot idéz elő; a membrán fluiditása fokozódik, és a DNS bejut a sejt plazmába. A baktériumok regenerálódása után szelektív táptalajon tenyésztjük őket, hogy biztosan csak azon kolóniák jelenjenek meg a lemezen, amelyek befogadták a plazmid DNS-t, amely a táptalajnak megfelelő rezisztenciagéneket is hordozza.

3.4.2. Elektroporálás

Mivel a *Salmonella* sejtek transzformációjára a hő sokk nem elég hatékony, ezért egy hatékonyabb technika, az elektroporálás alkalmazása válik szükségessé. Az elektroporálás során a sejteket rövid ideig (~10 ms), 2-3000 V feszültségnek tesszük ki, amelynek hatására a sejt falban és a sejtmembránban átmenetileg lyukak keletkeznek, amelyeken keresztül a DNS-molekulák bejuthatnak a sejtekbe. Ezután a sejteket azonnal tápoldatba helyezzük a regenerálódás érdekében. Ezt a génbeviteli folyamatot az elektroporátor nevű készülékkel végezzük. A módszernél kifejezetten figyelni kell az elektromos impulzus hosszára és intenzitására, illetve a sókoncentrációra. Az előbbieket, ha nincsenek jól megválasztva, a sejteken lyukakat idéznek elő, az utóbbi pedig, ha túl magas, elektromos kisüléshez vezethet.

3.5. Gélelektroforézis

Az elektroforézis egy olyan eljárás, amelynek alapja, hogy elektromos térben az ionok vándorlási sebessége töltésük, alakjuk és méretük miatt eltérő, ennek köszönhetően ezeket el tudjuk választani [35]. Feltétele, hogy az elválasztandó molekula vagy elektromos töltéssel rendelkezzen, vagy ionizálható legyen. Az elektroforézis a biológiai makromolekulák, mint például a DNS és a fehérjék, méret szerinti elválasztására is szolgál. A gélelektroforézis során térhálós géleket alkalmazunk, amelyek feladata, hogy a diffúzió mértékét minimalizálják, illetve a részecskék mozgását lassítsák. Az utóbbiból következik, hogy a gél pórusméretét az elválasztandó molekula méretéhez kell igazítani.

3.5.1. Agaróz gélelektroforézis DNS elválasztására

Az agaróz gélelektroforézist tipikusan nukleinsavak elválasztására használjuk [36,37]. A módszer azon az elven alapul, hogy megfelelő pH-n (~8) a DNS-molekulák bázisonként egy-egy negatív töltést hordoznak, tehát a töltésük arányos a méretükkel, ezért a gélben a pozitív töltésű anód felé vándorolnak. A kisebb fragmentumok a gélben adott idő alatt messzebbre jutnak, mint a nagyobbak. A nukleinsavak méretük miatt akrilamid gélben nem választhatók el, helyette hordozóként a nagyobb pórusméretet biztosító agarózt használjuk, amelynek koncentrációja határozza meg a pórusméretet. A térhálós szerkezetet másodlagos kölcsönhatások alakítják ki. A DNS-molekulák mozgását a konformációjuk és a méretük egyaránt befolyásolják; a lineáris formák esetén a vándorlási sebesség fordítottan arányos a molekulatömeg logaritmusával. Az elválasztandó DNS-molekulák méretének meghatározására molekulalétrát használunk. A detektáláshoz a gél készítése során olyan fluoreszcens festéket adunk, amely a DNS-t UV-fényben láthatóvá teszi.

3.5.2. SDS-PAGE gélelektroforézis fehérjék elválasztására

A PAGE, azaz a poliakrilamid gélelektroforézis során a gélképző anyag az akrilamid, amely egy gyökképző anyag hatására polimerizálódik [35,38]. A folyamat katalizátor hozzáadásával gyorsítható, a térhálós polimer szerkezetet pedig bis-akrilamid hozzáadásával tudjuk kialakítani. Ahhoz, hogy a fehérjéket kizárólag méret szerint tudjuk elválasztani, a fehérjemintákat elő kell kezelnünk valamilyen redukálószerrel, például β -merkaptotetanollal a diszulfidhidak felbontása érdekében, illetve SDS-sel (nátrium-dodecil-szulfáttal), amely nemcsak kitekeri a fehérjéket, hanem azokat a lánc hosszával arányos mennyiségű negatív töltéssel látja el. Ilyenkor a negatív töltésű fehérjék vándorolnak a pozitív anód felé, és mozgásuk sebessége fordítottan arányos a molekulatömeg logaritmusával. A minták méretét egy viszonyítási alapot szolgáló molekulalétra segítségével tudjuk

meghatározni, amelyet a fehérjemintákkal azonos gélen szükséges lefuttatni. Az elválasztás végén a fehérjét megfestjük, és méretük alapján azonosítjuk azokat. Munkám során 12,5%-os géllal dolgoztam, amelynek elkészítésének protokollját a Függelék F.1 pontjában feltüntettem. A használt áramerősség egy géltre 30 mA volt.

3.6. Elektrokémiai vizsgálati módszerek

Az előállított fehérjét arany szenzorfelületen immobilizáltuk, és így vizsgáltuk a higanykötő képességüket. A szenzor megtisztításához, karakterizálásához és a felületmódosulások – mint a fehérje rögzítése, higany kötődése – detektálásához két elektrokémiai technikát alkalmaztunk: ciklikus voltammetriát (CV) és elektrokémiai impedancia spektroszkópiát (EIS).

3.6.1. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetria (CV) egy olyan elektroanalitikai módszer, amelyet redox folyamatok vizsgálatára alkalmaznak [39]. A mérés során három elektródot használnak: a munka-, referencia- és a segédelektrodát. A technika alapelve, hogy a munkaelektrod potenciálját egy meghatározott tartományban folyamatosan növelik, majd visszafordítják a kiindulási értékre, miközben az átfolyó áramot mérik. Munkám során a szenzor arany felületének megtisztítása és karakterizálása CV-vel történt. A folyamat során az arany felület először oxidálódik (Au_2O_3 képződik), majd a potenciál visszaállításával redukálódik, és több ciklus lefuttatása után a felület teljesen tiszta és elektrokémiailag aktív lesz. Ezen folyamatok a ciklikus voltammogramon követhetők nyomon, amelyen az oxidációs és redukációs csúcsokat lehet elkülöníteni.

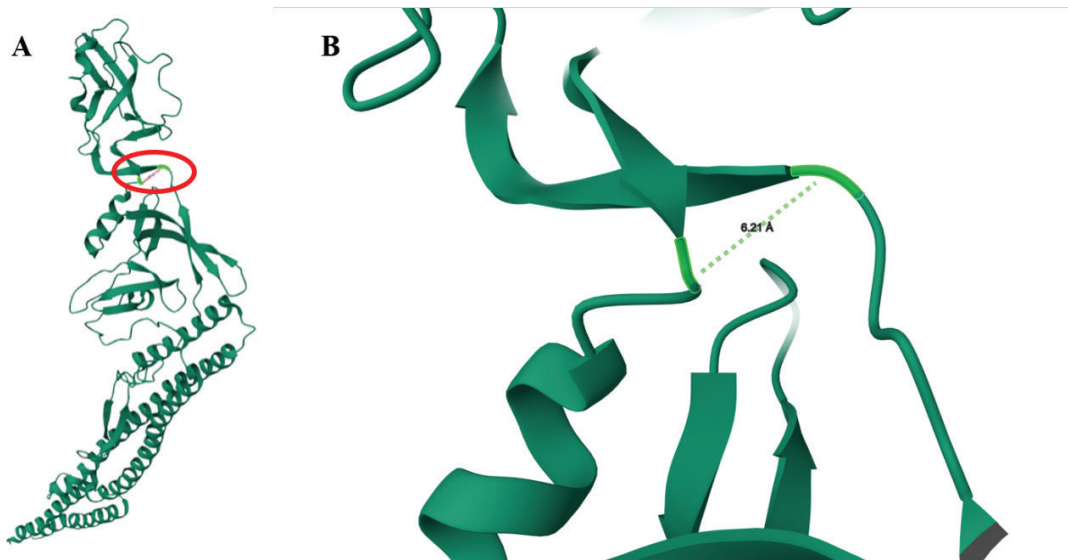
3.6.2. Elektrokémiai impedancia spektroszkópia

A bioreceptor fehérje felületre rögzítésének hatékonyságát, illetve a higany kötését elektrokémiai impedancia-spektroszkópiával (EIS) vizsgáltuk, amely a rendszer ellenállásáról és kapacitív tulajdonságairól ad információt [40,41]. A mérés során a kicsi, szinuszosan váltakozó feszültség alkalmazására a rendszer által válaszként adott áramot mérjük, és a kísérletet több frekvencián megismételjük. A kapott eredményeket egy impedanciagörbén, az úgynevezett Nyquist-diagramon lehet leolvasni. A jel értelmezésében fontos szerepet játszik a töltésátadási ellenállás, amely arról ad információt, hogy milyen mértékben gátolt az elektronátadás az elektrolit oldat és az elektród között. Ennek értéke arányos a felület borítottságával. Minél nagyobb a töltésátadási ellenállás, annál lassabb az elektrontranszfer, amelyet a görbe nagyobb átmérője jelez.

4. Elvégzett kísérletek és eredmények

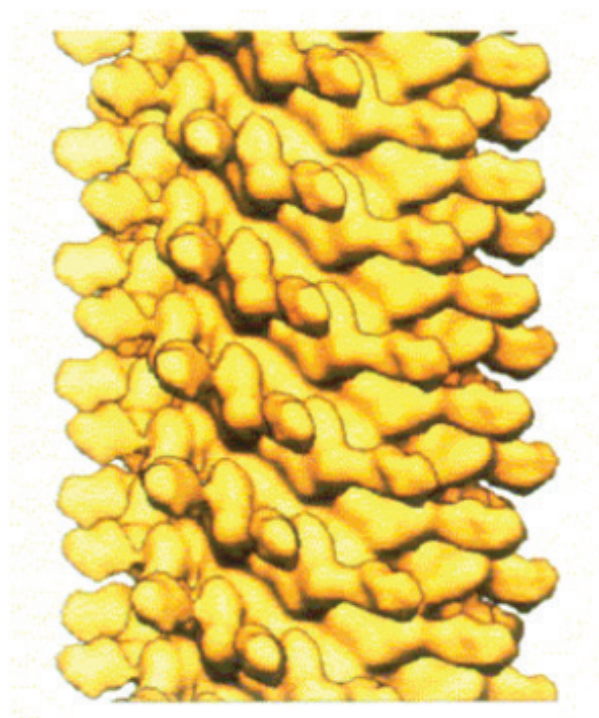
4.1. Higanykötő fehérjék keresése és flagellinbe építésük megtervezése

A flagelláris filamentumokat alkotó flagellin alegységek négy doménből épülnek fel, amelyek közül a D3 domén a filamentum felszínén helyezkedik el. Mivel ez a domén nem játszik szerepet a monomerek polimerizációjában, ezért módosíthatjuk vagy más fehérjékkel, peptidekkel helyettesíthetjük, és ily módon funkcionálizáljuk. A *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* flagellin fehérjében a D3 domén a 190–284. aminosavak közé esik [20]. Ha ennek helyére más fehérjét szeretnénk beépíteni úgy, hogy a polimerizációra való képességet nem befolyásoljuk, a helyettesítő fehérje vagy peptid terminális aminosavai közti távolságnak a lehető legközelebb kell lennie a D3 domén terminálisainak távolságához. A *Salmonella* flagellin térszerkezete ismert [18], a Protein Data Bank (PDB) adatbázisban azonosítója: 1UCU. A szerkezeti ábra és az adatbázis által nyújtott lehetőségek segítségével egy fehérjén belül meghatározható tetszőleges aminosavak távolsága. Így meg tudtam mérni, hogy a flagellinben a 189. pozícióban lévő glicin és a 285. aminosav, az aszparagin távolsága 6,21 Å (4.1. ábra).



4.1. ábra: (A) A flagellin szerkezete, pirossal jelölve a D3 domén kapcsolódási helye a fehérje többi részéhez. (B) A Gly189 és Asn285 távolsága. PDB ID: 1UCU [18].

A flagellin funkcionálizálásához olyan higanykötő fehérjéket, illetve fehérjemotívumokat kerestem, amelyek mérete hasonló vagy kisebb a D3 doménéhez. A natív filamentumok felszínén a D3 domének szorosan, sűrűn pakolva helyezkednek el (4.2. ábra), ezért ha túl nagy a beépített motívum, akkor a flagellin variáns monomerei nem tudnak megfelelően polimerizálódni. A membránfehérjéket kizártam a keresésből, mivel azok hidrofób tulajdonsága vélhetőleg csökkentené a flagellin variáns oldhatóságát vizes pufferoldatban, ami a polimerizáció közege.



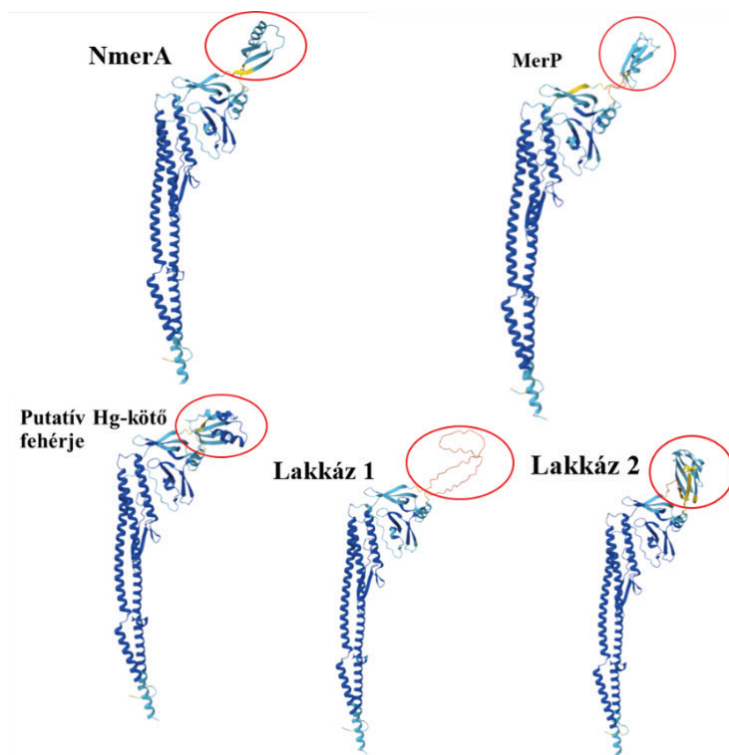
4.2. ábra: A filamentum krio-elektronmikroszkópos szerkezete. Látható, hogy a felszíni D3 domének sűrűn pakoltak [42].

A fenti szempontok alapján az 1.3 fejezetben bemutatott higanykötő fehérjék közül négyet választottam ki: az NmerA-t és a MerP-t, illetve a putatív Hg-kötő fehérjét és a lakkáz enzimet. A fehérjékben olyan Hg-kötőhelyet tartalmazó aminosavszekvenciákat kerestem, amelyekben az első és utolsó aminosav egymástól való távolsága a 6,21 Å távolságnak a közelében van (1. táblázat). Ügyeltem arra is, hogy a D3-deficiens flagellin és a kötőmotívum összeillesztése a legkisebb hatással legyen a kötőhely környezetének feltekeredésére. Ehhez a flagellinbe illesztendő fehérjerészt úgy választottam, hogy a kötőmotívum minél messzebb legyen annak terminális aminosavaitól. A természetes fehérjékben a higanyt preferáltan kötő aminosav a cisztein. A cisztein-tartalmú fehérjékkel való munka (különösen, ha azok nem a térszerkezet kialakításához szükséges diszulfidhidas kötésben, hanem szabadon fordulnak elő) nehézségekbe ütközhet a fehérjék aggregálódása miatt, ami a bioszenzorikai alkalmazási lehetőségeket is korlátozhatja. Ezért a lakkáz enzimből azt a szekvenciát is kiválasztottam, amelyben cisztein helyett metionin köti a higanyt, ezt egyes számmal jelöltem.

1. táblázat: A Hg-kötő fehérjékből a D3 domén helyére beillesztésre kiválasztott kötőmotívumok és bennük a terminális aminosavak távolsága

| Fehérje | Szekvencia | Távolság |
|-------------------------|-----------------|----------|
| NmerA | Thr 2-Ile 44 | 5,88 Å |
| MerP | Ala 1-Asp 48 | 5,33 Å |
| Putatív Hg-kötő fehérje | Leu 6-Pro 69 | 5,79 Å |
| Lakkáz 1 | Glu 255-Ala 297 | 5,70 Å |
| Lakkáz 2 | Asp 349-Gly 434 | 6,23 Å |

A kiválasztott Hg-kötő peptidmotívumok és a D3-deficiens flagellin szekvenciája alapján létrehoztam a szintetizálendő variánsok polipeptidláncát, és ezek valószínűsíthető térszerkezetét az AlphaFold Server adatbázis segítségével [43] modelleztem, amelyet a 4.3. ábra szemléltet. A beépítendő szekvenciák mindegyikében a két terminális aminosav távolsága megközelítőleg 6,21 Å, illetve a kötőmotívumok a láncvégekhez képest a lehető legtávolabb helyezkednek el. Ennek köszönhetően ezek a motívumok szerkezetileg alkalmasak a D3 domén helyére történő beépítésre, ezért szintetizáltattuk a teljes fehérjék *E. coli*-ra kodonoptimalizált génjeit.



4.3. ábra: Az AlphaFold által modellezett módosított flagellin fehérje térszerkezetek, amelyeken a D3 domén helyére beépítendő Hg-kötő peptidmotívumokat pirossal karikáztam be [43].

4.2. A potenciális Hg-kötő flagellin variánsokat kódoló plazmidok létrehozása génszabályozási eszközökkel

Az 5 potenciális higanykötő motívum mindegyikét beépítettem a pKOT-delD3-mcs plazmid többszörös klónozó helyére, amelynek lépéseit a következő alfejezetekben taglalom.

4.2.1. A higanykötő szekvenciákat kódoló gének felszorzása PCR módszerrel

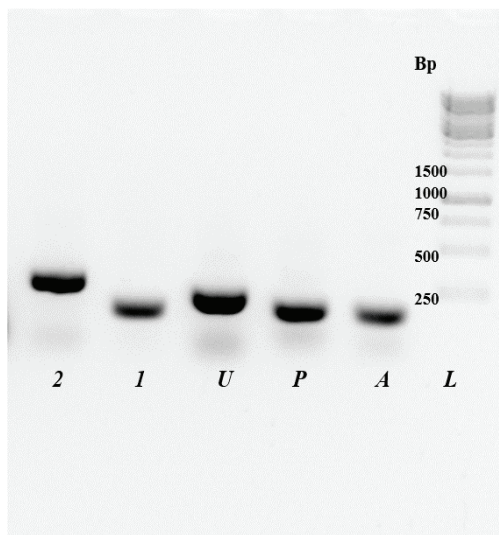
A higanykötő szekvenciákat kódoló géneket egy olyan, a kutatócsoportban korábban kifejlesztett pBR322-alapú plazmidba építettem be, amely a *Salmonella* baktériumban való fehérje-expressziót szabályozó régiók mellett egy olyan flagellin variáns génjét tartalmazza, amelyben a D3 domént kódoló génszakasz helyén egy többszörös klónozó hely (MCS) található (pKOT-FliC-delD3 mcs) [44]. A kódoló DNS-szekvenciákat az MCS XhoI- és SacI-restrikciós enzimek hasítóhelyei közé terveztem beépíteni, ezért a PCR-felszorzáshoz olyan primereket terveztem, melyek a szekvenciák megfelelő végeire XhoI- és SacI-endonukleázok hasítóhelyeit fűzik. Az enzimek optimális működéséhez a vágóhelyek elé egy négy nukleotidból álló egységet helyeztem. A lehetséges primerek tapadási hőmérsékletét

és a guanin-citozin arányát a NEB Tm Calculator weboldal segítségével optimalizáltam [45]. Az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies-tól rendeltük meg. A fehérjéket kódoló liofilizált géneket feloldottam 100 µl steril desztillált vízben, a primereket pedig 100 µmol/l térfogatra hígítottam, majd mindegyiket vortexeltem és centrifugáltam. A következő lépésben a primerekből készítettem egy tízszeres hígítást 100 µl végtérfogatban. Ezután összeállítottam a PCR-hez szükséges elegyeket, amelyek 28,5 µl steril desztillált vízből, 10 µl Q5 pufferből, 5 µl 2 mM dNTP-ből, 2,5–2,5 µl forward és reverz primerből, illetve az 1 µl templátból és 0,5 µl Q5-DNS-polimerázból álltak. A reakció során a DNS denaturálását 98 °C-on 30 másodpercig végeztük, majd a program 30 cikluson keresztül ismétlődött, amely 98 °C-on 10 másodperces denaturálásból, a *merA*, *merP*, *lakkáz 1* gének esetében 65 °C-os, míg a *putatív higanykötő variáns* és a *lakkáz 2* esetén 69,5 °C-os, 30 másodperces anellálási lépésből (a Q5-DNS-polimerázra optimalizált hőmérsékletek a NEB Tm Calculator oldal alapján meghatározva), valamint egy 72 °C-on 30 másodpercig tartó polimerizációs szakaszból állt. A reakciót végül egy 72 °C-on, 120 másodpercig zajló végső lépés zárta le.

Miután a reakció végbement, annak eredményét 1,2%-os agaróz gélen elválasztva ellenőriztem (4.4. ábra). A 2. táblázatban összefoglaltam, hogy melyik variáns hány bázispárt tartalmaz a reakciót követően.

2. táblázat: A PCR-termékek bázispárjainak a száma

| PCR-termék | <i>nmerA</i> | <i>merP</i> | <i>putatív higanykötő fehérje</i> | <i>lakkáz 1</i> | <i>lakkáz 2</i> |
|----------------------------------|--------------|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Mérete [bázispárok száma] | 149 | 164 | 212 | 149 | 278 |



4.4. ábra: A PCR eredményeképp létrejött higanykötő génszekvenciák agaróz gélen lefuttatva. Jelmagyarázat: L a GeneRuler 1 kb DNS-létra, A: *nmerA*, P: *merP*, U: *putatív Hg-kötő*, 1: *lakkáz 1*, 2: *lakkáz 2* higanykötő génszakasz.

A gélkép szerint minden PCR-termék a megfelelő mérettartományba esett, tehát a 149–278 bázispárnyi intervallumba.

4.2.2. A pKOT-delD3-mcs plazmid és a Hg-kötő peptideket kódoló inzertek restrikciós emésztése és ligálása

A PCR-termékek megtisztítását a Monarch PCR&DNA Cleanup Kittel végeztem el a gyártó által megadott protokoll szerint. A pufferrel 5:1 arányban elegyítettem, a mosáshoz a végén 30 µl steril desztillált vizet használtam.

Ezt követően a Hg-kötő flagellin variánsokat kódoló plazmidok létrehozásához az inzert DNS-eket és a pKOT-delD3-mcs plazmidot XhoI- és SacI-restrikciós enzimekkel emésztettem. Az emésztési elegyek összetételét a 3. táblázatban tüntettem fel. Az emésztés 37 °C-on 1,5 óráig tartott.

3. táblázat: A restrikció emésztéshez szükséges elegyek

| Név | Steril desztillált víz [µl] | CutSmart puffer [µl] | SacI-HF [µl] | XhoI [µl] | DNS [µl] |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------|-----------|----------|
| <i>nmerA</i> | - | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>merP</i> | - | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>put. Hg-kötő fehérje</i> | - | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>lakkáz 1</i> | - | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>lakkáz 2</i> | - | 1 | 1 | 1 | 7 |
| <i>plazmid</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 |

Másfél óra elteltével az emésztett termékeket Monarch PCR&DNA Cleanup Kittel megtisztítottam, az arányokat a leírásban javasoltak szerint alkalmaztam. A tisztított, emésztett oligonukleotidokat ezt követően a ligálási reakcióhoz használtam fel. A plazmid és az inzertek ligálását mind az öt variáns esetében párhuzamosan végeztem el. A következő elegyeket állítottam össze:

- 5 µl emésztett inzert
- 2 µl emésztett vektor
- 2 µl 5x Ligation Rapid Buffer
- 1 µl T4 DNS-ligáz

A ligálás 22 °C-on, 10 percig zajlott.

4.2.3. TOP10 *E. coli* sejtek transzformálása a módosított plazmidokkal

A ligálással létrehozott plazmidok felsokszorozásához azokkal TOP10 *E. coli* sejteket transzformáltam. Ehhez a kompetens TOP10 *E. coli* sejteket 10 percre jégre tettem, majd minden ligálási elegyből 5 µl-t tettem egy-egy sejt alikvothoz. Ezután jégre tettem őket 30 percre.

Az idő letelte után 1,5 percre a 42 °C-os vízfürdőbe tettem a sejtes plazmidos elegyet, aztán 2 percre jégre, majd 500 µl meleg SOC tápoldatot adtam hozzájuk, és 60 percen át, 275 rpm-en, 37 °C-on rázattam az elegyet. A következő lépésben steril fülke alatt ampicillint tartalmazó LB-lemezekre szélesztettem a már elméletileg öt fajta plazmidot tartalmazó sejtekből 100 µl-t, végül ezeket egy éjszakán át inkubáltam 37 °C-on.

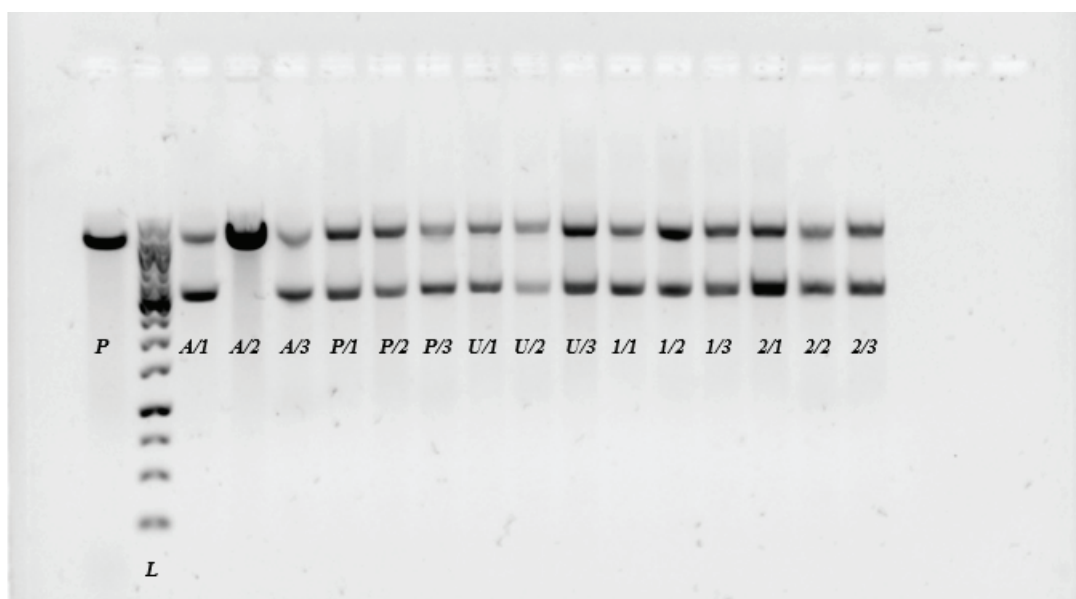
A transzformáció eredményeként másnap mind az öt lemezen rengeteg kolóniát láttam. Mindegyik lemezről választottam három kolóniát, amelyeket átoltottam 5 µl ampicillint tartalmazó 5 ml LB-be, és 16 órán keresztül rázattam 37 °C-on.

4.2.4. Plazmidok izolálása a kolóniákból

A sejtekből a plazmid tisztítást a Monarch Plasmid Miniprep Kit segítségével végeztem el, a gyártó utasításait követve. Az elúciós lépésnél 30 µl steril desztillált vizet használtam.

A ligálás sikerességéről ellenőrző emésztéssel győződtem meg. Ehhez AgeI-HF restriktációs enzimet használtam, amely csak azokat a plazmidokat hasítja, amelyekbe nem épült be inzert. Az emésztés eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az emésztéshez 2 µl plazmidot, 1-1 µl AgeI-HF enzimet és CutSmart puffert, illetve 6 µl steril desztillált vizet használtam fel, és 1 órán át 37 °C-on emésztettem. Ezt követően az emésztési elegyet 0,8%-os agaróz gélen választottam el. A gélkép (4.5. ábra) alapján csak az „A/2” jelű plazmid nyílt fel az AgeI emésztés hatására, így a többiből minden típusból kettőt küldtünk DNS-szekvenálásra.

A szekvenálással meghatározott szekvenciák egyértelműen igazolták, hogy minden esetben helyesen épült be az inzert DNS a plazmidba.



4.5. ábra: A TOP10 *E. coli* kolóniákból kitisztított és AgeI enzimmel emésztett plazmid DNS-ek agaróz gélen elválasztva. Jelmagyarázat: A P az emésztett pKOT-delD3-mcs plazmidot jelöli, az L a GeneRuler 1 kb DNS-létrát, az A az NmerA, P a MerP, az U a Putatív Hg-kötő, az 1 a Lakkáz 1, és a 2 a Lakkáz 2 variánst kódoló plazmidok, a „/” karakter után a kolóniák sorszáma

4.2.5. Elektrokompetens flagellin deficiens SJW2536 *Salmonella* sejtek készítése

Az elektrokompetens flagellin deficiens SJW2536 *Salmonella* sejtek elkészítéséhez készítettem 60 ml LB-táppoldatot egy 250 ml-es lombikba, illetve 55 ml 10%-os glicerindatot. Ezt követően minden kelléket, tehát a pipettahegyeket, pipettákat, Eppendorf csöveket és a két elkészített oldatot sterilizáltam autoklávban 121 °C-on 30 percig. A fagyasztóból kivett sejteket steril fülke alatt 20 ml LB-táppoldatba oltottam át. Ezután 16 óráig 250 rpm-en rázattam 37 °C-on. A következő nap a tenyészetből 300 µl-t átoltottam 60 ml LB-be, majd 2,5 óráig rázattam 37 °C-on. Amikor az idő lejárt, steril fülke alatt két Falkon csőbe elosztottam egyenlő arányban a sejtes elegyet, majd 6 °C-on 10 percig, 4000 rpm-en centrifugáltam. Utána ismét lamináris fülke alatt dolgoztam: a felülúszót eltávolítottam, és a sejteket 10–10 ml, 4 °C-ra hűtött glicerindatban szuszpendáltam, majd ismét centrifugáltam. Ezt a lépést megismételtem: a felülúszót lepipettáztam, és a csapadék glicerines oldása után a két Falkoncsövet a centrifugába tettem. Ezután eltávolítottam a felülúszót, azonban már csak 5–5 ml glicerindattal szuszpendáltam. Centrifugálás után a felülúszót lepipettáztam, és a sejtcsapadékot 600 µl glicerindattal szuszpendáltam, végül azt 50 µl-es egységenként 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe adagoltam, és a -80 °C-os fagyasztóba tettem.

4.2.6. Plazmidok elektroporálása SJW2536 *Salmonella* sejtekbe

Mivel a cél a módosított filamentumok *Salmonella* sejteken történő termeltetése volt, ezért az öt variáns kódozó plazmid DNS-t elektroporálással juttattam elektrokompetens SJW2536 sejtekbe. Az SJW2536 sejteket, a plazmid oldatát, az elektroporáláshoz szükséges küvétát és az 500 µl SOC táppoldatot jégen inkubáltam. 1 µl plazmidot pipettáztam 50 µl elektrokompetens sejtre, és óvatosan elkevertem a pipettahegygel, majd 1 percig pihentettem jégen. Ezt követően az elegyből 53 µl-t pipettáztam a küvétába, és beraktam a készülékbe, majd 10 ms-ig 2500 V-on elektroporáltam. Ezután azonnal SOC-táppoldatot adtam hozzá, szuszpendáltam Eppendorf csőben, 60 percig inkubáltam 37 °C-on, 275 rpm rázatással. Miután letelt az egy óra, a sejtekből 50 és 450 µl-t szélesztettem a lemezekre, és 16 órán át inkubáltam őket 37 °C-on. E protokoll szerint dolgoztam mind az öt különböző genetikai információt tartalmazó plazmid esetén. Másnapra láthatóvá váltak a kolóniák a lemezeken.

4.3. A potenciális higanykötő flagellin variánsok termeltetése és polimerizációs képességének vizsgálata

Ebben a fejezetben a potenciális higanykötő fehérjevariánsok expresszióját és filamentumképző képességét mutatom be. A kísérleteket először kis térfogatú tenyészetekben végeztem el, majd ugyanezeket a vizsgálatokat a körülmények módosításával is megismételtem, az optimális termelési paraméterek meghatározása érdekében. Ezt követően a legígéretesebb körülmények mellett nagy térfogatban is előállítottam filamentumokat.

4.3.1. A flagellin variánsok termelődésének tesztelése kis térfogatú tenyészetben

A vad típusú flagellin monomer a *Salmonella* baktérium felszínén filamentummá polimerizálódik. A D3 domén más fehérjével való helyettesítése azonban befolyásolhatja a flagellin variáns polimerizációs képességét. Ennek következményeképp azok a sejtekben maradhatnak monomer vagy aggregált formában, vagy nem képesek beépülni a sejtfelszíni filamentumba, és ezért kikerülnek a táppoldatba szintén monomer vagy letört filamentum darabok formájában. Ezekkel az eshetőségekkel

számolva kis térfogatú tenyészetekben minden higanykötő variánsra megvizsgáltam, melyik esetben hol és milyen formában halmozódik fel a fehérje. Ezeket a vizsgálatokat minden variánsra hasonló módon, az alábbiak szerint kiviteleztem.

Először átoltottam a *Salmonella* sejteket 5 ml ampicillint tartalmazó LB-tápoldatba, és 16 órán át rázatva inkubáltam 37 °C-on, 275 rpm-en. Másnap a tenyésztett sejtszuszpenziókból 500 µl-t 15%-os glicerines közegben -80 °C-on eltároltam a törzs fenntartása érdekében.

A sejtszuszpenziókból kivettem 20 µl-t, és ezt ugyanennyi SDS-PAGE mintapufferrel főztem ki 10 percig (**S1** minta az elektroforézishez). Ugyanígy készítettem elő elektroforézisre minden később, a fehérjetermelés során vett mintát.

A sejtszuszpenziókból vett mintákban sötét látóterű mikroszkóppal vizsgáltam az adott baktériumok úszási képességét, amelyből a sejtfelszíni filamentum képződésre lehet következtetni.

A tenyészetek optikai denzitását 600 nm-en (OD_{600}) spektrofotométerrel határoztam meg, amelyet a termelődött fehérje mennyiségével összehasonlítva tudtam következtetni az expresszió hatékonyságára.

Végül a tenyészet 2 ml-ét arra használtam, hogy meghatározzam az adott flagellin variáns felhalmozódásának helyét. Ezeket a mintákat 6000 g-n, 6 °C-on fél óráig centrifugáltam, majd a csapadékot (amely a sejteket és a rajtuk lévő filamentumokat tartalmazza) és a felülúszót (amely a monomereket és a letört filamentumokat tartalmazza) külön vizsgáltam tovább.

A csapadékot 200 µl Tris (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8) pufferben szuszpendáltam, majd 70 °C-on 10 percig hőkezelttem a filamentumok monomerizálása céljából. Ezt követően 70 000 rpm-en, 10 °C-on fél órán át ultracentrifugáltam a mintákat (TLA-120.2 rotorral). A felülúszót SDS-PAGE mintapufferrel elegyítve és főzve előkészítettem az elektroforézisre (**S2** minta). Ez tartalmazta az eredetileg sejteken lévő filamentumokat; így a flagellin legnagyobb koncentrációja ebben volt várható az összes frakció közül. A csapadék rész tartalmazta a baktériumokat, ehhez 200 µl puffert adtam és előkészítettem gélelektroforézisre (**S5**).

A kiindulási tenyészet első centrifugálásából nyert felülúszót ultracentrifugáltam, szintén 70 000 rpm-en, 10 °C-on fél óráig. Az így kapott csapadék tartalmazta a letört filamentumokat; a felülúszó pedig a termelés során a tápközegbe kijutott flagellin monomereket. Mindkettőt mintapufferrel kevertem, és 10 percig főztem; előbbit **S3**-nak, az utóbbit **S4**-nek neveztem el.

Az S1, S2, S3, S4, S5 mintákat SDS-PAGE gélelektroforézissel választottam el. A továbbiakban az egyes variánsokra kapott eredményeket mutatom be.

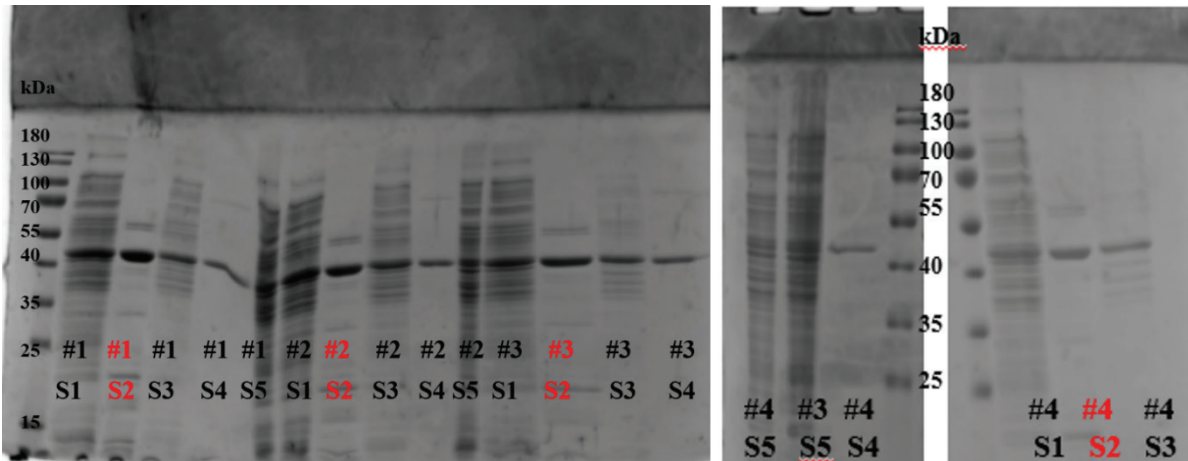
4.3.2. Az NmerA flagellin variáns termelődésének vizsgálata

Az NmerA flagellin variáns molekulatömege 47 kDa. A filamentum termelés vizsgálatához négy különböző sejtenyészetet hasonlítottam össze. A sötét látóterű mikroszkópos vizsgálat alapján azt találtam, hogy a hármas és a négyes tenyészet kevesebb sejtet tartalmazott, ugyanakkor a baktériumok gyenge motilitása (pörgés) arra utalt, hogy a sejtek életképesek, és flagellummal rendelkeznek. A sejtenyészetek optikai denzitását is lemértem háromszoros hígítással, majd a legvégén visszszámoltam belőle, ezen eredményeket a 4. táblázatban jelenítettem meg. Mivel a tenyészetek abszorbancia értéke közel azonos volt, feltételezhető, hogy a sejtszámok nem térnek el jelentősen, így az esetleges expressziós különbségek nem a sejtsűrűségből adódnak.

4. táblázat: Az NmerA fehérjevariánst termelő sejtek tenyészeiben mért optikai denzitás

| Minta elnevezése | OD ₆₀₀ [-] |
|------------------|-----------------------|
| A1 | 2,5 |
| A2 | 2,5 |
| A3 | 2,5 |
| A4 | 2,4 |

A kísérletsorozatban összegyűjtött mintákat SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottam (4.6. ábra).



4.6. ábra: Az NmerA flagellin variáns termelődésének vizsgálata SDS-PAGE-n. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

A gélképeken megfigyelhető, hogy a tenyészetek filamentum termelése között nem volt jelentős különbség. Fontos megjegyezni, hogy az S1 tenyészetes mintákhoz képest az S3 minták százszoros, az S2, S5 minták tízszeres töménységűek. Az S2 mintáknál minden tenyészetben megfigyelhető egy markáns sáv, amely 40–55 kDa közé esik. Ez az érték összhangban van azzal, hogy az NmerA flagellin variáns 47 kDa nagyságú. A sávok méretének és intenzitásának hasonlósága megbízható és egyenesen expressziót jelez. Ez adja a legerőteljesebb jelet az egész gélképen, amely arra utal, hogy a filamentumok legnagyobb mértékben a sejtekhez kötötten termelődtek. A gél eredményei alapján az is megállapítható, hogy a letört filamentumokat tartalmazó frakció (S3) volt jelen a legkisebb arányban, amit a sávok gyenge intenzitása támaszt alá. A fehérjék monomer formában is (S4) kikerültek a tápoldatba, azonban ezek mennyisége nem számottevő. A baktériumos frakcióban a megfelelő elválasztásnak köszönhetően már nem detektálhatók a flagellin fehérjék. A gélkép megerősíti a mikroszkópos megfigyeléseket, amelyek szerint a sejtek enyhe motilitása a flagellumok jelenlétére utal. Az eredmények összességében azt igazolják, hogy az NmerA flagellin variáns megfelelően expresszáldott a sejtfelszínre.

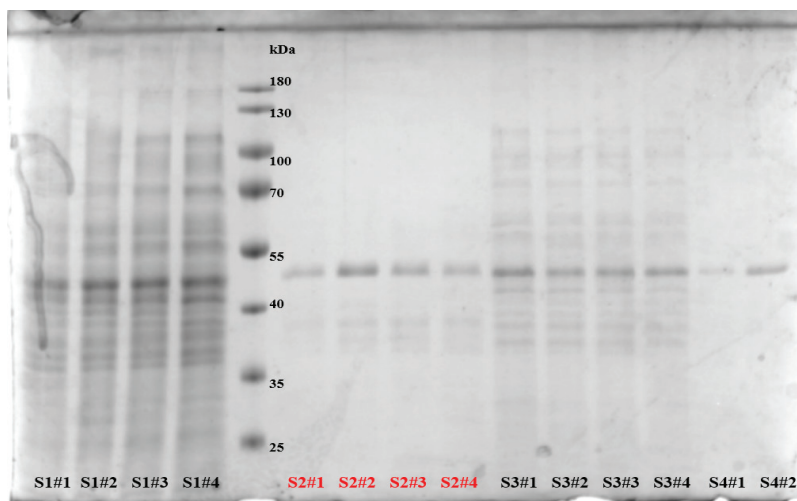
4.3.3 MerP variáns termelődésének vizsgálata

A 47,5 kDa méretű MerP fehérje expresszióját négy különböző tenyészetből származó sejttenyészetben vizsgáltam. Sötét látóterű mikroszkóppal végzett megfigyeléseim alapján mindegyik tenyészet sok, hasonló méretű sejtet tartalmazott, amelyek pörgése a flagellumok jelenlétét jelezte. Az optikai denzitást az 5. táblázatban rögzítettem. A P1 és a P4 sejtmintákból négyszeres hígítással, a P3-ból háromszoros és végül a P1-ből kétszeres hígítással mértem. Az eredmények alapján arra következtettem, hogy az első és a negyedik tenyészet tartalmazta a legtöbb sejtet, amely indokolhatja az esetlegesen eltérő fehérje expressziót.

5. táblázat: A MerP fehérjevariánst termelő sejtek tenyészeiben mért optikai denzitás

| Minta elnevezése | OD ₆₀₀ [-] |
|------------------|-----------------------|
| P1 | 3,0 |
| P2 | 2,0 |
| P3 | 2,7 |
| P4 | 3,2 |

Az elkészített minták fehérjéit elválasztottam SDS-PAGE gélelektroforézissel (4.7. ábra).



4.7. ábra: Az MerP flagellin variáns termelődésének vizsgálata SDS-PAGE-n. S1 a sejttenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött, és arról izolált filamentumokat várjuk.

A gélképen az S2 minták, habár nem olyan erős intenzitással, de megfigyelhetők a megfelelő mérettartományban, 40–55 kDa között. A sávintenzitások alapján a második tenyészetben épültek ki a sejtek felszínére a legnagyobb mértékben a filamentumok. A letört polimerek kis arányban voltak jelen a tápoldatban, és a fehérjék monomer formában is kijutottak a sejtek környezetébe.

A mikroszkópban látott gyenge motilitás összhangban áll a gélképpel, miszerint a sejtek rendelkeztek bakteriális ostorral. Az optikai denzitás eredményekkel összevetve, a MerP flagellin variánsnál úgy tűnik, hogy hiába a második tenyészet sejtsűrűsége volt a legkisebb, a filamentum termelés mégis fokozottabban működött. Ez azzal magyarázható, hogy az alacsonyabb sejtszám miatt a tápanyag-ellátottság kedvezőbb lehetett, amely intenzívebb fehérje-előállítást tett lehetővé. Összességében megállapítható, hogy habár a MerP flagellin variáns termelődése igazolható, ugyanakkor a termelési paraméterek optimalizálást igényelnek a nagyobb hozamú fehérjetermeléshez.

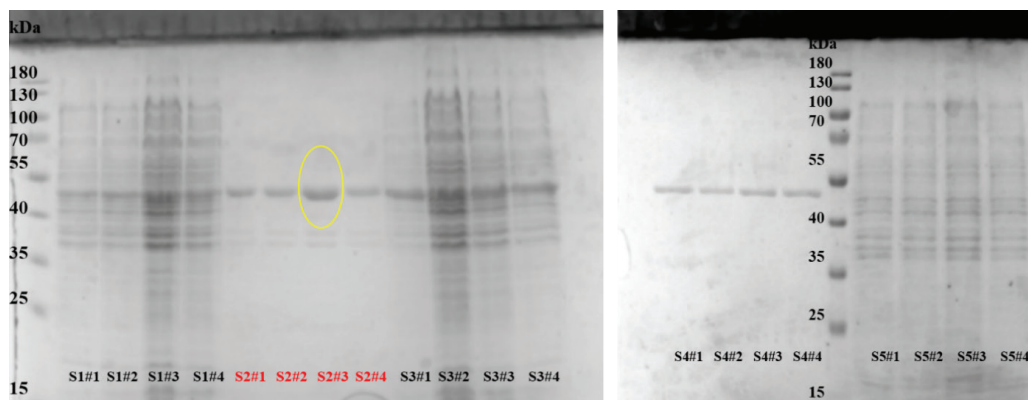
4.3.4. Putatív higanykötő variáns termelődésének vizsgálata

A putatív higanykötő variáns 49,2 kDa nagyságú. Ismét négy tenyészetet vizsgáltam. A sötét látóterű mikroszkópos vizsgálat során mindegyik mintám, különösen a negyedik esetén sok sejtet figyeltem meg. A sejtek nem úsztak, csak forgó és vibráló mozgást végeztek, amely jelezte az életképességüket és valószínűsíthetően a filamentumok jelenlétét. Az OD-mérést az U1–U3 mintáknál háromszoros, az U4 mintánál négyszeres hígítással végeztem, majd visszaszámoltam az értékeket. Az eredmények alapján (6. táblázat) arra következtettem, hogy a legkevesebb mennyiségű sejtet szintén a harmadik minta tartalmazta.

6. táblázat: A putatív Hg-kötő fehérjevariánst termelő sejtek tenyészeiben mért optikai denzitás

| Minta elnevezése | OD ₆₀₀ [-] |
|------------------|-----------------------|
| U1 | 2,6 |
| U2 | 2,6 |
| U3 | 2,2 |
| U4 | 3,6 |

A mintákat gélelektroforézissel elválasztottam (4.8. ábra).



4.8. ábra: A putatív higanykötő flagellin variáns termelődésének vizsgálata SDS-PAGE-n. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

A géleképen látható, hogy a sejtek felszínén felépült filamentumokat tartalmazó frakciók a megfelelő mérettartományban helyezkednek el, és a harmadik tenyészetből származó minta tartalmazta a legtöbb módosított flagellin fehérjét. A sejtekről mind a négy tenyészet esetén törtek le filamentumok, azonban csupán kis arányban. A tápoldatba került monomerek mennyisége mindegyik frakció esetén hasonló. A putatív higanykötő variáns esetében, ahogyan az előző alfejezetben bemutatott MerP variáns esetében is, ismét az a tenyészet termelte a legtöbb fehérjét, amelyikben a sejtszám vélhetően a legkisebb volt.

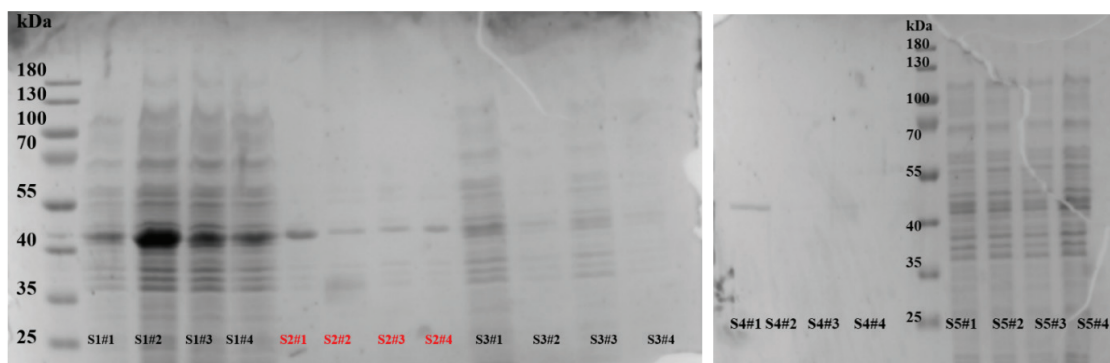
4.3.5. Lakkáz 1 variáns termelődésének vizsgálata

A 47 kDa nagyságú Lakkáz 1 fehérjevariáns kisméretű termeltetésénél ismét négy tenyészetet hasonlítottam össze. A sötét látóterű mikroszkópos megfigyelések alapján a baktériumok pörögtek maguk körül, ami a flagelláris nanomotor működésére utal. A sejtek optikai denzitását is megmértem, amely során négyszeres hígítást alkalmaztam. A 7. táblázat a visszaszámolt értékeket tartalmazza. Az értékekből azt feltételeztem, hogy az első tenyészetben kisebb sejtsűrűség alakult ki, mint a többi háromban. Korábbi megfigyeléseim alapján ez fokozottabb filamentum termelésre utalt.

7. táblázat: A Lakkáz 1 fehérjevariánst termelő sejtek tenyészeteiben mért optikai denzitás

| Minta elnevezése | OD ₆₀₀ [-] |
|------------------|-----------------------|
| 1. | 3,0 |
| 2. | 3,8 |
| 3. | 3,8 |
| 4. | 3,0 |

A mintákban lévő fehérjéket gélelektroforézissel elválasztottam (4.9. ábra).



4.9. ábra: A Lakkáz 1 flagellin variáns termelődésének vizsgálata SDS-PAGE-n. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött, és arról izolált filamentumokat várjuk.

A gélfuttatás eredményei némileg ellentmondásosnak bizonyultak: míg a 2–4. tenyészetes kolóniák esetében (S1#2-S1#4), a flagellinre jellemző, ~47 kDa körüli sáv markánsan megjelent, ugyanakkor a többi (S2-S5) frakcióban a fehérje mennyisége jelentősen csökkent, vagy egyáltalán nem volt detektálható. Különösen érdekes, hogy a második tenyészetből, amelyből az S1 minta alapján elvileg a legtöbb flagellin variáns termelődött, a sejt felszínére felépült, és az arról letört filamentumok rendkívül kis mennyiségben, monomerek pedig szinte egyáltalán nem jutottak ki a tápoldatba. A monomerek egyedül az első sejttenyészetben voltak jelen. Meglepő továbbá, hogy az S2 frakciók közül a legintenzívebb sávot az első sejttenyészet adja, amelynek az optikai denzitása a legkisebb értékkel bírt, azonban ez ellentétben áll a sejttenyészetes minta eredményével (S1#1). Összefoglalva, habár a Lakkáz 1 flagellin variáns valamilyen szinten képződött a sejtekben, a kimutatható fehérjék jelentős mennyisége a frakcionálás után eltűnt, ez valamilyen, az elválasztási folyamatok során bekövetkezett hibára, a filamentumok instabilitására vagy a feldolgozás közbeni degradációra utal. Az ellentmondások miatt ez a kísérlet ismétlést igényel.

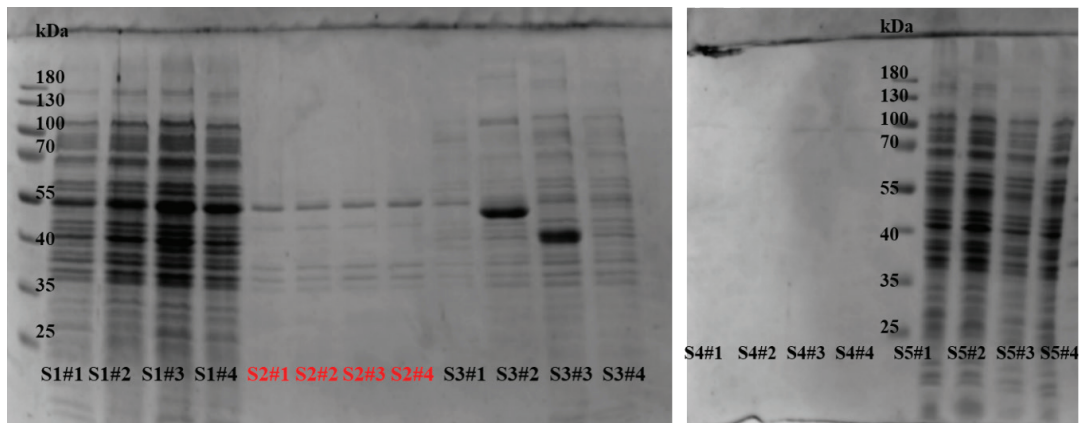
4.3.6. Lakkáz 2 variáns termelődésének vizsgálata

Az 52,4 kDa méretű Lakkáz 2 variánst termelő sejttenyészetekből összesen négyet vizsgáltam. A sötét látóterű mikroszkópos vizsgálattal azt tapasztaltam, hogy a sejtek forogtak maguk körül, valamint láthatóan a 3., 4. tenyészet sejt tartalma volt a legkevesebb. Az optikai denzitásukat is megvizsgáltam háromszoros hígítással OD₆₀₀-on, és a 8. táblázatba foglalt eredményeket kaptam. A mikroszkópban látottakat alátámasztják az értékek, hiszen bár nem jelentős mértékben, de az optikai sűrűsége a 3., 4. sejttenyészetnek volt valóban a legalacsonyabb.

8. táblázat: A Lakkáz 2 fehérjevariánst termelő sejtek tenyészeiben mért optikai denzitás

| Minta elnevezése | OD ₆₀₀ [-] |
|------------------|-----------------------|
| 1. | 2,3 |
| 2. | 2,8 |
| 3. | 2,0 |
| 4. | 2,2 |

SDS-PAGE gélelektroforézissel elválasztottam a mintákban a fehérjéket (4.10. ábra).



4.10. ábra: A Lakkáz 2 flagellin variáns termelésének vizsgálata SDS-PAGE-n. S1 a sejttenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

A gélen látható, hogy az S2 minták mindegyikében megjelenik egy sáv, amely az 55 kDa közelében helyezkedik el, ezek az 52,4 kDa méretű Lakkáz 2 flagellin variánsok. A sejtek felszínére kiválasztott és felépült filamentumok mennyisége között nem volt számottevő különbség a négy sejttenyészet esetében, azonban a sávok alacsony intenzitása a termelés alacsony hatékonyságára utal. Ennek magyarázata az is lehet, hogy egy viszonylag nagyobb méretű, a többi variánshoz képest összetettebb fehérjemotívumot építettem be a D3 domén helyére, amelynek sejtből a sejt felszínre történő exportálódása nehézségekbe ütközött.

A második sejttenyészetben a letört filamentumok aránya magasabb volt, mint a többiben. Monomer formában a fehérjék egyáltalán nem jutottak ki a tápközegbe. Összességében habár a filamentum képződés alacsony mértékben sikeres volt, a jobb hatékonyságú termelés érdekében a körülmények optimalizálása válik szükségessé a jövőben.

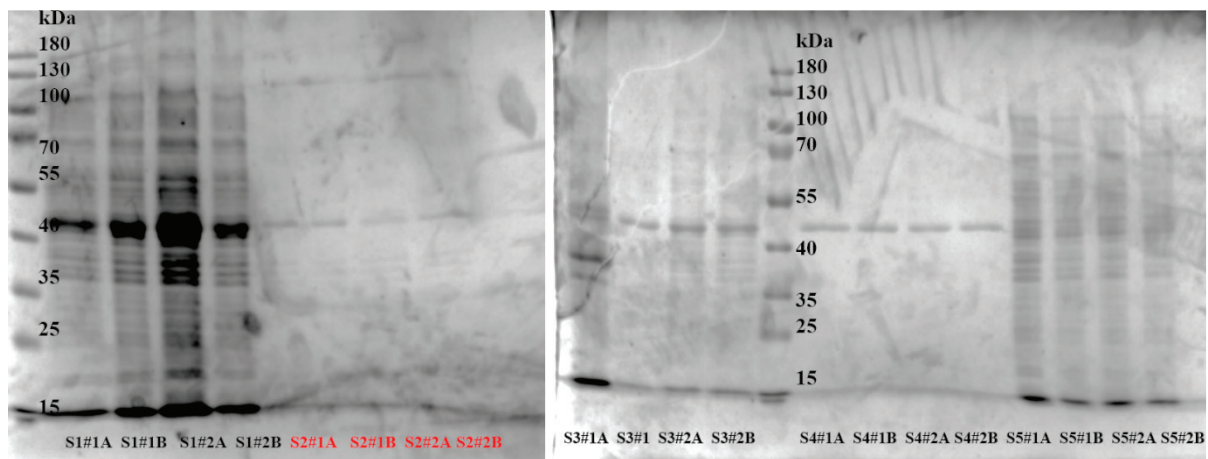
4.3.7. A különböző flagellin variánsok termelési hatékonyságát fokozó paraméterek keresése

A higanykötő flagellin variánsok tervezett bioszenzorikai alkalmazásához azokra polimer formában van szükség, ezért a következő kísérleteimben arra törekedtem, hogy bakteriális előállításukhoz olyan körülményeket találjak, amelyeket alkalmazva a legnagyobb arányban keletkeznek sejt felszíni polimerek. Természetesen a más formában termelődő fehérjék tisztítására és polimerizációjára is lehet esély utólag, de a kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján ezek az eljárások aránytalanul sok erőfeszítést igényelnek, sikerességük bizonytalan, és nagy fehérjevesztéssel járnak.

Kísérleteim során különböző paramétereket változtattam, mint például a hőmérsékletet vagy a tápoldat összetevőit, és minden esetben meghatároztam a változtatás hatását. Idő hiányában az optimalizálási vizsgálatokat kizárólag azokra a flagellin-variánsokra végeztem el, amelyekről friss tenyésztéslemez éppen rendelkezésre állt. Emellett feltételeztem, hogy az optimalizálási paraméterek hatása hasonló módon érvényesül az egyes variánsokra, hiszen a különbség köztük csak a D3 domén helyére beépített fehérjemotívum. Így, ha az adott módosított paraméter nem befolyásolta számottevően az expressziót, akkor valószínűsíthető, hogy a többi variánsra sem gyakorolt volna jelentős hatást. Az összes ilyen kísérletet a 4.3.1. alfejezet alapján végeztem el kis térfogatban.

4.3.7.1. Hőmérséklet-változtatás hatása a Lakkáz 1 fehérjevariáns termelődésére

A Lakkáz 1 fehérjevariáns kis térfogatú termelését az ellentmondásos eredmények miatt (4.3.5. fejezet) megismételtem, és egyidejűleg az optimalizálási vizsgálattal is összekapcsoltam: a kísérletem célja annak meghatározása volt, hogy a termeltetés hőmérsékletének változtatása hatással van-e a fehérje termelődésének mennyiségére. Ennek vizsgálatához két kolóniáról 5–5 ml LB-tápot oltottam be, majd inkubáltam rázatással 16 órán át 34 °C-on, illetve ahogy korábban, 37 °C-on, ugyanis feltételeztem, hogy esetleg az alacsonyabb hőmérséklet a sejtosztódást lelassítja, és a fehérjék termelésének kedvez. A tenyészetből mintát vettem, és sötét látóterű mikroszkóp segítségével tanulmányoztam. Mindkét minta esetén azt tapasztaltam, hogy a sejtek sodródtak, maguk körül forogtak, így meggyőződtem róla, hogy a sejtek a módosított hőmérséklet hatására is életképesek maradtak, és valószínűleg flagellummal is rendelkeznek. Megmértem az optikai denzitást háromszoros hígítással, amely érdekessége az volt, hogy a visszszámolt értékek a 34 °C-os minták esetében magasabbnak bizonyultak, ami arra enged következtetni, hogy ezen a hőmérsékleten a sejtosztódás intenzívebben zajlott. Végül a vett mintákból gélelektroforézissel elválasztottam a fehérjéket (4.11. ábra).



4.11. ábra: A Lakkáz 1 flagellin variáns különböző hőmérsékleteken való termeltetésének eredménye. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. A # a kolóniákat jelöli. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

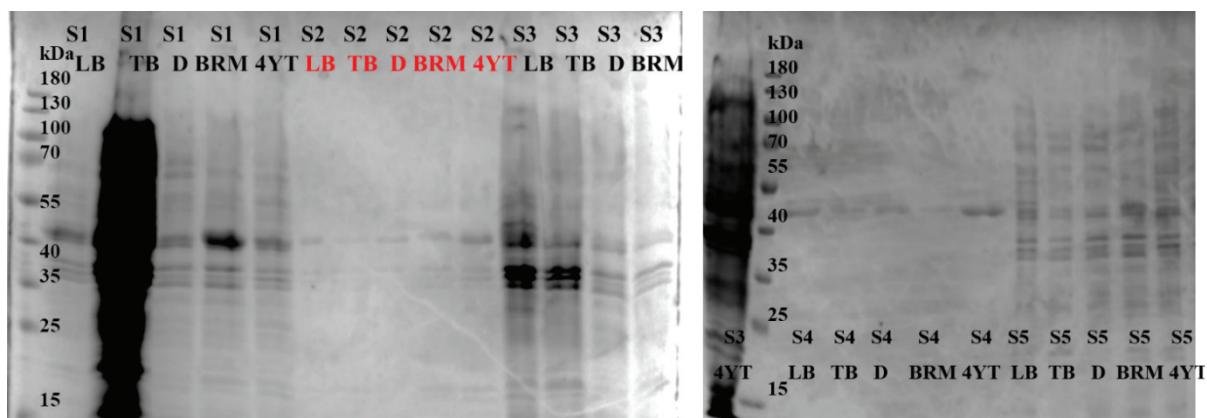
A= 34 °C; B= 37 °C

A gélen látható, hogy a tenyészet mintákban megtalálhatók a flagellin variánsok. Azonban ahogy a sima, kis térfogatú termelési vizsgálatban, itt is megfigyelhető, hogy a többi frakció a tenyészethez képest kevesebb variánst tartalmazott. Ezenkívül azt a következtetést vontam le, hogy a hőmérséklet-változás nem változtatott a tápotba kijutó monomer és a baktériumok felszínére épült filamentumok arányai között. Összefoglalva: habár valamennyi Lakkáz 1 flagellin variáns termelődött, a hőmérséklet-változtatással nem sikerült növelni a filamentum képződési hatékonyságát. A kísérlet megerősíti a korábban tett megfigyelésemet, miszerint a filamentumok valószínűleg valamilyen körülmény hatására degradálódnak. Ennek a jelenségnek az okait a jövőben további vizsgálatokkal szeretném feltárni.

4.3.7.2. Különböző tápoldatok hatása a Lakkáz 1 és a putatív higanykötő flagellin variáns termelődésére

A Lakkáz 1 és a putatív Hg-kötő flagellin variánsra a filamentum termelődését öt különböző tápoldatban is megvizsgáltam: LB, TB, Dinamit, BRM, 4YT [46]. Az LB egy alap-összetételű médium (triptont, élesztőkivonatot és NaCl-ot tartalmaz), a 4YT ennek a dúsított változata, amelynek nagyobb a tápanyagtartalma. A TB, a BRM és a Dinamit gazdagabb tápközegek, amelyek közül az utóbbi kettő glükózt is tartalmaz. Minden esetben ugyanabból a kolóniából leoltva 16 óráig inkubáltam a tenyészeteket 37 °C-on rázatva. A Lakkáz 1 variánst termelő sejtek sötét látóterű mikroszkópos képen azt láttam, hogy a sejtek forogtak, illetve a TB-tápoldatban voltak osztódáshibásak [47,48], amelyek nagyjából négyszer olyan hosszúak voltak, mint az egészséges sejtek. Ez utóbbi arra utal, hogy a sejtosztódás zavara nem a genetikai módosítással, hanem a tápanyag-összetétellel volt összefüggésben. Megmértem az optikai denzitást: az értékek alapján azt állapítottam meg, hogy az LB-tápközegben osztódtak a legkevésbé a sejtek, azonban ahogy az előző kísérletekből is kiderült, a sejtszám nem arányos a filamentum képződés hatékonyságával.

A gélekép alapján (4.12. ábra) a legnagyobb sejtsűrűséget a TB-tápoldatban lehetett elérni, amely megerősíti az optikai denzitás mérést. A filamentum termelés hatékonysága a 4YT-tápoldatban bizonyult a legjobbnak, meghaladva a többi vizsgált tápközegben tapasztalt termelődést, mivel ebben az esetben az S2 és az S4 frakcióban megfigyelhető a legnagyobb sávintenzitás. A BRM-közegben rázatott sejtenyészet esetében úgy tűnik, termelődtek flagellinek, azonban a többi frakcióban ez már nem nyer megerősítést, mivel a sávok intenzitásából nem mutatható ki. Ez a jelenség ismét a Lakkáz 1 variánsnál egy újabb ellentmondásra utal, amely további tanulmányozást igényel a jövőben. Összességében arra a következtetésre jutottam, hogy ezt a fehérjevariánst érdemes lenne a továbbiakban a 4YT-tápoldatban termeltetni, valamint a kísérletet BRM-tápközegben megismételni.

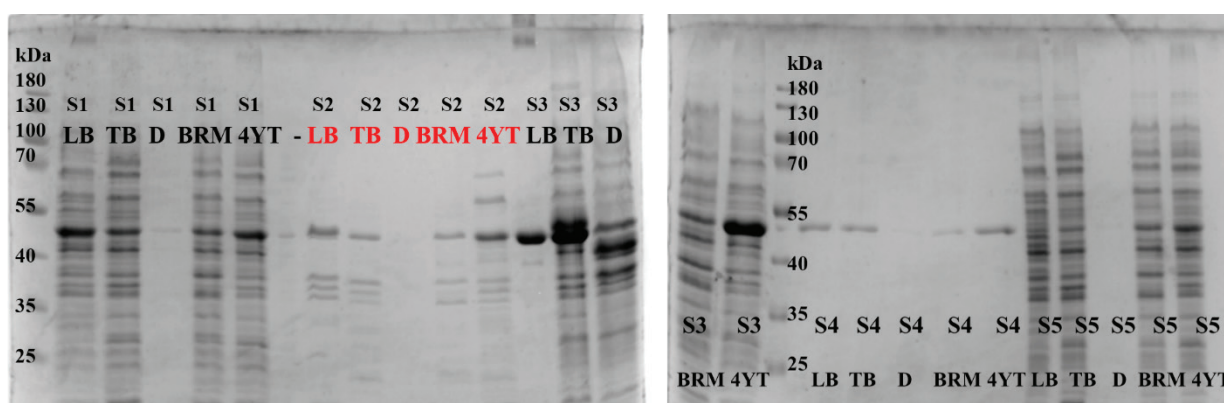


4.12. ábra: A különböző tápoldatok hatása a Lakkáz 1 fehérjevariáns termeltetésére.

A Dinamit tápoldatot D-vel jelöltem. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

A putatív Hg-kötő variánssal is elvégeztem ezt a kísérletet. Ismét megvizsgáltam a sejteket sötét látóterű mikroszkóp alatt. A Dinamit tápoldat alig tartalmazott sejteket. Az LB-ben és a TB-ben osztódáshibás sejteket is megfigyeltem. Mindegyik tápoldatban forogtak a sejtek maguk körül. Az optikai sűrűségeket megmértem, és a Dinamitra kapott eredmény alátámasztotta a mikroszkóppal látottakat. Mivel nagyon kevés sejtet tartalmazott (ABS=0,2442), már valószínűsíthető volt, hogy a filamentumok termelése ezzel a tápoldattal nem lesz sikeres.

Az SDS-PAGE gélen megfigyelhető (4.13. ábra), hogy a Dinamit tápoldat valóban nem kedvezett a sejtek növekedésének, amelyet alátámasztott a mikroszkópos kép és az optikai sűrűség értéke is. Mivel a sejtszám rendkívül alacsonynak bizonyult, ezért a variánsok sem termelődtek. A filamentum termelés mértéke ennél a variánsnál az LB- és a 4YT-tápoldatban volt a legnagyobb. A tápoldatba nagyon kevés monomer került ki. Továbbá a gélen az is látható, hogy az LB-, TB- és a 4YT-közegben a letört filamentumok magasabb arányban voltak jelen, mint a másik két tápoldatban.



4.13. ábra: A különböző tápoldatok hatása a putatív Hg-kötő fehérjevariáns termeltetésére. A Dinamit tápoldatot D-vel jelöltem. S1 a sejtenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.

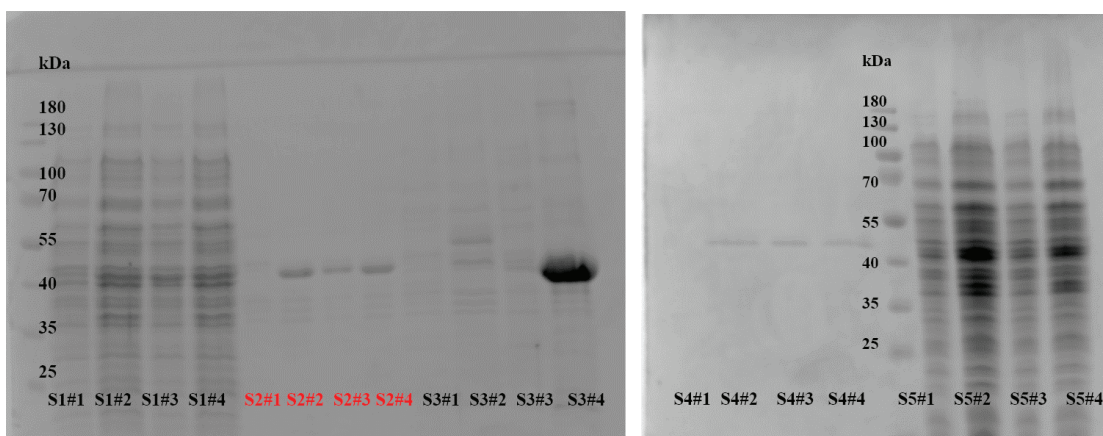
Összefoglalva a tápoldat-optimalizálást: a 4YT mindkét variánsnál ígéretesnek tűnik, ezért érdemes a másik három fehérjére is elvégezni a kísérleteket a jövőben. A putatív higanykötő variánsra az LB-tápoldat is ugyanolyan hatással bírt, mint az említett 4YT.

4.3.7.3. A cink(II)ionok hatásának vizsgálata a filamentum képződésre

Az előző kísérletekben a 4YT-tápoldat ígéretesnek tűnt, ezért azzal is folytattam a kísérleteimet. Mivel mind a négy variánsom ciszteint tartalmaz (NmerA, MerP, putatív higanykötő, Lakkáz 2), ezért a diszulfidhidak kialakulásának elkerülése érdekében adtam mind a pH 7-es 4YT- és az LB-tápoldathoz is 50 μM ZnCl_2 oldatot, hogy megvizsgáljam, befolyásolja-e a filamentumok képződését. A vizsgálatot először az NmerA és a MerP variánssal végeztem el, idő hiányában azért ezt a kettőt helyeztem előtérbe, mert ezen fehérjéknek a funkciója alaptól a higany(II)ionok megkötése. Az NmerA abszorbancia értékeit megmértem és a két 4YT-s minta tartalmazta a legtöbb sejtet. A sötétlátóterű mikroszkópos kép alapján a sejtek életképesek voltak, ugyanúgy, ahogy az eredeti két kísérletben: gyenge motilitást mutattak.

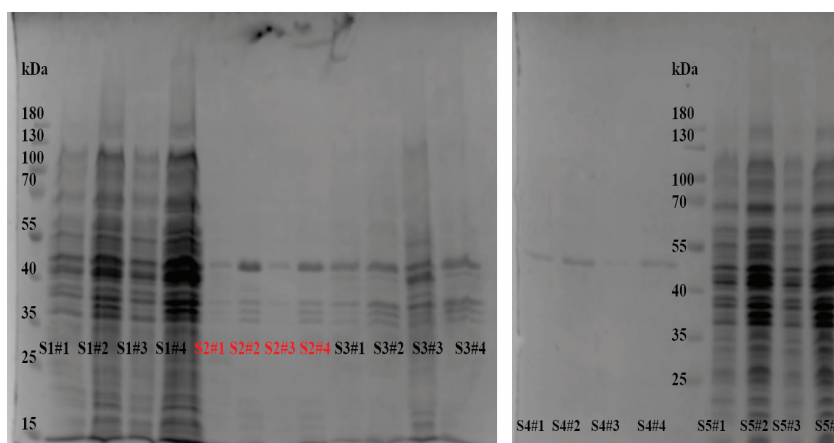
A gélelektroforézissel való elválasztást követően (4.14. ábra) azt a konklúziót vontam le, hogy a filamentum képződés a 4YT-tápoldat esetén hatékonyabb volt, illetve a monomerek mennyisége a 4YT+ ZnCl_2 tápoldatban a gélen jelentősen nagyobb arányban volt jelen, mint a másik három

esetben. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy mivel a tenyészetmintában, amelyet mindig a vizsgálat elején vettem, ez a sáv nem látszik ilyen intenzitással, ezért valószínűsíthető, hogy a centrifugáción az előző használatból eredően filamentum maradék volt, amely belekeveredhetett a mintába. Ennek megerősítése a jövőben a kísérlet ismételt elvégzését igényli.



4.14. ábra: A cink(II)ionok és a pH 7 hatása az NmerA variáns termelésére. S1 a sejttenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.
Jelölésrendszer: #1= LB; #2= 4YT; #3= LB+ZnCl₂; #4= 4YT +ZnCl₂

A kísérletet elvégeztem a MerP variánssal is. A mért optikai densitás értékek közül, ahogy az NmerA-nál, itt is a két 4YT-ben inkubált sejttenyészet sűrűsége emelkedett. Ezenkívül a sejtek a két 4YT-s változatú tápoldatban csomókat képeztek, és ahogy eddig mindig, mindegyik tápoldatban pörögtek. Az előbbinek az oka lehet például, hogy a sejtek összetapadtak a sejtfelszíni kölcsönhatások miatt. Az elektroforézis alapján azt állapítottam meg (4.15. ábra), hogy a 4YT-ben rázatott sejtek több filamentumot termeltek. Nincs jelentős különbség a cinkes és a cink nélküli változat között.



4.15. ábra: A cink(II)ionok és a pH 7 hatása a MerP variáns termelésére. S1 a sejttenyészet, S2 a sejtek felszínéről származó filamentumok, S3 a letört filamentumok, S4 a monomerek, S5 a baktériumokat tartalmazó minta. Piros színnel jelöltem azokat a mintákat, amelyekben csak a sejten képződött és arról izolált filamentumokat várjuk.
Jelölésrendszer: #1= LB; #2= 4YT; #3= LB+ZnCl₂; #4= 4YT +ZnCl₂

Összefoglalva, sikerült megvizsgálnom, hogy hogyan hat a 16 órás inkubáció hőmérsékletének 37 °C-ról 34 °C-ra változtatása a Lakkáz 1 fehérjevariáns termelődésére (9. táblázat). Ezen kívül öt féle tápoldattal is elvégeztem két kísérletet a Lakkáz 1 és a putatív higanykötő variánsra: az LB-vel, amelyet alapesetben használtam, illetve TB-vel, Dinamittal, BRM-mel és a 4YT-vel. Végző soron pedig a cink(II)ionok tápközeghez való hozzáadásával próbálkoztam az NmerA és MerP flagellin variáns esetén.

9. táblázat: A vizsgált paraméterek hatása a filamentumok termelődésének hatékonyságára

| Paraméterváltoztatás | Vizsgált variáns | Következtetés |
|---|--------------------|---|
| Hőmérséklet | Lakkáz 1 | Nem volt hatása |
| Tápoldat | Lakkáz 1 | A 4YT ígéretesnek tűnt |
| | Putatív higanykötő | Az LB, 4YT mindkettő ugyanolyan hatékonynak bizonyult |
| Cink(II)ionok LB- és 4YT-tápközegben (pH=7) | NmerA | A 4YT-ben jobb volt a termelés, mint az LB-ben |
| | MerP | A 4YT-ben jobb volt a termelés, mint az LB-ben, de nincs különbség a cink(II) ionokat tartalmazó és nem tartalmazó között |

Mivel öt variánsom volt, és rengeteg paraméter-kombinációs lehetőség, ki kellett választanom néhányat, amelyeknek vizsgálata először és könnyen kivitelezhető. Habár csak a 4YT-tápközeggel sikerült némi változást elérni, a jövőben azokra a variánsokra, amelyek képesek kötni a higany(II)ionokat, szeretném tovább vizsgálni, hogy a polimerek termelése milyen körülmények között éri el a maximális hozamot.

4.4. Különböző flagellin variánsokból filamentum termelése nagyobb térfogatban

A nagy térfogatú filamentum termelés célja, hogy a szenzorra való immobilizáláshoz elegendő fehérjét tudjunk előállítani.

Először egy táplemezzről egy baktériumkolóniát oltottam át 5 ml tápoldatba 5 µl ampicillinnel, és ezt 16 órán át 37 °C-on és 275 rpm-en rázatva inkubáltam (starter).

Másnap 100 ml tápoldatba átoltottam a startert, miután 100 µl antibiotikumot tettem bele. Ezt követően nagyjából 6 órán át rázattam a sejteket 37 °C-on és 200 rpm-en. Ezután az egész sejtenyészetet átoltottam a 2 literes tápoldatba, és 2 ml ampicillin és 400 µl habzástgátló hozzáadása után, a levegőztető rendszer rácsatlakoztatásával ismét 16 órán keresztül inkubáltam a tenyészetet 37 °C-on és 100 rpm-en.

Másnap reggel először a felnőtt tenyészetből vettem 20 µl mintát, amelyet ugyanennyi mintapufferrel elegyítettem, és az SDS-PAGE gélelektroforézishez 10 percen át kifőztem. Ezt követően minden részlépés után mintát vettem. A lombikba adtam 2%-os PEG 6000-et és 1%-os NaCl-ot, és inkubáltam a rendszert 37 °C-on, 50–75 rpm-en 45 percig, majd centrifugáltam a sejtenyészetet 4500 rpm-en, 30 percig, 6 °C-on. A felülúszót elválasztottam a sejtektől.

A csapadékot 40 ml, 50 mM DTT hozzáadásával készült Tris pufferben oldottam fel, majd a keletkező szuszpenziót 1 percig vortexeltem, és 2 percre jégre tettem. Ezt a folyamatot hatszor ismételtem meg, hogy biztosan letörjenek a filamentumok a sejtek felszínéről. Utána ismét centrifugáltam, ezúttal 8500 rpm-en fél óráig, 6 °C-on. Innentől kezdve kettévált a folyamat. A felülúszót elválasztottam, és 30 percig ultracentrifugáltam 40 000 rpm-en és 10 °C-on. Az ekkor keletkezett csapadék a filamentumokat tartalmazta, ezzel dolgoztam tovább: feloldottam 50 mM DTT-t tartalmazó Tris pufferben, és proteázgátló tablettát tettem az oldatba. Az elegyet 1 órára szobahőmérsékleten hagytam, majd vízfürdőbe tettem 10 percre 70 °C-ra monomerizálni a filamentumokat. Ezt követően a frakciót 20 percig ultracentrifugáltam, melynek paraméterei: 70 000 rpm, 10 °C. A felülúszóval dolgoztam tovább: 1 M NH₄SO₄-tal polimerizáltam a flagellin monomereket, majd minimum egy éjszakán át hűtőben inkubáltam a mintát.

A csapadék a 8500 rpm-es centrifugálás után ugyanúgy folytatódott, mint a felülúszós ág a 40 000 rpm-es ultracentrifugálás után, annyi különbséggel, hogy a 70 000 rpm-es ultracentrifugálás előtt a sejteket egy 20 perces, 8500 rpm-es centrifugálással választottam el. Az első polimerizációig a lépéseket az F.2. függelék szemlélteti.

A minimum 16 óra letelte után tisztítási lépésekkel folytattam a kísérletet. Először mindkét ág előzőekben polimerizált mintájából mintát vettem, majd két ultracentrifugálás, egy 10 perces, 70 °C-os monomerizáció és a harmadik centrifugálás követte egymást. A csapadékot minden esetben Tris pufferrel, TCEP hozzáadásával oldottam fel, és egészen az utolsó centrifugálásig azokkal haladtam tovább.

Az utolsó ultracentrifugálás után a csapadékot olyan mennyiségű pufferrel oldottam fel, hogy megközelítőleg 1 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldatot kapjak. Ezzel elkerülhetővé vált, hogy a fotometriás koncentrációmérés során a mintát hígítani kelljen, ami fehérjevesztéssel járt volna. Zárólépésként mindkét ág esetén az utolsó felülúszó abszorbanciáját 280 nm-en megmértem és az értékek alapján kiszámítottam a fehérjekoncentrációt. Ezt követően polimerizáltam a flagellin variánsokat 0,8 M végkoncentrációban adagolt ammónium-szulfát oldattal.

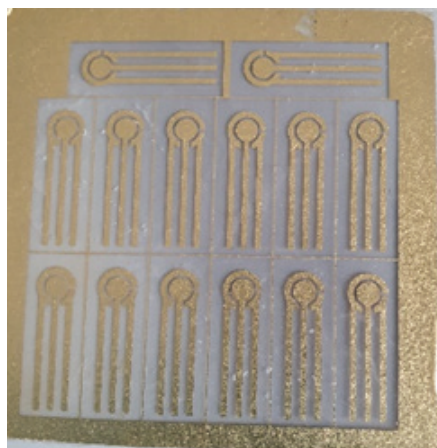
A fentiek alapján ez idáig három variánsból termeltem filamentumot: az NmerA-, a MerP- és a putatív higanykötő fehérjével. Az első kettő esetén az optimalizálási kísérlet eredményének megfelelően 4YT-vel (pH=7), a legutóbbinál LB-táppal dolgoztam. Mindegyik polimerből sikerült annyit termelnem, hogy a szenzorra lehessen rögzíteni és megmérni a higanykötő képességet. A fehérjetermelés során a Putatív Hg(II) kötő variánsból 9 mg, a MerP-ből 0,46 mg, míg az NmerA-ból 1 mg tisztított fehérjét sikerült kinyerni. A legutóbbi esetében a kisebb hozam részben technikai veszteségre vezethető vissza, mivel a feldolgozás során a minta egy része elveszett. A hozamok alapján megállapítható, hogy bár a mennyiségek elegendőek néhány bioszenzoros vizsgálat elvégzéséhez, a termelési feltételek további optimalizálása indokolt a jövőben.

4.5. A különböző variánsokból készített filamentumok szenzor felületre rögzítése és higanykötő képességük mérése elektrokémiai impedancia spektroszkópiával (EIS)

A higany(II)ionok kimutatására szolgáló bioszenzorok fejlesztésére olyan felületet kellett választani, amely biztosítja a fehérje variánsok stabil rögzítését, miközben alkalmas az elektrokémiai mérések kivitelezésére is.

A szenzorikai részeket (a szenzorok gyártását, előkészítését, az elektrokémiai méréseket) a szerb BioSense Intézettel együttműködésben valósítottuk meg, Ivana Milosevic PhD-hallgató közreműködésével, részben a Pannon Egyetemen, amikor vendéghallgatóként nálunk kutatott,

részben Szerbiában. A mérésekhez aranyalapú elektródokat használtunk (Gold Layer Electrode), amelyeket a BioSense Intézetben gyártottak. Ennek során egy négyrétegű PVC-fóliából álló felületre arany lapokat vittek fel laminálás segítségével, majd lézervágással alakították ki az elektród mintázatát. A gyártás során az elektródokat négyzet alakú lemezeken alakították ki, majd a kész egységeket egyenként vágták le róluk (4.16. ábra). Az így elkészített szenzor elve, hogy a felületre immobilizált fehérjevariáns a cisztein aminosavak egy részével stabilan kötődik az aranyhoz. A higany(II)ionok megkötésével a felületi borítottság nő, amely EIS-méréssel detektálható.



4.16. ábra: Az elkészült szenzorok még a kivágás előtt

A szenzorra rögzítéshez a polimerizált potenciális higanykötő variánsokat alaposan kimostam az ammónium-szulfátból. Ezt két ultracentrifugálással és ezek között pufferben szuszpendálással végeztem, 70 000 rpm-en, 20 percig és 10 °C-on. A végén a csapadékot a mennyiségétől függően olyan térfogatú Tris pufferben (2 mM TCEP-vel) oldottam fel, hogy megközelítőleg 1 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldatot kapjak.

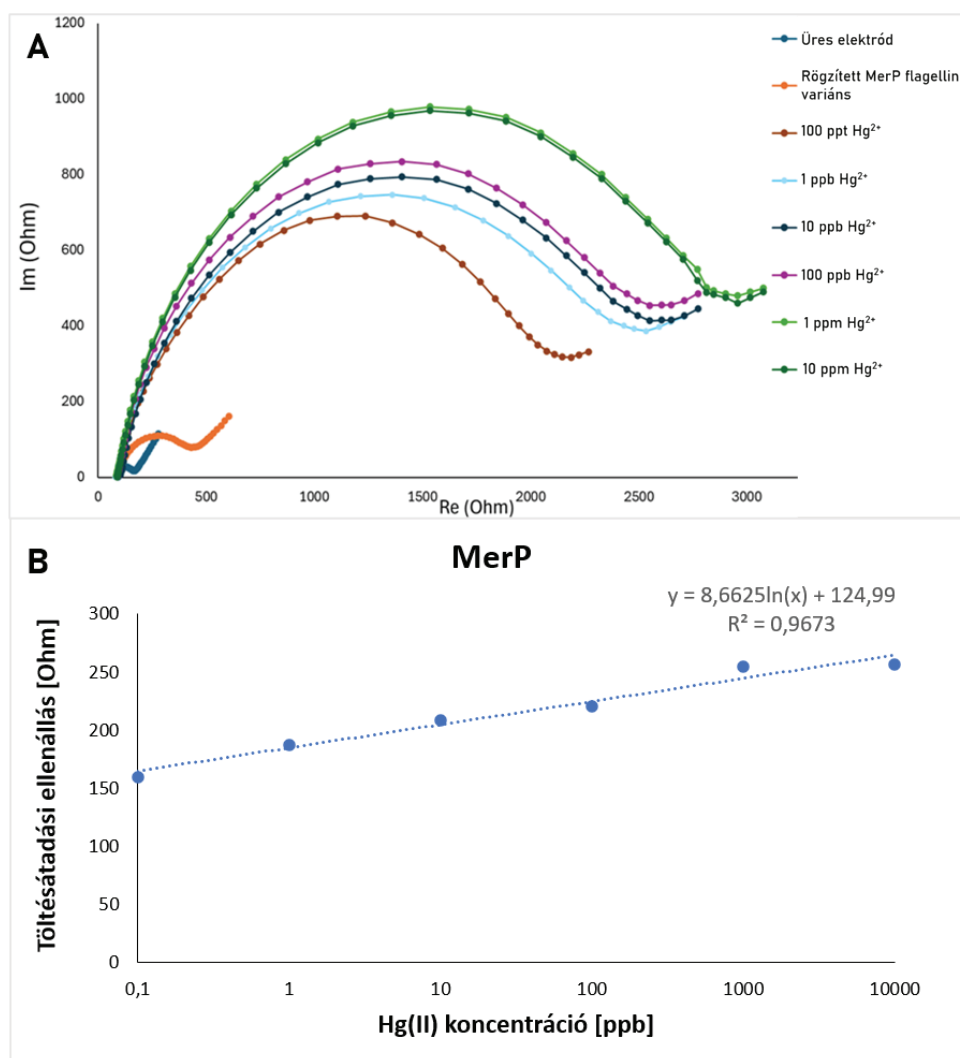
A szenzor felületét ciklikus voltammetriával tisztítottuk meg, miután 80 µl 0,5 M kénsavat cseppentettünk rá. A tisztítás 10 cikluson át történt, -0,2–+1,5 V tartományban, 500 mV/s potenciálváltoztatási sebességgel, majd a szenzort desztillált vízzel mostuk. Ezután a felületmódosítás minden lépését EIS-technikával követtük nyomon. A méréseket 10 mM káliumferri/ferrocianid redox rendszert tartalmazó, ekvimoláris oldatban végeztük, amely lehetővé tette a töltésátadási ellenállás vizsgálatát. Első lépésként a szenzor felületét karakterizáltuk. Ezt követően a flagellin variáns rögzítéséhez a szenzor felületére 10 µl fehérjeoldatot cseppentettem, majd 15 perc inkubáció után a felületet lemosással tisztítottam meg a nem kötött fehérjétől. A szenzorra ezután 80 µl redox-elektrolit oldatot juttattam, és az EIS-mérés alapján értékeltem az immobilizálás sikerességét.

A filamentumok higanykötő képességének vizsgálatát a BioSense Intézetben végezték, ahol a különböző fehérjevariánsokat tartalmazó szenzorokat 10 µl higany(II)-ion oldattal inkubálták 30 percig, majd a mérésből kapott Nyquist-diagramból következtettünk a kötés mértékére.

A mérések közül a legsikeresebbnek a MerP variáns bizonyult (4.17. ábra). Az üres aranyelektród karakterizálása nyomán a Nyquist-diagramon egy kisméretű félkör figyelhető meg, amely az alacsony töltésátadási ellenállásra utal. Ez azt jelzi, hogy a redox-próba és a tiszta, jól vezető aranyfelület között az elektronátvitel gyors és akadálytalan.

A módosított flagellin fehérje kovalens rögzítését követően jelentős változás tapasztalható az impedanciaspektrumban: a félkör jelentősen megnőtt, ami a töltésátadási ellenállás növekedését jelzi. Ez annak köszönhető, hogy a kialakult fehérjeréteg szigetelőként viselkedik, és fizikai gátat képez a ferri/ferrocianid redoxrendszer és az elektród felülete között, ezáltal lassítva az elektronátvitelt. A görbe igazolja a variáns sikeres immobilizálását. Végül a higany(II)ionokkal való kölcsönhatás látható a diagramon: a célmolekulák a MerP kötőhelyeihez kapcsolódtak, amelynek hatására a felületi réteg vastagsága megnőtt, ezáltal az átmérő további növekedését eredményezve. Különböző koncentrációjú higanyvegyületeket megmérve a szenzor már a 100 ppt (100 ng/l) koncentrációt is érzékelt, amely egy nagyságrenddel az ivóvízre megadott 1 µg/l egészségügyi határérték alatt van.

A vizsgálatok alapján az ellenállásértékek és a higany(II) ion koncentrációja között a mért tartományban lineáris összefüggés áll fenn, ami lehetővé teszi a MerP flagellin alapú bioszenzor számára, hogy ne csupán detektálja az egészségügyi határérték túllépését, hanem pontos mennyiségi adatot is szolgáltatson a higany(II) jelenlétéről.



4.17. ábra: (A) MerP flagellin variáns higanykötő képességének vizsgálata.

A legkisebb Nyquist-diagram az üres aranyelektrodra, a közvetlenül felette lévő pedig a kirögzített bioreceptorra adott jel. A felső görbék különböző higanykoncentrációkra adott válaszokat mutatják.

(B) A töltésátadási ellenállás a higany(II) koncentráció függvényében.

A további mérési eredmények szerint az NmerA variáns Hg(II) kötéséről alig detektálható jelet kaptunk. Ez a higanykoncentráció növelésével sem javult.

A Putatív Hg-kötő variáns nem kötötte a higany(II)ionokat, ami megerősíti, hogy e fehérje higanykötő funkciója csupán feltételezés volt.

Összességében elmondható, hogy az eredeti funkciójuk szerint higanykötő fehérjék megfelelően a flagellinbe építve alkalmas jelöltek lehetnek bioszenzorikai alkalmazásokhoz, míg a polipeptid szekvenciája alapján feltételezett fehérjéről ugyanez nem mondható el. A továbbiakban a Lakkáz 1 és 2 flagellin variánst is szeretném immobilizálni a szenzorra, és megvizsgálni a higany(II) kötési képességüket.

5. Összefoglalás

Munkám célja olyan flagellin variánsok tervezése, előállítása és tesztelése volt, melyek bioszenzorok érzékelő rétegeként alkalmasak higanyszennyezés detektálására. Ennek megfelelően a szakirodalom alapján kiválasztott higanykötő fehérjék felhasználásával ötféle potenciális higanykötő flagellint terveztem, és sikeresen létrehoztam mindegyik variánst kódoló génkonstrukciót, expressziós plazmidba építve. A variánsokat flagellin deficiens *Salmonella* törzsben expresszáltam, és vizsgáltam a fehérjék termelődését és polimerizációs képességét, különböző körülmények között. A vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a 4YT tápközeg bizonyos esetekben elősegíti a filamentum képződést az LB tápoldathoz képest, azonban egyelőre nem sikerült más olyan módosító körülményt találni, amely jelentős mértékben fokozta volna a termelést.

A szenzorikai mérésekhez eddig három variánsból sikerült készítenem tiszta filamentum mintákat: a MerP-ből, az NmerA-ból és a Putatív Hg-kötőből. Az eddigi mérésekből azt kaptuk, hogy a MerP flagellin egy nagyságrenddel az előírt határérték (1 ppb) alatt már 100 ppt koncentrációjú oldatból képes a Hg(II) kimutatására. Az NmerA flagellinnel funkcionális elektród is reagált a célmolekula jelenlétére, azonban ez a jelalak nem volt megfelelő szenzorikai alkalmazásra. A putatív Hg-kötő flagellin variáns esetén nem tudtuk detektálni a Hg(II)-t.

Az eddigi eredményeim alátámasztják, hogy az eredeti funkciójuk szerint higanykötő fehérjék megfelelően a flagellinbe építve alkalmas jelöltek lehetnek bioszenzorikai alkalmazásokhoz, míg a polipeptid szekvenciája alapján feltételezett fehérjéről ugyanez nem mondható el. Ugyanakkor mindhárom fehérje cisztein oldalláncokon keresztül köti a Hg(II)-t, ami – ahogy én is megtapasztaltam – megnehezíti a fehérjék előállítását és kezelését, és negatív hatással van a kitermelésre. Ezért nagyon érdekes lesz megvizsgálni, hogy az eredetileg nem higanykötő, de Hg(II)ionokkal kristályosított lakkáz fehérjéből kiválasztott kötőmotívumokkal módosított flagellin variánsok kitermelés, érzékenység és specifitás szempontjából alkalmasak-e bioszenzor-érzékelő rétegnek.

A továbbiakban a céltom a Lakkáz variánsok nagyobb mennyiségben való termeltetése, majd a szenzor felületére rögzítése és higany(II)ionokhoz való kötőképességük vizsgálata. Emellett szeretném folytatni és kifejleszteni a MerP flagellin variáns termeltetési körülményeinek optimalizálását. Végül pedig a kötőfehérjék szelektivitását is szeretném vizsgálni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte hálámat Dr. Jankovics Hajnalka témavezetőmnek a dolgozatom elkészítéséhez adott szakmai iránymutatásáért, folyamatos támogatásáért és türelméért. Külön köszönettel tartozom Tóth Évának a laboratóriumi kísérletek során nyújtott segítségéért és gyakorlati tanácsaiért. Hálámat fejezem ki továbbá a BioSense Intézet munkatársainak, különösen Ivana Milosevic PhD-hallgatónak a szenzorok előállításában és az elektrokémiai mérések elvégzésében való közreműködésükért. Munkájuk és támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Végezetül szeretném megköszönni a Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium minden dolgozójának a támogatást, az inspiráló szakmai légkört és a mindennapi segítséget.

Irodalomjegyzék

- [1.] Wu, Y.S.; Osman, A.I.; Hosny, M.; Elgarahy, A.M.; Eltaweil, A.S.; Rooney, D.W.; Chen, Z.; Rahim, N.S.; Sekar, M.; Gopinath, S.C.B.; et al. The Toxicity of Mercury and Its Chemical Compounds: Molecular Mechanisms and Environmental and Human Health Implications: A Comprehensive Review. *ACS Omega* 2024, 9, 5100–5126 doi.10.1021/ACSOMEGA.3C07047/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C07047_0008.JPEG.
- [2.] Pavithra, K.G.; SundarRajan, P.; Kumar, P.S.; Rangasamy, G. Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. *Chemosphere* 2023, 312, 137314 doi.10.1016/j.chemosphere.2022.137314.
- [3.] Wang, L.; Hou, D.; Cao, Y.; Ok, Y.S.; Tack, F.M.G.; Rinklebe, J.; O'Connor, D. Remediation of mercury contaminated soil, water, and air: A review of emerging materials and innovative technologies. *Environ Int* 2020, 134, 105281 doi.10.1016/J.ENVINT.2019.105281.
- [4.] Priyadarshane, M.; Chatterjee, S.; Rath, S.; Dash, H.R.; Das, S. Cellular and genetic mechanism of bacterial mercury resistance and their role in biogeochemistry and bioremediation. *J Hazard Mater* 2022, 423, 126985 doi.10.1016/j.jhazmat.2021.126985.
- [5.] Meyer, L.; Guyot, S.; Chalot, M.; Capelli, N. The potential of microorganisms as biomonitoring and bioremediation tools for mercury-contaminated soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 2023, 262 doi.10.1016/J.ECOENV.2023.115185.
- [6.] Ajsuvakova, O.P.; Tinkov, A.A.; Aschner, M.; Rocha, J.B.T.; Michalke, B.; Skalnaya, M.G.; Skalny, A. V.; Butnariu, M.; Dadar, M.; Sarac, I.; et al. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coord Chem Rev* 2020, 417, 213343 doi.10.1016/J.CCR.2020.213343.
- [7.] Lian, P.; Guo, H.B.; Riccardi, D.; Dong, A.; Parks, J.M.; Xu, Q.; Pai, E.F.; Miller, S.M.; Wei, D.Q.; Smith, J.C.; et al. X-ray structure of a Hg²⁺ complex of mercuric reductase (MerA) and quantum mechanical/molecular mechanical study of Hg²⁺ transfer between the C-terminal and buried catalytic site cysteine pairs. *Biochemistry* 2014, 53, 7211–7222 doi.10.1021/BI500608U/SUPPL_FILE/BI500608U_SI_001.PDF.
- [8.] Ledwidge, R.; Hong, B.; Dötsch, V.; Miller, S.M. NmerA of Tn 501 mercuric ion reductase: Structural modulation of the p K a values of the metal binding cysteine thiols. *Biochemistry* 2010, 49, 8988–8998 doi.10.1021/BI100537F/SUPPL_FILE/BI100537F_SI_001.PDF.
- [9.] Silver, S.; Phung, L.T. Bacterial Mercury Resistance Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins* 2013, 209–217 doi.10.1007/978-1-4614-1533-6_312.
- [10.] Parks, J.M.; Guo, H.; Momany, C.; Liang, L.; Miller, S.M.; Summers, A.O.; Smith, J.C. Mechanism of Hg-C protonolysis in the organomercurial lyase MerB. *J Am Chem Soc* 2009, 131, 13278–13285 doi.10.1021/JA9016123/SUPPL_FILE/JA9016123_SI_001.PDF.
- [11.] Lafrance-Vanasse, J.; Lefebvre, M.; Lello, P. Di; Sygusch, J.; Omichinski, J.G. Crystal structures of the organomercurial lyase MerB in its free and mercury-bound forms Insights into the mechanism of methylmercury degradation. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284, 938–944 doi.10.1074/JBC.M807143200.
- [12.] Serrano-Posada, H.; Centeno-Leija, S.; Rojas-Trejo, S.P.; Rodríguez-Almazán, C.; Stojanoff, V.; Rudiño-Piñera, E. X-ray-induced catalytic active-site reduction of a multicopper oxidase: structural insights into the proton-relay mechanism and O₂-reduction states. *urn:issn:1399-0047* 2015, 71, 2396–2411 doi.10.1107/S1399004715018714.
- [13.] Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021, 596, 583–589 doi.10.1038/S41586-021-03819-2;TECHMETA.

- [14.] Varadi, M.; Bertoni, D.; Magana, P.; Paramval, U.; Pidruchna, I.; Radhakrishnan, M.; Tsenkov, M.; Nair, S.; Mirdita, M.; Yeo, J.; et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res* 2024, 52, D368–D375 doi.10.1093/NAR/GKAD1011.
- [15.] Bateman, A.; Martin, M.J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Adesina, A.; Ahmad, S.; Bowler-Barnett, E.H.; Bye-A-Jee, H.; Carpentier, D.; Denny, P.; et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 2025, 53, D609–D617 doi.10.1093/NAR/GKAE1010.
- [16.] AlphaFold Protein Structure Database Protein structure prediction for U2GOS5 Available online: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/>
- [17.] Namba, K.; Vonderviszt, F. Molecular architecture of bacterial flagellum. *Q Rev Biophys* 1997, 30, 1–65 doi.10.1017/S0033583596003319.
- [18.] Yonekura, K.; Maki-Yonekura, S.; Namba, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 2003, 424, 643–650 doi.10.1038/NATURE01830;KWRD=SCIENCE.
- [19.] Vonderviszt, F.; Namba, K. Structure, Function and Assembly of Flagellar Axial Proteins. 2013.
- [20.] Szabó, V.; Muskotál, A.; Tóth, B.; Mihovilovic, M.D.; Vonderviszt, F. Construction of a Xylanase A Variant Capable of Polymerization. *PLoS One* 2011, 6, e25388 doi.10.1371/journal.pone.0025388.
- [21.] Labadi, Z.; Kalas, B.; Saftics, A.; Illes, L.; Jankovics, H.; Bereczk-Tompa, É.; Sebestyén, A.; Tóth, É.; Kakasi, B.; Moldovan, C.; et al. Sensing layer for Ni detection in water created by immobilization of bioengineered flagellar nanotubes on gold surfaces. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020, 6, 3811–3820 doi.10.1021/acsbiomaterials.0c00280.
- [22.] Jankovics, H.; Szekér, P.; Tóth, É.; Kakasi, B.; Lábadi, Z.; Saftics, A.; Kalas, B.; Fried, M.; Petrik, P.; Vonderviszt, F. Flagellin-based electrochemical sensing layer for arsenic detection in water. *Scientific Reports* 2021 11:1 2021, 11, 1–10 doi.10.1038/s41598-021-83053-y.
- [23.] Tetyana, P.; Morgan Shumbula, P.; Njengele-Tetyana, Z. Biosensors: Design, Development and Applications. *Nanopores* 2021 doi.10.5772/INTECHOPEN.97576.
- [24.] Biosensor, Types of Biosensors, and Working of Biosensor Available online: <https://www.electronicclinic.com/biosensor-types-of-biosensors-and-working-of-biosensor>.
- [25.] Wang, K.; Lin, X.; Zhang, M.; Li, Y.; Luo, C.; Wu, J. Review of Electrochemical Biosensors for Food Safety Detection. *Biosensors (Basel)* 2022, 12 doi.10.3390/BIOS12110959.
- [26.] Saputri, F.A.; Kenanga, A.W.P.; Zubaidah, E.U.; Mulyadi, C.A.; Pratiwi, R. Recent updates on analytical methods for mercury determination: A review. *Pharmacia* 72: 1-14 2025, 72, 1–14 doi.10.3897/PHARMACIA.72.E152087.
- [27.] Ashrafi, A.M.; Koudelkova, Z.; Sedlackova, E.; Richtera, L.; Adam, V. Review—Electrochemical Sensors and Biosensors for Determination of Mercury Ions. *J Electrochem Soc* 2018, 165, B824 doi.10.1149/2.0381816JES.
- [28.] Maghsoudi, A.S.; Hassani, S.; Mirnia, K.; Abdollahi, M. Recent advances in nanotechnology-based biosensors development for detection of arsenic, lead, mercury, and cadmium. *Int J Nanomedicine* 2021, 16, 803–832 doi.10.2147/IJN.S294417;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
- [29.] Yang, Y.; Qi, H.; Hou, X.; Gao, M.; Gong, S. Recent Advances (2019–2025) in Mercury Ion Detection. *Crit Rev Anal Chem* 2025 doi.10.1080/10408347.2025.2511136;SUBPAGE:STRING:ACCESS.
- [30.] EMP-3 | Portable Mercury Survey Meter | NIC Available online: <https://www.hg-nic.com/emp-series/emp-3/>.
- [31.] Portable Zeeman Mercury Analyzer RA-915M - mercury spectrometer price | direct, pyrolysis and cold vapor analysis Available online: <https://www.lumexinstruments.com/catalog/atomic-absorption-spectrometry/ra-915m.php>.

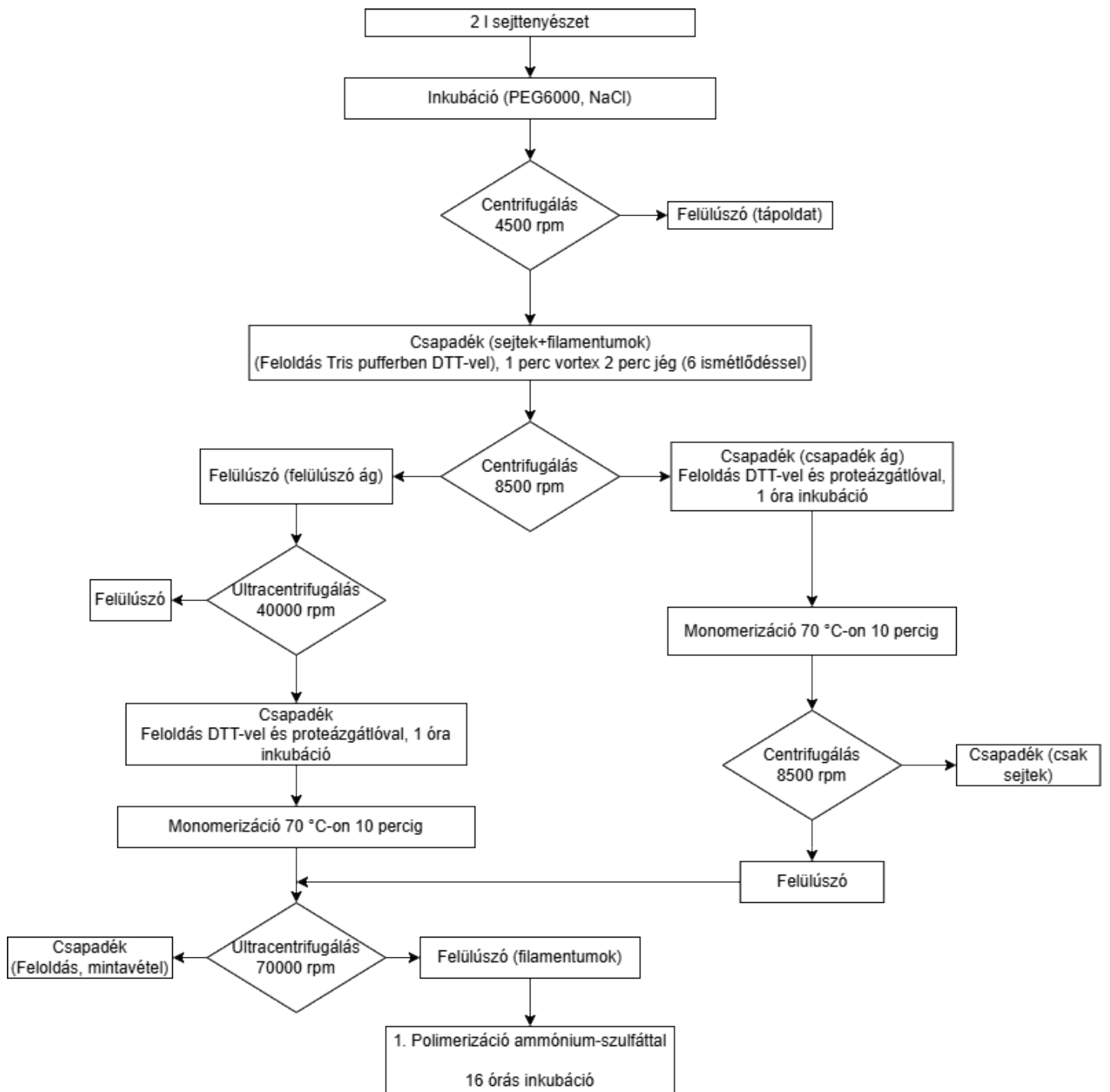
- [32.] Nyitray, L.; Pál, G. *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*; Budapest, 2013; 497-504.
- [33.] Az ELTE Biokémiai Tanszék Munkaközössége *Géntechnológia és fehérjemérnökség*; Nyitray, L., Ed.; 2013; 60-64.
- [34.] Az ELTE Biokémiai Tanszék Munkaközössége *Géntechnológia és fehérjemérnökség*; Nyitray, L., Ed.; 2013;46-48.
- [35.] Nyitray, L.; Pál, G. *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*; Budapest, 2013; 177-182.
- [36.] Wunderlich, L. *Molekuláris biológiai technikák*; Typotex Kiadó, 2014; 49-53.
- [37.] Hegyi, G.; Kardos, J.; Kovács, M.; Málnási-Czizmadia, A.; Micsonai, A.; Nyitray, L.; Pál, G.; Radnai, L.; Reményi, A.; Venekei, I. Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. 2013, 139–141.
- [38.] Wunderlich, L. *Molekuláris biológiai technikák*; Typotex Kiadó, 2014; 54-57.
- [39.] Cyclic Voltammetry Basic Principles, Theory & Setup | Ossila Available online: <https://www.ossila.com/pages/cyclic-voltammetry>.
- [40.] Magar, H.S.; Hassan, R.Y.A.; Mulchandani, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors (Basel)* 2021, 21, 6578 doi.10.3390/S21196578.
- [41.] Zhang, H.; Sun, Z.; Sun, K.; Liu, Q.; Chu, W.; Fu, L.; Dai, D.; Liang, Z.; Lin, C. Te Electrochemical Impedance Spectroscopy-Based Biosensors for Label-Free Detection of Pathogens. *Biosensors (Basel)* 2025, 15, 443 doi.10.3390/BIOS15070443.
- [42.] Mimori, Y.; Yamashita, I.; Murata, K.; Fujiyoshi, Y.; Yonekura, K.; Toyoshima, C.; Namba, K. The Structure of the R-type Straight Flagellar Filament of Salmonella at 9 Å Resolution by Electron Cryomicroscopy. *J Mol Biol* 1995, 249, 69–87 doi.10.1006/JMBI.1995.0281.
- [43.] Abramson, J.; Adler, J.; Dunger, J.; Evans, R.; Green, T.; Pritzel, A.; Ronneberger, O.; Willmore, L.; Ballard, A.J.; Bambrick, J.; et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 2024, 630, 493–500 doi.10.1038/S41586-024-07487-W;TECHMETA.
- [44.] Szabó, V.; Muskotál, A.; Tóth, B.; Mihovilovic, M.D.; Vonderviszt, F. Construction of a xylanase A variant capable of polymerization. *PLoS One* 2011, 6 doi.10.1371/JOURNAL.PONE.0025388.
- [45.] NEB Tm Calculator Available online: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>.
- [46.] Taylor, T.; Denson, J.P.; Esposito, D. Optimizing expression and solubility of proteins in E. coli using modified media and induction parameters. *Methods in Molecular Biology* 2017, 1586, 65–82 doi.10.1007/978-1-4939-6887-9_5,.
- [47.] Shippy, D.C.; Heintz, J.A.; Albrecht, R.M.; Eakley, N.M.; Fadl, A.A. Deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene alters the morphological and replication characteristics of Salmonella enterica Serovar typhimurium. *Arch Microbiol* 2012, 194, 405–412 doi.10.1007/S00203-011-0769-7.
- [48.] Schaechter, M.; Maaløe, O.; Kjeldgaard, N.O. Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of Salmonella typhimurium. *Microbiology (N Y)* 1958, 19, 592–606 doi.10.1099/00221287-19-3-592.

Függelék

F.1. A 12,5%-os SDS-gél elkészítése

- Alsó gél:
 - 4 ml „szeparáló gél” oldat, amelyben:
 - 2,8 ml A puffer (4 g/L SDS+ 182 g Tris-HCl, pH=8,8)
 - 15,75 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 21,75 steril desztillált víz
 - 30 µl 10 tömegszázalékos APS (ammónium-perszulfát oldat)
 - 3 µl TEMED (tetrametil-etilén-diamin)
- Felső gél:
 - 1,67 ml „koncentráló gél” oldat, amelyben:
 - 6,3 ml B puffer (4 g/L SDS+ 61 g Tris-HCl, pH=8,8)
 - 2,825 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 15,9 ml steril desztillált víz
 - 30 µl 10 tömegszázalékos APS (ammónium-perszulfát oldat)
 - 3 µl TEMED (tetrametil-etilén-diamin)

F.2. Lépések az első polimerizációig a nagy térfogatú filamentum termelésben



Kaolinit nanotekercsek előállításának fejlesztése

Készítette: Zajác Miklós

Mérnöki Kar, Anyagmérnöki Intézeti Tanszék

Témavezető: Dr. Kristófné dr. Makó Éva
A pályamunka lezárásának dátuma: 2025.11.10.



Tartalmi összefoglaló

A kaolinit az agyagásványok közé tartozó kétrétegű rétegszilikát. A kaolinit szerkezeti felépítése a kettős rétegek közötti térbe megfelelő molekulák beépítésével és helyettesítésével megváltoztatható. Ezt a műveletet interkalációnak nevezik, amihez általában szerves molekulákat használnak fel. Ha több egymást követő interkalációval a rétegeket térben kellően elválasztjuk egymástól, akkor azok tekercsüket formálnak. A kaolinit nanotekercseknek fontos szerepük van többek között a katalizátorok, műanyagok, elektroreológiai folyadékok és gyógyszerek fejlesztése szempontjából.

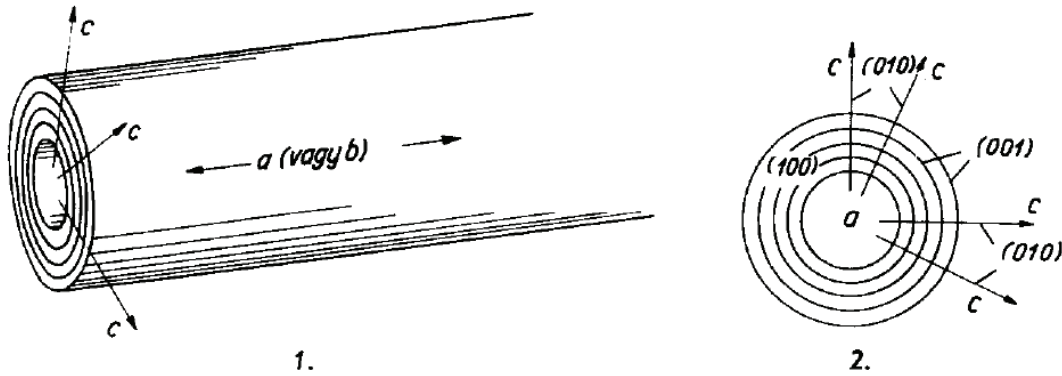
Kutatásommal a kaolinit nanotekercsek előállítását kívánom fejleszteni. Céloom, hogy kísérleti úton összefüggéseket figyeljek meg a kiindulási kaolinit kristályosodottsági foka és a kialakult nanotekercsek minősége között. Továbbá azt is szeretném jobban megismerni, hogy az előbbiek hogyan befolyásolják az interkaláció egyes lépéseit. A kialakított prekursorok és termékek elemzése röntgendiffrakcióval (XRD), Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FT-IR), termikus analízissel (TA) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) történt.

A kaolinit nanotekercsek előállítását három nyersanyag felhasználásával végeztem: surmini, zettlitz-i és szegi kaolinnal. Ezekben a kaolinit ásvány kristályosodottsági foka nagy mértékben eltér egymástól. Ezeket a kaolinokat ugyanazon interkalációs lépéseknek vettem alá, hogy a kialakított nanotekercsek tulajdonságai jól összehasonlíthatók legyenek. Első lépésben a mintát 9:1 tömegarányú dimetil-szulfoxid-víz oldattal elkevertem, és 60 °C-on 24 órán át állni hagytam. Az így kapott prekuzort ezután metanollal interkaláltam 130 °C-on, háromszor 9 órás kezeléssel. A mintát ezek után cetil-trimetil-ammonium-klorid oldatával kezeltem 80 °C-on, 48 órán keresztül. Az eljárás végén a mintáimat etanollal, ultrahangos keverő segítségével mostam.

A vizsgálatok alapján elmondható, hogy mindhárom kaolinitből sikerült minden lépésben a megfelelő interkalációs komplexet előállítani. Megállapítható, hogy a kristályosodottsági fok csökkenésével kismértékben romlik az interkaláció foka, de a legrosszabb esetben is 87%-os érték érhető el. A kezelések eredményeként mindhárom kaolinitből nagy számban keletkeztek nanotekercsek. A tekercsek hossza és rendezettsége a kristályosodottság csökkenésével szintén csökken.

1. Bevezetés

A természetben előforduló, nanoméretű csöves szerkezettel rendelkező aluminoszilikát ásványok (pl. halloysit, imogolit) sok kutató érdeklődését felkeltették az elmúlt évtizedekben. A kutatások célja adszorbensek, katalizátorok és agyag-polimer nanokompozitok fejlesztése volt. A halloysit különös figyelmet kapott egyedi, nanocsöves szerkezete miatt (1. ábra). [1]



1. ábra Halloysit. 1. Henger alakú lemezszerkezet képe.
2. A henger keresztmetszete a kristálytani irányok és síkok bejelölésével. [2]

Halloysit lelőhelyek a Föld csaknem minden kontinensén előfordulnak. Ezek általában kaolinit lelőhelyek közelében találhatóak meg, és nagy mennyiségben bányásszák kerámiaipari felhasználás céljából. A halloysit morfológiája és a csövek megfelelő minősége nagy jelentőséggel bír az ipari hasznosíthatóság szempontjából. Azonban a természetes halloysit gyakran tartalmaz szennyeződések, és a szerkezeti felépítése (a csövek hossza, külső és belső átmérője) a lelőhelytől függően változik. Emiatt kezdték el keresni a lehetőségeket halloysit-szerű nanocsövek mesterséges előállítására. [1]

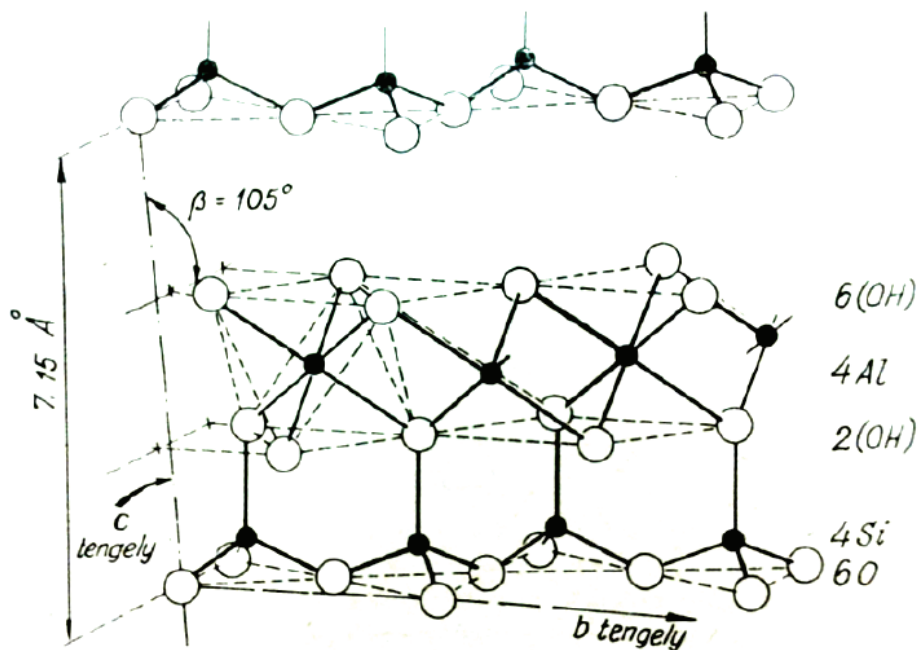
Erre a célra a kaolinit bizonyult a legmegfelelőbb választásnak, mivel nagy mennyiségben, jó minőségben és alacsony áron hozzáférhető. 1996-ban Singh és Mackinnon [3] sikeresen állított elő halloysithoz hasonló nanotekercseket kaolinitből kálium-acetáttal, több interkalációs lépés segítségével. [1]

Dolgozatomban azt vizsgálom, miképp befolyásolja a kaolinit kristályosodottsági foka az egyes interkalációs lépéseket és a kész nanotekercsek tulajdonságait. A prekursorokat és a termékeket röntgendiffrakcióval (XRD), Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FT-IR), termikus analízissel (TA) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) jellemzem.

2. Irodalmi rész

2.1. Kaolinit

Az agyagok és agyagos kőzetek fontos elegyrészei az agyagásványok. A számos közös vonásuk miatt az ásványcsoport tagjai csakis szerkezeti vizsgálatok segítségével tanulmányozhatók és ismerhetők meg alaposabban. Kevés kivétellel rétegrácsok, amelyek a filloszilikátok tetraédes-oktaédes koordinációjú hálózataiból épülnek fel. Általános sajátosságuk a rácsban a szilícium-alumínium és az alumínium-magnézium arány. Jellemző a rétegek közötti víz jelenléte és hő hatására a dehidratáció, a kationmegkötő-, illetve -cserélőképesség. [2, 4]



2. ábra Kaolinit szerkezete [5]

A kaolinit az agyagásványok szerkezetileg legegyszerűbb és legismertebb csoportjába tartozik (2. ábra). Kristályszerkezetében a tetraédes $[\text{Si}_4\text{O}_{10}]$ -kötelékhez $\text{Al}(\text{OH})_3$ -réteg csatlakozik, így a kiegyenlített összetételben két réteg, egy tetraédes és egy oktaédes hálózat kapcsolódik össze. Ezeket a kettős rétegeket „kaolínrétegnek” is szokás nevezni. A rétegekben alumíniumiononként két hidroxidion szerepel, így a képlete leegyszerűsítve $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. A gyakorlatban használt oxidos alakja pedig $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A kaolínréteg, ahogyan a tapasztalati képletből is látszik, elektromosan semleges. Az egymással szomszédos rétegek főként hidrogénkötésekkel kapcsolódnak. Ehhez az egyik réteg alapsíkjának oxigénje szorosan meg kell, hogy közelítse a szomszédos réteg hidroxilcsoportját, ami csak a kaolínrétegek megfelelő elcsúszásával valósulhat meg. Emiatt az oxigén- és hidroxidionok egymás fölötti helyzetében bizonyos szerkezeti variációk alakulhatnak ki, ami az egymást követő rétegek relatív helyzetének megváltozását és az elemi cella szögeinek változását okozza. Ebben a kétrétegű szerkezetben az oktaédes és a tetraédes réteg elemi cellájának b-irányú mérete eltér egymástól. Az oktaédes rétegnél $b_0 = 8,62 \text{ \AA}$, míg a tetraédes réteg esetén $b_0 = 8,93 \text{ \AA}$. Az egyenlőtlen méretek miatt az oktaédes rétegben húzófeszültség, a tetraédes rétegben pedig nyomófeszültség lép fel. A kaolínrétegek között ható hidrogénkötések azonban elég erősek ahhoz, hogy megakadályozzák a rétegek

deformációját. Erre alapozva a hidrogénkötések felszakításával és a kaolinrétegek szétválasztásával lehet kísérleti úton nanotekercseket előállítani. [2, 4]

A kaolinit triklin rendszerű, és cellája c-irányban egyetlen kaolinrétegből áll. Kristályai apró, vékony álhatszögös lemezek. Hasadása tökéletes, lemeze hajlítható, de rugalmatlan. Színe fehér, szürkés, időnként vöröses, barnás, kékes árnyalattal. Lángban nem olvad, szerkezeti hidroxilcsoportjait 500 °C körül veszíti el. Tömény kénsavoldatban oldódik, a sósav viszont elbontja. A kerámiagyártásban alkalmazott kaolin fehér, földes megjelenésű kőzet, amely főleg kaolinit ásványt tartalmaz. Ebben a kőzetben fénymikroszkóppal is észrevehetőek a szintelen, vékony, pikkelyes kristályok. [2]

2.1.1. Hinckley-index

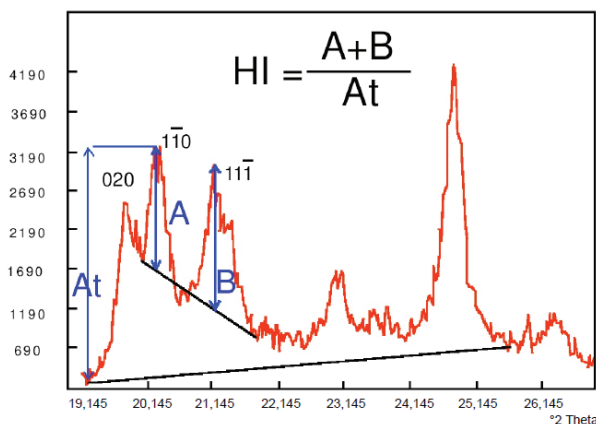
A Hinckley-index (HI) kaolinok kaolinit ásványának kristályosodottsági fokának meghatározására szolgál. A módszer David N. Hinckley nevéhez fűződik, aki amerikai (Georgia és Dél-Karolina) kaolin lelőhelyek mintáit vizsgálta röntgendifrakcióval. [5]

A módszere egyszerű, és a röntgendifraktogramon grafikusán megoldható. Először meg kell mérnünk a kaolinit 1–10 és 1–11 reflexióinak magasságát (3. ábrán jellemzett módon A és B). A két magasság összegét ezután elosztjuk az 1–10 reflexió háttértől mért magasságával (A_t), így megkapjuk a HI értékét. [6]

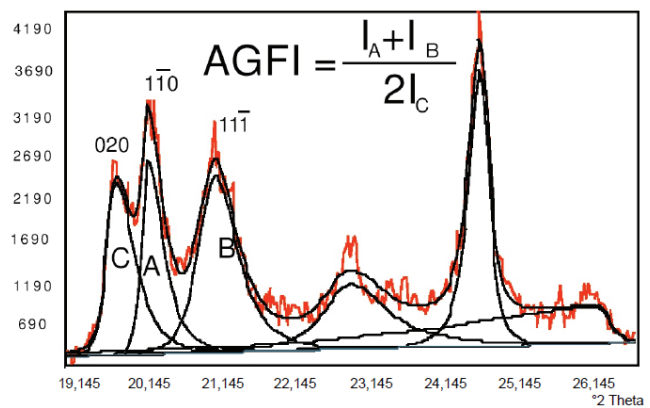
A kaolinitek ilyen módon három csoportba sorolhatók (lásd 1. táblázat). Ennek a módszernek két nagy előnye van a hasonló vizsgálati módszerekhez képest. Először a HI szélesebb tartományban sorolja be a vizsgált ásványokat, így azok könnyebben összehasonlíthatók. Másodszor a felhasznált csúcsok kis szögterületen belül találhatók, ami lerövidíti a vizsgálatok idejét. A HI meghatározását más fázisok jelenléte zavarhatja (pl. kvarc, földpát, goethit, illit, szmektit, illetve halloysit). [6, 7]

1. táblázat A kaolinit kristályosodottsága a HI és az AGFI alapján [7, 8]

| Kristályosodottság | HI | AGFI |
|--------------------------|-----------|-----------|
| jó (low defect) | 0,90< | 1,25< |
| közepes (medium deffect) | 0,50-0,90 | 0,90-1,25 |
| rossz (high deffect) | <0,50 | <0,90 |



(a)



(b)

3. ábra A (a) Hinckley- és (b) Aparicio–Galán–Ferrel-index számítása [7, 8]

2.1.2. Aparicio–Galán–Ferrell-index

A kaolinitek kristályosodottsági fokát nemcsak egyféleképpen lehet meghatározni. Ezek közül az egyik legújabb, amelyet hasonló szögtartomány alapján lehet számítani, az Aparicio–Galán–Ferrell-index, röviden AGFI. A HI grafikus meghatározásától eltérően az AGFI-nél profilillesztést használnak (3. ábra, 1. táblázat). Ez a módszer természetesen függ az illesztés jóságától, de a HI-hez képest kevésbé befolyásolják az egyéb jelenlévő fázisok az eredményt. [7]

2.2. Dimetil-szulfoxid

A dimetil-szulfoxid (rövidítve: DMSO) egy színtelen, szagtalan, szerves kénvegyület. Összegképlete: C_2H_6OS . Vízzel és szerves oldószerekkel jól elegyedik. Részletes fizikai tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza. Poláris, aprotikus oldószer, amely poláris és apoláris molekulák széles skáláját képes feloldani. Toxikológiai tulajdonságai kedvezőek, emberre és a környezetre nem ártalmas. Fontos tulajdonsága, hogy megkönnyíti az anyagok áthatolását a bőrön és a növényi membránokon. Az iparban dimetil-szulfid oxidációjával állítják elő. [9, 10]

A vegyiparban főleg oldószerként használják, de alkalmas gyökök semlegesítésére is. A gyógyszeripar láz- és fájdalomcsillapítók, valamint gyulladáscsökkentők készítésére használja fel. Ezen a területen hasznos tulajdonsága, hogy nincs tudatmódosító hatása, és nem okoz függőséget. [9, 10]

2. táblázat DMSO, metanol és CTAC alapadatai [9, 10]

| | DMSO | Metanol | CTAC |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Összegképlet | C_2H_6OS | CH_3OH | $C_{19}H_{42}ClN$ |
| Megjelenés | Színtelen, szagtalan folyadék | Színtelen, jellegzetes szagú folyadék | Sárgásfehér szilárd anyag |
| Moláris tömeg (g/mol) | 78,13 | 32,04 | 320,00 |
| Sűrűség (g/cm³) | 1,1 | 0,791 | 0,968 |
| Olvadáspont (°C) | 16–19 | -98 | 234 |
| Forráspont (°C) | 189 | 64,7 | 475 |

2.3. Metanol

A metanol (más néven metil-alkohol vagy faszesz) egy szerves vegyület, a legegyszerűbb telített alifás alkohol. Összegképlete: CH_3OH . Kis sűrűségű, illékony, gyúlékony, színtelen folyadék. Részletes fizikai tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza. Jellegzetes alkoholos illata miatt könnyen összetéveszthető az etanollal. Vízzel, más alkoholokkal és éterrel korlátlanul elegyíthető. Kiváló oldószer. Erősen mérgező vegyület, amely a bőrön át is képes felszívódni. A szervezetbe kerülve károsítja a májat, az idegrendszert és a keringést. Kis mennyiségben vakságot okoz, nagyobb mennyiségben halálos. Szintézisgázból (hidrogén és szén-monoxid keverékéből) állítják elő katalitikus reakcióval. [9, 10]

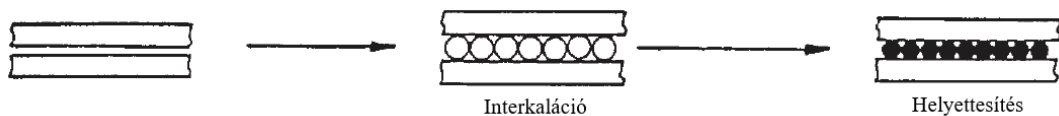
Fontos vegyipari alapanyag. Ecetsavat, formaldehidet, metil-terc-butyl-étert (MTBE) és dimetil-étert állítanak elő belőle. Ma már üzemanyagot is gyártanak belőle. [9, 10]

2.4. Cetil-trimetil-ammónium-klorid

A cetil-trimetil-ammónium-klorid (más néven CTAC, cetrimónium-klorid, hexadecil-trimetil-ammónium-klorid) egy hosszú szénláncú, kis sűrűségű kvaterner ammóniumsó, erős felületaktív anyag. Szobahőmérsékleten fehér, sárgásfehér színű szilárd anyag. Részletes fizikai tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza. Felhasználják különböző kozmetikai cikkek (pl. samponok, hajápolók, rúzsok) alapanyagaként. Fertőtlenítőszerként is szolgál. Gyakran vizes oldat formájában hozzák forgalomba. [9, 10]

2.5. Interkaláció

Az agyagásványok egy része a szerves vegyületek több típusát is meg tudja kötni rétegei között. A kaolinit-félék is képesek különböző vegyületeket adszorbeálni a rétegeik között. A folyamatot, amelynek során a szerves molekulák behatolnak a kaolinrétegek közé, interkalációnak nevezik (4. ábra). Az interkalált vendégmolekulák helyettesíthetők más, erre alkalmas molekulákkal. A nagyméretű molekulák közül gyakran alkalmazzák a kvaterner ammónium-vegyületeket. [10]



4. ábra Interkaláció [11]

Az interkalációs reakciók egyik fajtája az oltás („grafting”). A reakció során a szerves vegyület kovalens kötésekkel alakít ki a kaolinréteg felszíni reaktív SiO- és AlOH-csoportjaival. Ahhoz, hogy a reagens hozzáférjen ezekhez a csoportokhoz, megelőző interkalációs lépésekkel a kaolinrétegeket térben kellően el kell választani. [11]

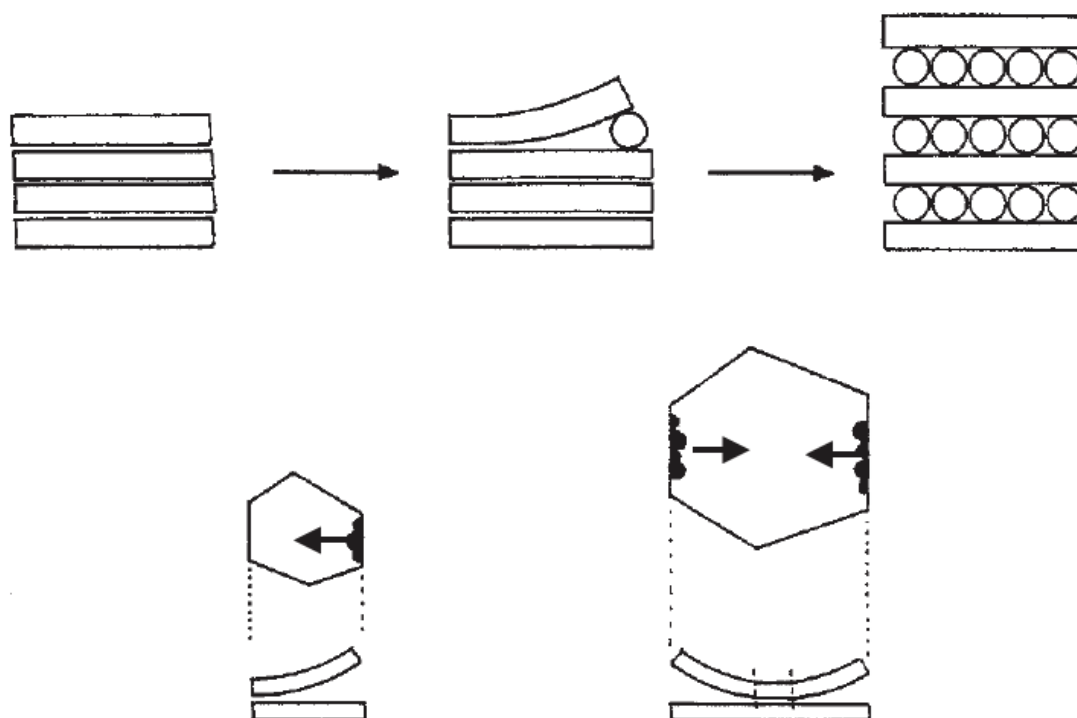
A legtöbb vendégmolekula könnyen eltávolítható mosással vagy hevítéssel, mivel a rétegek közötti tér telítettségé csak akkor érhető el, ha a vendégmolekulák feleslegben vannak jelen a rétegeken kívül. A felesleges molekulák eltávolításakor az interkalált részecskék egy része is távozik. Emiatt az interkalátumok többségének összetételét csak becsülni lehet. [11]

Az interkalátumok elkészítéséhez a kaolinitet és az interkalálószeret olvadék, tömény oldat vagy szuszpenzió formájában elegyítik egymással, általában 60–80 °C hőmérsékleten. Az interkaláció egy lassú folyamat, akár több napot is igénybe vehet.

A reakciósebesség nemcsak a vendégmolekulák minőségétől és mennyiségétől, a hőmérséklettől és (oldatok esetén) a koncentrációtól függ, hanem a kaolinit típusától és szemcseméretétől is. [11] A reakció az interkalációfokkal (α) jellemezhető, amely a nem interkalálódott kaolinit és az interkalált kaolinit röntgendiffraktogramon szereplő 001 reflexióinak intenzitásából/területéből (I_K , I_I) számolható ki (1). [11]

$$\alpha = \frac{I_I}{I_I + I_K} \quad (1)$$

Weiss és társai [12] megállapították, hogy az interkalációs reakció a külső felületen adszorbeálódott vendégmolekulák dipólusmomentumának hatására bekövetkező protonok vándorlása vagy hidroxilcsoport-átrendeződés miatt kezdődik el. Ez az esemény a szemcse szélén a kaolinréteg rugalmas deformációjához vezet, ami megnyitja a rétegek közötti teret a vendégmolekulák számára (5. ábra). Az első vendégmolekulák csak akkor tudnak behatolni, ha az egyik vagy mindkét szomszédos réteg elkezd meggörbülni. A rétegek szétnyílása elősegíti további molekulák bejutását, és a reakciófront a szemcse belseje felé halad. Egy adott szemcsében az átalakulás több fronton is végbemehet, ezt a szemcse mérete és a kaolinit minősége határozza meg. Minél nagyobbak a szemcsék és minél rugalmasabbak a kaolinrétegek, annál gyorsabb a reakció és annál nagyobb az interkalációfok. [11]



5. ábra Interkaláció mechanizmusa.
Alul a nyílak a reakciófront haladási irányát jelölik. [11]

Az interkalációs reakciókat felhasználják az agyagásványok azonosítására, a kaolinrétegek felületének módosítására és a kolloid tulajdonságainak befolyásolására. A kaolinit szerves származékai jó adszorbensek, amelyeket környezetszennyezés elleni védelemre is használnak. Szerves monomerek interkalációjával, majd polimerizációjával pedig kaolinit-polimer nanokompozitok készíthetők. [11]

2.5.1. Kaolinit-DMSO organokomplex

Kristóf és társai [13] szegi kaolinitet interkaláltak DMSO-val. A kaolinból 500 milligrammot 5 cm³ vízmentes DMSO-ban kevertettek egy zárt edényben 80 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A kezelés után centrifugálással elválasztották a szilárd fázist a folyadéktól, majd egy hétig levegőn szárították. Röntgendiffrakciós vizsgálattal megállapították, hogy a kaolinit rétegméttőlődési távolsága 7,2 Å-ről 11,2 Å-re növekedett, csaknem 100%-os interkalációfok mellett. Termoanalitikai vizsgálatokkal megfigyelték, hogy a DMSO hevítés hatására két lépésben távozik az interkalációs komplexből.

Yuan és társai [1] 10 g kaolint keverték el DMSO vizes oldatában. Az oldat 60 ml DMSO-t és 10 ml vizet tartalmazott. Az elegyet 150 °C-on 12 órán keresztül kevertették. A kezelés után a keveréket szobahőmérsékleten 12 órán keresztül állni hagyták. A mintát centrifugálással választották el az oldattól, majd háromszor mosták 1,4-dioxánnal és izopropanollal, hogy eltávolítsák a feleslegben maradt DMSO-t a mintából. A mosás után a mintát egy napig szárították 60 °C-on. A mintát röntgendiffrakcióval vizsgálták. A komplexben a kaolinrétegek közötti távolság 11,2 Å-re nőtt, és 95%-os interkalációfokot sikerült elérniük.

Makó és társai [14] zettlitzai kaolinból állítottak elő kaolinit-DMSO komplexet. A kaolint achát mozsárban nedvesítették DMSO vizes oldatával, majd a keveréket zárt mintatartóban állni hagyták. A minta röntgendiffraktogramján látszott, hogy a rétegismétlődési távolság 11,2 Å-re nőtt. 95%-os interkalációfokot értek el.

Li és társai [15] kaolinit-DMSO komplexet készítettek 50 g kaolin és 100 ml DMSO-oldat felhasználásával. Az oldat 9%(m/m) vizet tartalmazott. Röntgendiffrakcióval vizsgálták a kapott mintát, és a fentiekhez hasonlóan 11,2 Å-ös bázislaptávolságot mértek.

2.5.2. Kaolinit-metanol organokomplex

Yuan és társai [1] kaolinit-DMSO komplexből kiindulva állítottak elő kaolinit-metanol komplexet. A prekursor 5 g-ját 100 ml metanolban kevertették egy hétig. Az eljárást követően a két fázist centrifugálással választották el egymástól. A minta egy részét a metanolban hagyták, a másik részét 60 °C-on 24 órán át szárították.

Az eljárással 93,4%-os interkalációfokot értek el. Röntgendiffrakciós vizsgálattal megállapították, hogy a komplexben a rétegismétlődési távolság 8,5 Å volt.

Li és társai [15] DMSO-val kezelt kaolinitből készítettek kaolinit-metanol komplexet. A kiindulási anyagból 25 g-ot 500 ml metanollal mostak tíz alkalommal.

A minta röntgendiffraktogramján a kaolinit-metanol komplex bázislaptávolsága 9,2 Å körül volt.

2.5.3. Kaolinit-CTAC organokomplex és nanotekercs

Yuan és társai [1] kaolinit-metanol komplexből állítottak elő kaolinit-CTAC komplexet. 40 ml metanos CTAC-oldatban(1M)diszpergáltak1g nedveskaolinit-metanolkomplexet, majd24óránát kevertették. Több mintát is készítettek, amelyeket különböző hőmérsékleteken kevertettek. A szilárd fázist centrifugálással választották el az oldattól. A mintákat hatszor mosták etanollal, és 80 °C-on egy napig szárították. Röntgendiffrakciós vizsgálattal megfigyelték, hogy a CTAC interkalálható a kaolinrétegek károsítása nélkül, nagy (96%) interkalációfok mellett. A mintákban a rétegismétlődési távolság a mosás előtt 39,5 Å, mosás után pedig 8,5 Å volt. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeket is készítettek a mintákról. A mintákban mosás előtt és után is jól láthatók voltak a kaolinitből kialakult nanotekercsek. Méréseik során azt is megállapították, hogy a CTAC-s kezelés hatékonysága a hőmérséklet növelésével 80 °C-ig nőtt.

Makó és társai [14] két lépésben készítettek CTAC-komplexet kaolinit-DMSO és kaolinit-karbamid prekursorokból. A kaolinit-DMSO komplexet tiszta metanolban kezelték egy 100 cm³-es szolvotermális reaktorban, 100 °C-on 24 óráig (6 óránként frissre cserélve a metanolt), hogy 80% feletti interkalációt érjenek el. Ugyanakkor a kaolinit-karbamid komplexnél hasonló kezelés esetén a nagy interkalációfok eléréséhez elegendő volt 18 órás kezelés, a metanol cseréje nélkül.

Li és társai [15] szintén kaolinit-metanol komplexből állítottak elő kaolinit-CTAC komplexet. 5 g prekuzort elegyítettek 500 ml CTAC metanos oldatával. Kísérleteik során az interkalációt

ultrahangos keveréssel próbálták elősegíteni. Megállapították, hogy az ultrahangos kezelés elősegítette az interkalációfok növekedését és a kaolinrétegek feltekeredését. Mintáik röntgendiffraktogramján a CTAC-komplexben a bázislaptávolság 39,1 Å és 38,7 Å között volt.

Zsirka és társai [16] surmini, zettlitzai és szegi kaolinitekből két különböző reakcióúttal (1. kezelés karbamiddal, trietanol-aminnal, tetraalkil-ammonium sóval, nátrium-poliakriláttal; 2. kezelés kálium-acetáttal, etilén-glikollal, n-hexil-aminnal) készítettek kaolinit nanotekercseket. Megállapították, hogy a kialakuló nanotekercsek szerkezete függ a prekursorok előállításának módjától, a hőkezeléstől és a kiindulási kaolinit szerkezetétől. A jobb kristályosodottsági fok elősegíti a nanotekercsek kialakulását.

2.6. Kaolinit és kaolinit-organokomplexek vizsgálati módszerei

2.6.1. Röntgendiffrakció

A polikristályos anyagban jelen lévő különböző kristályos fázisok jellegzetes röntgendiffrakciós képet adnak. A röntgendiffrakciós vizsgálat lehetővé teszi a fázisok minőségének és mennyiségének meghatározását a minta roncsolása nélkül. [17]

A röntgensugárzást általában izzókatódos röntgensőben állítják elő. Az izzókatódból a nagy feszültség hatására elektronok lépnek ki, és nagy sebességgel a fém anódba ütköznek. Az anódfém atomjai gerjesztődnek, majd a relaxáció során az elnyelt energiát karakterisztikus röntgenfotonok formájában sugározzák ki. Ezenkívül az elektronok fékeződése miatt folytonos röntgensugárzás is keletkezik. A röntgensugárzás a fókuszon és a berillium ablakon keresztül lép ki, amelyet úgy alakítanak ki, hogy megszabott irányú és nagyságú nyalábot kapjanak. [17]

Szilárd minták vizsgálatához a mintatartóban nagyszámú, véletlenszerűen elhelyezkedő kristály szemcsére van szükség, ami a minta megfelelő porításával és betöltésével érhető el. [17]

A kristályos fázisok azonosítása a Bragg-törvény (2) szerint az elhajlított sugárzás erősítési helyeinek ismeretében kialakuló, a kristályos vegyületekre jellemző, jellegzetes diffrakciós kép azonosítása alapján történik.

$$2 \cdot d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (2)$$

, ahol d - rácssíktávolság, θ - a sugárzás beesési és elhajlási szöge, n – egész szám, amely reflexió rendűségét adja meg, λ - a sugárzás hullámhossza. [17]

Az elhajlás szögéből a kristályt felépítő rácssíkok közötti távolság, az elhajlított sugárnyaláb intenzitásából pedig az atomok/ionok kölcsönös térbeli helyzete, a pontos kristályszerkezet határozható meg. A röntgendiffraktogram a különböző kristályos fázisokra más és más. A fázisok azonosítása azon alapul, hogy az ismeretlen minta röntgendiffraktogramját egy referencia-adatbázissal (röntgenkártyával) hasonlítjuk össze, ami tartalmazza a tiszta kristályos fázisok d -értékét és relatív intenzitásait. [17]

2.6.3. Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópia a molekulák és az őket alkotó atomok rezgéseinek vizsgálatán alapuló analitikai kémiai technika. A vizsgált minta és az infravörös sugárzás kölcsönhatásából következtetéseket lehet levonni a komponensek minőségéről és mennyiségéről. [18]

Az elektromágneses spektrum infravörös tartományát három részre szokás felosztani: közeli, közepes és távoli infravörös tartományra. Ezek a látható fényhez viszonyított elhelyezkedésükről kapták a nevüket. A közeli $12\,820\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$, a közepes $5000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, a távoli infravörös tartomány pedig $400\text{--}33\text{ cm}^{-1}$ között helyezkedik el. [18]

Az infravörös sugárzás teljes tartománya nem képes gerjeszteni a kémiai részecskék elektronjait. Energiája többnyire csak a molekulákban kötött atomok rezgési és forgási energiaszintjeinek gerjesztésére elegendő. A módszer abszorpción alapszik, azaz a minta spektrumát az elnyelt infravörös sugárzás mennyisége alapján kapjuk meg. [18]

A kaolinit organokomplexeinek vizsgálatánál az infravörös spektrumok jól használhatók (3. táblázat). A kaolinit szerkezeti hidroxilcsoportjainak és az interkalálószernek kölcsönhatásáról adnak tájékoztatást. [18]

3. táblázat A kaolinit és organokomplexeinek jellemző infravörös rezgési sávjai [19, 20]

| Hullámszám (cm^{-1}) | Hozzárendelés |
|---------------------------------|---|
| 3693 | kaolinitreteg belső felületi OH-csoport vegyértékrezgése |
| 3669 | |
| 3653 | |
| 3660 | DMSO-hoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi OH-csoport vegyértékrezgése |
| 3619 | kaolinitreteg belső OH-csoport vegyértékrezgése |
| 3536 | DMSO-hoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi OH-csoport vegyértékrezgése |
| 3504 | |
| 3534 | metanolhoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi OH-csoport vegyértékrezgése |
| 3032 | CH_3 aszimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 3022 | CH aszimmetrikus vegyértékrezgés (DMSO) |
| 3018 | CH_3 szimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 2950 | $\text{CH}_3\text{-R}$ aszimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 2936 | CH szimmetrikus vegyértékrezgés (DMSO) |
| 2916 | CH_2 aszimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 2872 | $\text{CH}_3\text{-R}$ szimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 2849 | CH_2 szimmetrikus vegyértékrezgés (CTAC) |
| 1112 | Si-O vegyértékrezgés |
| 1032 | Si-O vegyértékrezgés |
| 1008 | Si-O vegyértékrezgés |
| 935 | belső felületi Al-OH deformációs rezgés |
| 912 | belső Al-OH deformációs rezgés |
| 796 | OH translációs rezgés |
| 789 | OH translációs rezgés |
| 755 | OH translációs rezgés |

2.6.3. Termikus analízis

A termikus analízis olyan analitikai kémiai technika, amely során hő hatására bekövetkező átalakulási folyamatok vizsgálhatók. Minden olyan módszert, ahol a hőmérséklet és az idő függvényében vizsgáljuk az anyag változását meghatározott atmoszférában, termoanalitikai módszereknek tekintünk. [21]

Legelterjedtebb formái a termogravimetria (TG), amely során a minta tömegvesztését vizsgáljuk a hőmérséklet függvényében, és a differenciál-termoanalízis (DTA), amellyel az entalpiaváltozással járó folyamatok vizsgálhatók. A csatolt technikák alkalmazása, amikor ugyanazzal a mintával szimultán több vizsgálatot végzünk, rendkívül hatékony tud lenni. Általában infravörös- vagy tömegspektroszkópiával egészítik ki a termoanalitikai vizsgálatot. [21]

TG-mérésnél a hevítés hatására bekövetkező tömegváltozást termomérleggel, egyenletes fűtési sebességgel mérjük. Tömegváltozást okozhat a vízvesztés, az oxidációs és bomlási reakciók. Minőségi és mennyiségi analízisre is használható. [21]

Derivatív termogravimetriai (DTG) analízist olyan esetben alkalmaznak, amikor a TG-mérést már nehéz kiértékelni. A tömegváltozás sebességéről szolgáltat információt, ezáltal az egymáshoz időben közel eső TG-részfolyamatok elkülöníthetők lesznek. [21]

A DTA-vizsgálatnál inert anyagot (pl. korrundport) használnak, amit a mintával egy időben egyenletesen hevítenek. A minta és az inert anyag hőmérséklet-különbségét regisztrálva a reakciók exoterm vagy endoterm mivoltáról kapnak tájékoztatást. [21]

2.6.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) anyagvizsgálati módszernél a minta átvilágítása és gerjesztése elektronokkal történik. A TEM-készülékek fontos egységei: az elektronágyú, a kondenzor, az objektív lencse, a mintatartó és a vetítőrendszer.

Az elektronágyúból kilépő nyaláb elektromágnesekkel terelhető és fókuszálható. A kondenzor lencsével tudják az elektron-nyalábot a tárgysíkba vetíteni. Az objektív lencsével lehet a hátsó fókusz síkban létrehozni az elsődleges, már nagyított, köztes képet. A köztes és vetítő lencsével tovább tudjuk nagyítani az elsődleges képet.

A mintához érkező sugarak egy része áthalad, a másik része pedig kölcsönhatásba lép vele (pl. változik az iránya, rezgéssíkja, hullámhossza). Képképzésre a mintán változatlanul átmenő és rugalmatlanul szóródó sugarakat használják. A végső képet a képfelfogó ernyőn és a képrögzítő rendszeren alakítják ki. Az elektronnyaláb szabad terjedéséhez vákuumban végzik az elemzést. Ezenkívül hűtő- és feszültségstabilizáló rendszereket használnak a mikroszkóp állandó és biztonságos működéséhez. [22]

A kaolinit, a kaolinit organokomplexeinek és a kaolinit nanotekercsek morfológiai vizsgálatához rendszeresen használják ezt a módszert. A felvételekből megállapítható a tekercsek külső és belső átmérője, hossza, rendezettsége és relatív gyakorisága. [1, 3, 14, 15]

3. Kísérleti rész

3.1. Kutatási terv

A nanotekercseket a kaolinrétegek közötti térbe megfelelő, pl. szerves molekulák beépítésével és helyettesítésével (interkalációval), valamint deinterkalációval kívántam előállítani a tanszéken már korábban alkalmazott módszerekből kiindulva [14]. A nanotekercsek előállítási módszereinek vizsgálata és fejlesztése hosszabb távon kutatásom részét képezi.

A jelenlegi kutatásom célja, hogy kísérleti úton összefüggéseket figyeljek meg a kiindulási kaolinit kristályosodottsági foka és a kialakult nanotekercsek tulajdonságai között. Továbbá azt is szeretném jobban megismerni, hogy az előbbieket hogyan befolyásolják az interkaláció egyes lépéseit.

A kutatás során három különböző kristályosodottságú kaolinnal dolgozom. Mindegyik kaolinitet ugyanazzal a három interkalációs lépéssel alakítom át nanotekercsekké [14]. Az első lépésben a kaolinit rétegek közötti tereibe DMSO-t viszek be. A második lépésben a DMSO-t metanollal helyettesítem. A harmadik lépésben a rétegek közé CTAC-t viszek be, majd intenzív etanos mosással eltávolítom.

Röntgendiffrakciós (XRD) vizsgálatokkal igazolom a komplexek kialakulását, és mérem az interkalációs lépések hatékonyságát. Infravörös spektroszkópiával (FT-IR) és termogravimetriával (TG) alátámasztom a kaolinit organokomplexek kialakulását. A TG-mérésekkel a komplexek termikus stabilitását is vizsgálom. Transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) jellemzem a nanotekercsek szerkezetét.

3.2. Alkalmazott eszközök és műszerek

A röntgendiffrakciós felvételeket Philips PW3710 típusú diffraktométerrel, monokromatikus CuK α (50 kV, 40 mA) sugárzással és Xe gázzal töltött proporcionális detektorral mértem. A kezeletlen, a DMSO-val és a metanollal kezelt kaolinról 0,02 °2 θ /s sebességgel (0,02 °2 θ lépésközzel és 1 s lépésenkénti várakozási idővel), 1°-os divergencia- és szóráscsökkentő résekkel készültek a felvételek. A CTAC-val kezelt mosatlan és mosott minták felvételeit 0,004 °2 θ /s sebességgel (0,02 °2 θ lépésközzel és 5 s léptetési idővel), ½ °-os résekkel készítettem. A mérendő mintát először achát mozsárban porítottam, majd betöltöttem az alumínium mintatartóba, és üveglapok segítségével sík felületet alakítottam ki. A mérési adatok gyűjtése és a készülék vezérlése az X'Pert Data Collector programmal történt. A mérés végeztével az X'Pert Data Viewer programmal, a kaolinit PDF00-014-164 és a kvarc PDF00-033-1161 röntgenkártyája segítségével meghatároztam a pontos csúcspozíciókat és a szükséges korrekciót. Az interkalációfok számításához szükséges integrált intenzitásokat (területeket) az X'Pert HighScore Plus programmal határoztam meg.

Az infravörös spektroszkópiai mérések Bruker Vertex 70 Fourier-transzformációs infravörös spektrométerrel, Platinum ATR optikával, DTGS detektorral, szobahőmérsékleten zajlottak. Minden mintánál 512 spektrum 2 cm⁻¹ felbontással készült. A spektrumokat összegeztük a jel-zaj viszony javítása érdekében.

A minták termikus analíziséhez Netzsch 409 STA (Netzsch, Németország) szimultán TG(DTG)-DSC készüléket alkalmaztunk. A mintákat nyitott kerámiatégelybe helyeztem, majd Ar atmoszférában, 10 °C/min felfűtési sebességgel mértük.

A TEM-vizsgálatokhoz vízben (10–20 s) ultrahangozással diszpergáltuk a minta szemcséit, majd folytonos amorf szénhártyával bevont Cu mikrorostélyra (grid) cseppentettünk a szuszpenzióból. A méréseket egy Talos F200X G2 (Thermo Fisher) típusú, 200 kV gyorsítófeszültséggel üzemelő

elektronmikroszkóppal végeztük. A kristályhalmazokról világos látóterű, amplitúdókontrasztos képeket készítettünk különböző nagyításokon. Az egyedi szemcsék jellemzését a fent leírtakkal megegyező módon, de ultravékony szénhártyával ellátott arany gridre preparált mintán végeztük. A minta szemcséiről nagyfelbontású, fáziskontrasztos TEM- (HRTEM-) felvételek készültek. A HRTEM-képek azonos nagyítás mellett, egy másodperces expozíciós idő, ~67 pA sugáráram és ~50 e⁻/Å²s elektrondózis mellett készültek.

A kísérletek során használtam egy POL-EKO-APARATURA márkájú, SLW 53 Smart típusú szárító szekrényt. Maximális üzemi hőmérséklete 300 °C, és 1700 W teljesítmény leadására képes.

A minták etanolos mosásánál a laborban Elma-Hans Schmidbauer GmbH márkájú, Elmasonic S60 típusú ultrahangos keverőt használtam. Működése közben 150 W teljesítmény leadása mellett 37 kHz frekvenciájú ultrahangot állít elő.

3.3. Alkalmazott kaolinok és interkalálószerke

Vizsgálataimhoz három különböző kaolint használtam fel: surmini, zettlitzzi és szegi kaolint.

A surmini kaolin Lengyelországból származik, és 83%(m/m) kaolinitet tartalmaz. Kaoliniten kívül 12%(m/m) kvarcot és 7%(m/m) muszkovitot tartalmaz. Oxidos összetétele a 4. táblázatban található. A kaolinitre számított HI 1,40, az AGFI 1,27, ami összevetve az irodalmi besorolással (1. és 2. táblázat) jól kristályosodott kaolinitnek felel meg.

A zettlitzzi kaolin Csehországból származik, és 91%(m/m) kaolinitet tartalmaz. Ezen kívül 2%(m/m) kvarcot és 7%(m/m) muszkovitot tartalmaz. Oxidos összetételét a 4. táblázatban tüntettem fel. A kaolinitre számított HI 0,91, az AGFI 0,90, ami összevetve az irodalmi besorolással (1. és 2. táblázat) közepesen kristályosodott típust jelent.

A szegi kaolin magyar lelőhelyről származik, és 46%(m/m) kaolinitet és 49%(m/m) halloysitot (7 Å) tartalmaz. Ezen kívül 3%(m/m) kvarcot, 2%(m/m) albitot és ortoklásztt tartalmaz. A szegi kaolin oxidos összetétele a 4. táblázatban található. A számított HI 0,36, az AGFI 0,74, ami összehasonlítva az irodalmi adatokkal (1. és 2. táblázat) rosszul kristályosodottnak felel meg.

A kísérletekhez interkalálószerként DMSO-t (Sigma-Aldrich, puriss), metanolt (Scharlab Mo. Kft., a.r.), valamint CTAC-t (Alfa Aesar) használtam fel.

4. táblázat A felhasznált kaolinok oxidos összetétele

| Oxidok | Kaolin | | |
|---------------------------------------|--------|------------|---------|
| | Szegi | Zettlitzzi | Surmini |
| SiO ₂ %(m/m) | 46,74 | 46,23 | 52,1 |
| Al ₂ O ₃ %(m/m) | 33,12 | 36,74 | 34,1 |
| Fe ₂ O ₃ %(m/m) | 2,96 | 0,88 | 0,6 |
| CaO %(m/m) | 0,37 | 0,8 | 0,1 |
| K ₂ O %(m/m) | 0,27 | 0,66 | 0,6 |
| Na ₂ O %(m/m) | 0,12 | - | - |
| MgO %(m/m) | 0,26 | 0,28 | 0,1 |
| TiO ₂ %(m/m) | 0,03 | 0,05 | 0,6 |
| Izzítási veszteség | 15,5 | 13,36 | 11,8 |

3.4. Kaolinit-organokomplexek előállítás

Mindhárom kaolinitből ugyanazon a három interkalációs lépésen keresztül állítottam elő nanotekercseket. A kiindulási anyagokból és a reagensekből is azonos mennyiségeket használtam fel, amelyeket táramérlegesen mértem be századgrammos pontossággal.

Az első lépésben a kaolinitet DMSO-val interkaláltam Makó és társai [23] által megadott homogenizációs módszerrel. A DMSO-ból 9:1 tömegarányú vizes oldatot készítettem. Az oldat 0,84 grammját achátmozsárban 2,16 gramm kaolinnal kevertem el, majd a keveréket centri-fugacsőbe töltöttem. A mintát szárítószekrényben 60 °C-on 24 órán keresztül állni hagytam.

A második lépésben az előzőleg kapott prekuzort metanollal kezeltem, hogy a DMSO-t eltávolítsam, és eközben a metanollal interkaláljam a kaolinitet. A mintából 2 grammot 75 ml metanolban szuszpendáltam. Az elegyet egy teflonbéléses autoklávban (reaktorban), szárítószekrényben 9 órán keresztül 130 °C-on kezeltem. Miután elkészültem, a szuszpenziót centrifugáltam, majd a használt metanolt tisztára cseréltem, és megismételtem a kezelést. A kezelést mindegyik mintával háromszor végeztem el Viola [24] kísérleteinek megfelelően.

A harmadik lépésben a kaolinit-metanol komplexet cetil-trimetil-ammónium-kloriddal (CTAC) interkaláltam Yuan és társai leírása szerint [1]. A szilárd CTAC-ból 12,4 grammot lombikba mértem, majd ebbe metanollal átmostam 1 gramm kaolinit-metanol komplexet úgy, hogy a lombikban lévő anyag mennyisége összesen 40 ml legyen.

A lombikban lévő mintát mágneses keverő segítségével 80 °C-on, 100 1/perc fordulatszámmal 48 órán keresztül kevertettem, majd centrifugáltam, végül a fennmaradó CTAC-oldatot leöntöttem róla. A kaolinit nanotekercseket a kaolinit-CTAC komplexből a CTAC-molekulák deinterkalációjával állítottam elő, ami a komplex etanolos mosását jelenti [1].

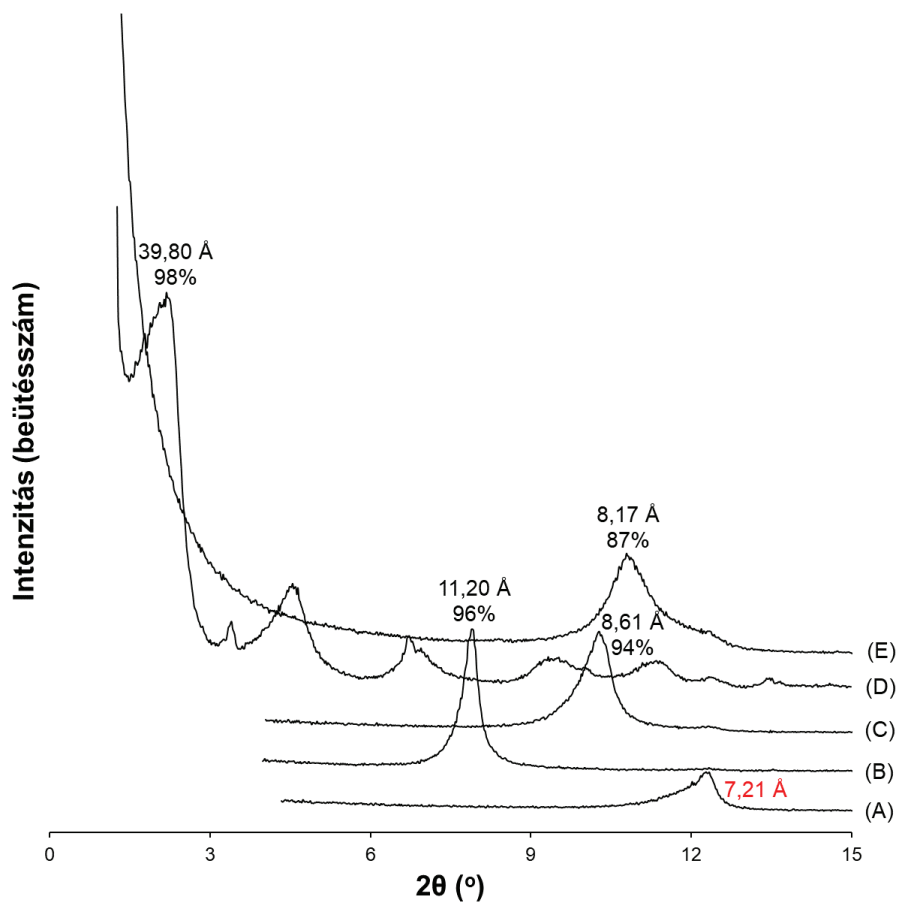
A harmadik lépésben kapott mintát 20 ml etanolban szuszpendáltam, majd ultrahangos fürdőben 5 percig mostam, majd centrifugáltam. Ezt a műveletet hatszor ismételt meg.

3.5. Röntgendiffrakciós vizsgálatok

A kaolin mintákon kezeletlenül, minden interkalációs lépés után, és végül az etanolos mosást (deinterkalációt) követően röntgendiffrakciós vizsgálatokat végeztem.

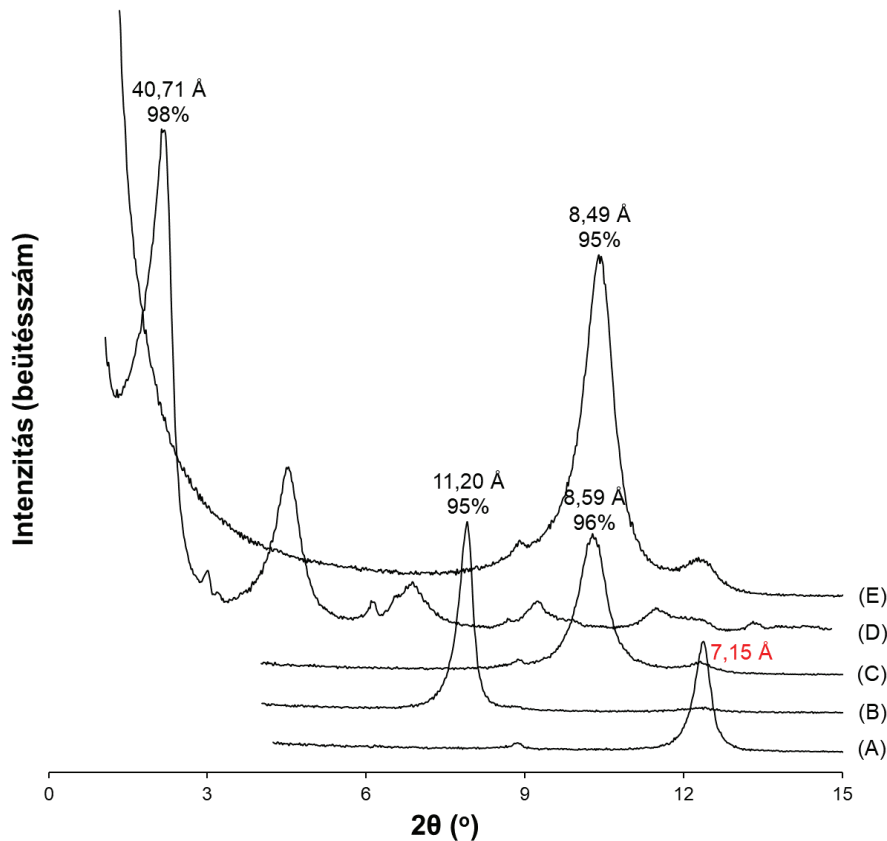
A röntgendiffraktogramokon (6., 7. és 8. ábra) nyomon követhető a kaolinit rétegismétlődési távolságának változása az eljárás során, ami jelzi a kaolinit-organokomplexek kialakulását. A kezeletlen mintáknál jól látható a kaolinitre jellemző reflexió (7,2 Å). Ennek a csúcsnak az integrál intenzitása (területe) arányos a nem interkalálódott kaolinit mennyiségével, amit az interkalációfok számítására használtam fel. Az összesített ábrákon (6., 7. és 8. ábra) jelöltem a rétegismétlődési távolságokat és az interkalációfokokat.

A 6. ábrán a szegi minták röntgendiffrakciós felvételei szerepelnek. Az (A)-val jelölt kezeletlen kaolinról készült felvételen jól látható, hogy a 7,2 Å-ös csúcs széles és aszimmetrikus. Ennek oka a kaolinit és a halloysit (7 Å) együttes jelenléte, valamint rossz kristályosodottsága. A felvételen megfigyelhető, hogy minden interkalációs kezelés után marad át nem alakult kaolinit fázis, amelynek csúcsa változatlan helyen (~7,2 Å) látható. A DMSO-kezelésnél (B) a kaolinit-DMSO komplex kialakulását bizonyítja a 11,2 Å-ös csúcs megjelenése [1]. Ebben a lépésben 96%-os interkalációfokot értem el. A metanolos kezelésnél (C) a metanol sikeres interkalációját a 8,6 Å-ös csúcs megjelenése igazolja [1]. Az interkalációfok ebben a lépésben 94% lett. Az utolsó interkalációs lépésben (D) a CTAC beépülését a 39,8 Å-ös csúcs jelzi [1]. Ennek a lépésnek az interkalációfoka 98%. A deinterkalációt (etanolos mosást) követően (E) a nanotekercsek kialakulását a 8,17 Å-ös csúcs megjelenése jelzi [1].



6. ábra Szegi kaolin minták röntgendiffraktogramjai
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

Ez az érték 0,33 Å-mel marad el az irodalmi értéktől (8,5 Å). A számított interkalációfok ebben az esetben 87%, bár az illesztést erősen nehezítette a csúcsok átlapolódása és kiszélesedése. Összességében minden lépésnél nagy interkalációfokot (87–98%) értem el.

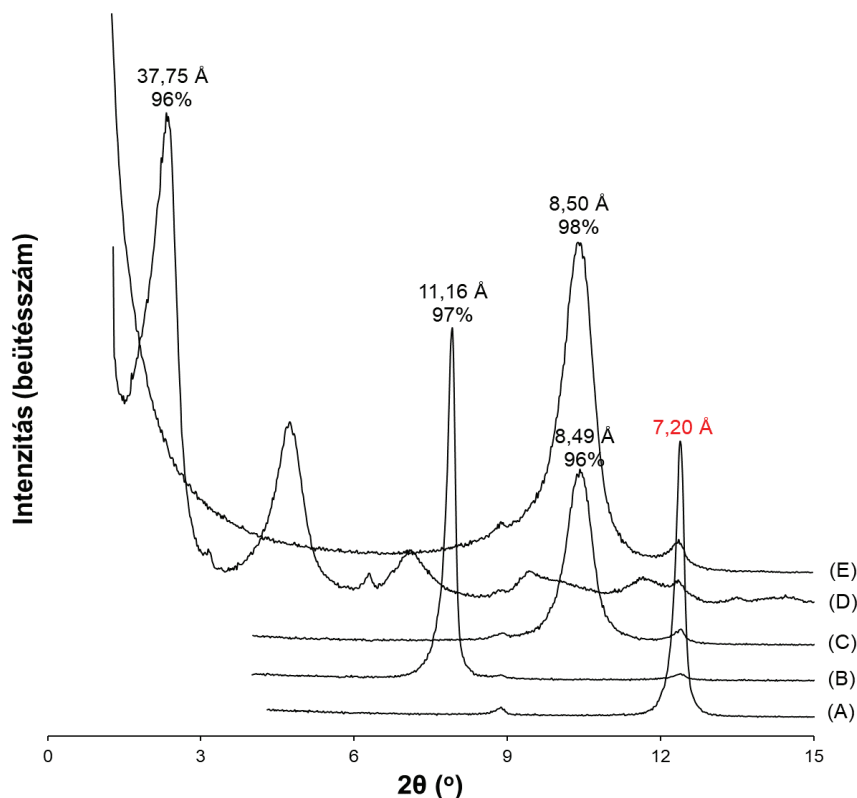


7. ábra Zettlitz kaolin minták röntgendiffraktogramjai
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

A 7. ábrán láthatók a zettlitz minták röntgendiffrakciós felvételei. A szegi kaolinnal összehasonlítva a kezeletlen kaolinit (A) 7,2 Å-ös csúcsa szimmetrikusabb és élesebb, ami a kaolinit jobb kristályosodottságát jelzi. A második lépésben (B) 11,2 Å-nél mutatkozik a kaolinit-DMSO komplexre jellemző csúcs, ugyanúgy, mint a szegi minta esetén [1]. Az interkalációfok is hasonló: 95%.

A metanos kezelésnél (C) a 8,59 Å-ös csúcs megjelenése bizonyítja a komplex kialakulását [1]. Ennek a lépésnek az interkaláció foka a szegi mintával összehasonlítva kicsivel több: 96%. A CTAC-kezelés során kialakult komplex jelenlétét a 40,71 Å-ös csúcs igazolja [1]. Ebben a lépésben 98%-os interkalációfokot értem el. Az etanos mosás után a nanotekercsre jellemző csúcs 8,49 Å-nél jelent meg [1]. Ez közelebb áll az irodalmi értékhez (8,5 Å), mint a szegi mintánál mért érték. Az interkalációfok is nagyobb: 95%.

A röntgendiffraktogramon megfigyelhető, hogy a DMSO-s, metanos és CTAC-s kezelés során számított interkalációfokok közel azonosak a szegi mintákéval. Az etanos mosás után azonban a zettlitz mintánál nagyobb interkalációfokot tudtam elérni.



8. ábra Surmini kaolin minták röntgendiffraktogramjai
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

A 8. ábrán a surmini minták röntgendiffraktogramjai szerepelnek. Összehasonlítva a kezeletlen surmini kaolin XRD-felvételét (A) a szegi és a zettlitz kaolinéval, itt a legszimmetrikusabb, legélesebb és legnagyobb intenzitású a kaolinit 7,2 Å-ös csúcsa, mivel a három kaolin közül ebben van a legjobban kristályosodott kaolinit. A DMSO-kezelésnél (B) a komplex kialakulását a 11,16 Å-ös csúcs megjelenése bizonyítja [1]. Ebben a lépésben 97%-os interkalációfokot értem el. A metanolos interkaláció (C) után a kaolinit-metanol komplexre jellemző csúcs 8,49 Å-nél jelent meg [1]. Ebben a lépésben 97%-os interkalációfokot sikerült elérnem. A CTAC-kezelés (D) során kialakult komplex jelenlétét a 37,75 Å-ös csúcs mutatja [1]. Ez eltér az irodalomban írt 39,5 Å-ös értéktől. Az interkalációfok 98% lett. A deinterkalációt (E) követően a nanotekercsre jellemző csúcs 8,5 Å-nél jelent meg, ami pontosan megegyezik az irodalmi értékkel [1]. Ebben a lépésben ezzel a kaolinnal értem el a legnagyobb hatásfokot, ami 98%-os interkalációfokot jelentett.

Összegezve az eredményeket, megállapítható, hogy az egymást követő DMSO-s, metanolos és CTAC-s interkalációs lépésekben a kaolinit kristályosodottságától függetlenül igen hasonló, nagy interkalációfokokat (94–98%) értem el. A kaolinit-DMSO és a kaolinit-metanol komplexek rétegismétlődési távolsága közel azonos volt, míg a kaolinit-CTAC komplex rétegismétlődési távolsága között kisebb eltérés mutatkozott.

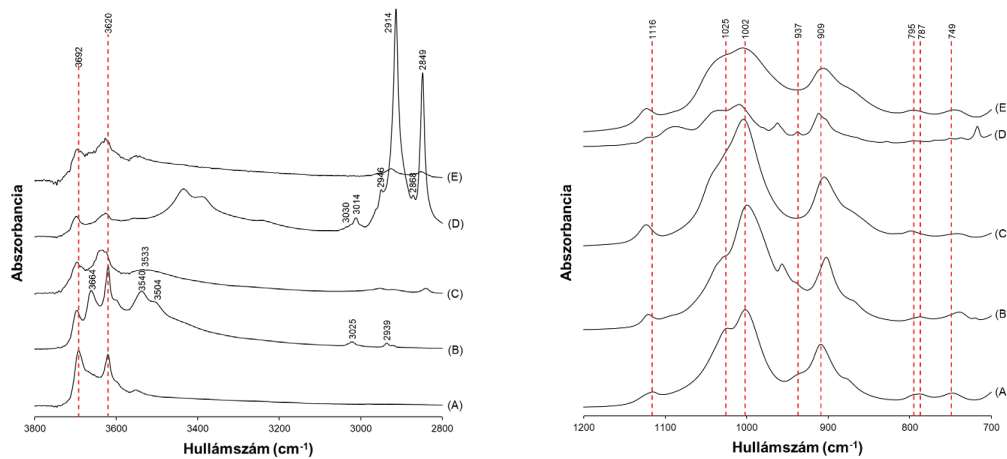
3.6. Infravörös spektrometriai vizsgálatok

Az elkészített interkalátumok molekuláris szerkezetét, a kaolinit és az interkalálószer között kialakított kapcsolatokat FT-IR-spektrometria segítségével vizsgáltam. Ez fontos információt szolgáltat az interkalációs komplexek szerkezetének jellemzéséhez.

A felvételekről összesített ábrákat (9., 10. és 11. ábra) készítettem, amelyeken 3800–2800 cm^{-1} és 1200–700 cm^{-1} hullámszám között láthatók a spektrumok. A különböző kaolinokról kezeletlenül, az egyes interkalációs lépések és a deinterkaláció után készültek mérések. Az ábrákon szaggatott vonallal jelöltem a kiindulási kaolinit jellegzetes rezgési sávjait.

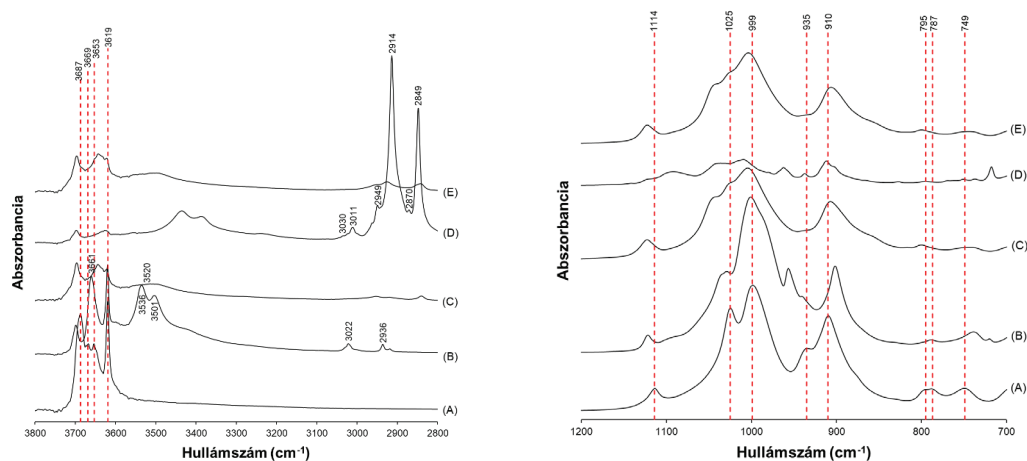
A 9. ábra a szegi kaolinból készült minták infravörös spektrumait tartalmazza. Az (A) jelű spektrum a kezeletlen szegi kaolinról készült. Rosszul kristályosodott kaolinitek esetén, mint amilyen a szegi kaolinit, a belső hidroxilcsoportokra jellemző 3620 cm^{-1} hullámszámú rezgési sáv a belső felületi hidroxilcsoportokra jellemző 3692 cm^{-1} hullámszámúhoz viszonyítva kisebb intenzitású, valamint a 3669 cm^{-1} és 3653 cm^{-1} hullámszámú belső felületi hidroxilcsoportokra jellemző sávok alig vagy egyáltalán nem különülnek el [25]. Az interkaláció és a deinterkaláció hatására a 3620 cm^{-1} és 3692 cm^{-1} , a 937 cm^{-1} és 909 cm^{-1} (belső felületi és belső Al-OH deformációs rezgési) sávok intenzitás aránya megváltozik [1, 16]. Az is megfigyelhető, hogy az interkaláció és a nanotekercsek kialakulása során az Si-O vegyértékrezgési sávok (1116 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 1002 cm^{-1}) kiszélesednek, összeolvadnak és eltolódnak. A DMSO-val kezelt minta spektrumán (B) öt új rezgési sáv jelenik meg. A DMSO-molekula CH szimmetrikus (2939 cm^{-1}) és aszimmetrikus (3025 cm^{-1}) rezgési sávjai, és a DMSO-hoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgési sávjai (3504 cm^{-1} , 3540 cm^{-1} , 3664 cm^{-1}) [1]. Az utóbbiak jelzik a DMSO sikeres interkalációját.

A metanolos kezelés után (C) egyetlen rezgési sáv megjelenése igazolja a metanol beépülését, a metanolhoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgése (3534 cm^{-1}) [1]. A CTAC interkalációját követően (D) több új rezgési sáv is megjelenik. A CTAC-molekulák CH_3 -R szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2868 cm^{-1} , 2946 cm^{-1}), a CH_2 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2849 cm^{-1} , 2914 cm^{-1}), valamint a CH_3 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (3014 cm^{-1} , 3030 cm^{-1}) [1]. Ebből is látszik, hogy a CTAC dipólus-dipólus kölcsönhatás révén kapcsolódik a kaolinrétegekhez. A deinterkaláció utáni infravörös spektrumon (E) látszik, hogy a mosással alapvetően sikerült eltávolítanom az interkalálószerrel, mivel a CTAC-re jellemző rezgési sávok szinte teljesen eltűntek. Az is megfigyelhető, hogy a kaolinitre jellemző rezgési sávok intenzitás aránya megváltozott és kiszélesedett.



9. ábra Szegi kaolin minták infravörös spektrumai ($3800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ és $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$)
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

A 10. ábra a zettlitzai kaolinból készült minták infravörös spektrumait tartalmazza. A kezeletlen kaolinit (A) jobb kristályosodottságát az jelzi, hogy a 3619 cm^{-1} hullámszámú sáv a 3687 cm^{-1} hullámszámú sávhoz viszonyítva nagyobb intenzitású, valamint a 3669 cm^{-1} és 3653 cm^{-1} hullámszámnál lévő sávok megjelennek [25].

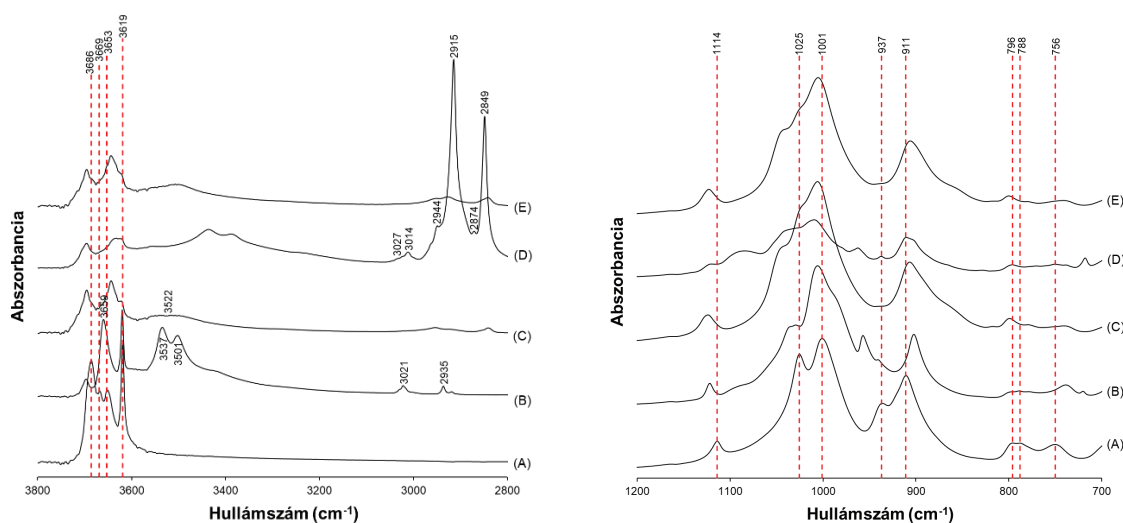


10. ábra Zettlitz kaolin minták infravörös spektrumai ($3800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ és $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$)
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt, D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

Az interkaláció hatására a 3619 cm^{-1} és 3687 cm^{-1} sávok intenzitás aránya megváltozik, és a 3669 cm^{-1} és 3653 cm^{-1} hullámszámnál lévő sávok eltűnnek [1]. A szegi kaolinhoz hasonlóan a 935 cm^{-1} és 910 cm^{-1} deformációs rezgési sávok intenzitás aránya is megváltozik az interkaláció hatására [16]. Emellett az Si-O vegyértékrezgési sávok kiszélesednek, és nagyobb hullámszámú irányba tolódnak el az interkaláció hatására. A DMSO-val kezelt minta spektrumán (B) az interkalálószerre jellemző rezgési sávok jelennek meg. A CH szimmetrikus és aszimmetrikus rezgési sávjai (2936 cm^{-1} , 3022 cm^{-1}) és a DMSO-hoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgési sávjai (3501 cm^{-1} , 3536 cm^{-1} , 3661 cm^{-1}) [1]. Az utóbbiak a DMSO beépülését mutatják.

A metanolos kezelés után (C) a metanolhoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgési sávja (3520 cm^{-1}) jelzi a metanol interkalációját [1]. A CTAC-s kezelés hatására (D) több új rezgési sáv is megjelent.

A CTAC-molekulák $\text{CH}_3\text{-R}$ szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2870 cm^{-1} , 2949 cm^{-1}), a CH_2 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2849 cm^{-1} , 2914 cm^{-1}), valamint a CH_3 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (3011 cm^{-1} , 3030 cm^{-1}) [1]. A deinterkaláció utáni infravörös spektrumon (E) látszik, hogy a mosással nagyrészt sikerült eltávolítanom a CTAC-t, mivel az erre jellemző rezgési sávok szinte teljesen eltűntek. Továbbá az is látható, hogy a kaolinitre jellemző rezgési sávok intenzitás arányai megváltoztak, és szélességük megnőtt.



11. ábra Surmini kaolin minták infravörös spektrumai ($3800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ és $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$)
A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt, D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

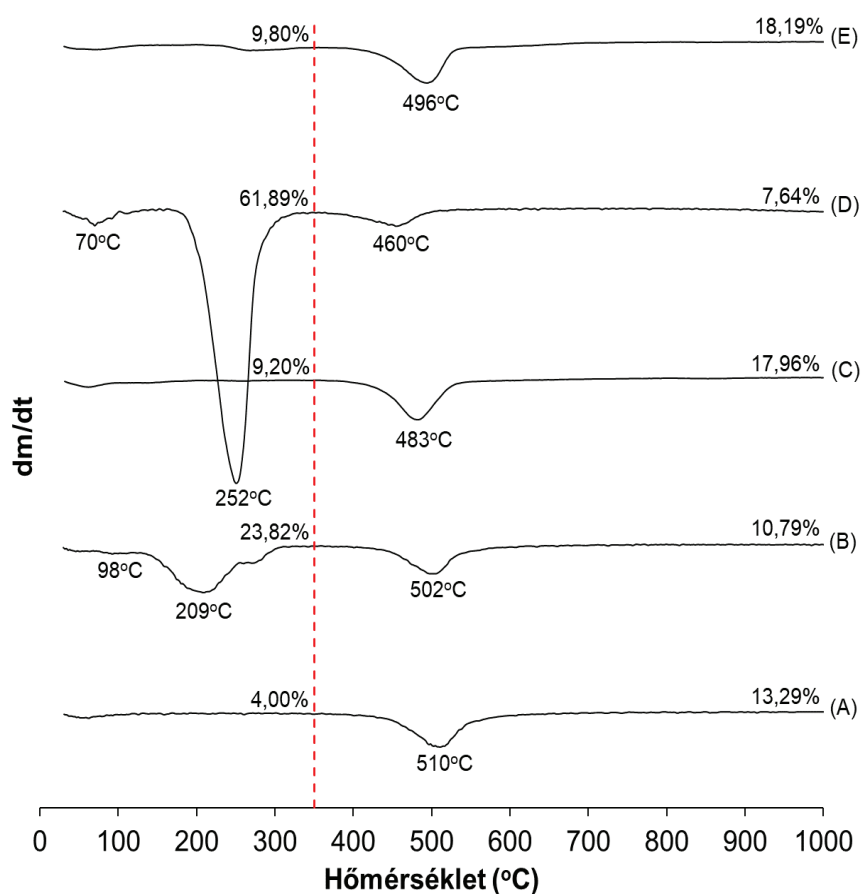
A 11. ábra a kezeletlen és a kezelt surmini kaolin minták infravörös spektrumait mutatja. A kezeletlen kaolinit (A) jó kristályosodottságát az jelzi, hogy a 3619 cm^{-1} hullámszámú sáv nagyobb intenzitású, mint a 3686 cm^{-1} hullámszámú sáv, és a 3669 cm^{-1} és 3653 cm^{-1} hullámszámú sávok jól láthatók [25].

A másik két kaolinhoz hasonlóan az interkaláció hatására itt is megváltozik a 3619 cm^{-1} , 3653 cm^{-1} , 3669 cm^{-1} és 3686 cm^{-1} , valamint a 937 cm^{-1} és 911 cm^{-1} rezgési sávok intenzitás aránya [16]. Az interkaláció során az Si-O vegyértékrezgési sávok kiszélesednek, és nagyobb hullámszám irányába tolódnak el. A DMSO-val interkalált minta spektrumán (B) megjelennek a DMSO CH szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2935 cm^{-1} , 3021 cm^{-1}) és a DMSO-hoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgési sávjai (3501 cm^{-1} , 3537 cm^{-1} , 3659 cm^{-1}) [1]. Ezek a sávok jelzik a sikeres interkalációt. A második interkalációs lépést követően (C) a metanolhoz hidrogénkötéssel kötődő belső felületi hidroxilcsoport vegyértékrezgési sávja (3522 cm^{-1}) mutatja a metanol beépülését [1]. A CTAC interkalációját követően (D) megjelentek a CTAC-molekulák $\text{CH}_3\text{-R}$ szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2874 cm^{-1} , 2944 cm^{-1}), a CH_2 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (2849 cm^{-1} , 2915 cm^{-1}), valamint a CH_3 szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgési sávjai (3014 cm^{-1} , 3027 cm^{-1}) [1]. Az etanolos mosás hatására az infravörös spektrumon (E) a CTAC-re jellemző rezgési sávok szinte teljesen eltűntek, valamint

a kaolinit rezgési sávjai intenzitás arányukban és szélességükben is megváltoztak a nanotekercsek kialakulása miatt.

3.7. Termogravimetriai vizsgálatok

Termogravimetriai vizsgálatokat a különböző kaolinokról kezeletlenül, az egyes interkalációs lépések és a deinterkaláció után végeztem el. A vizsgálatoknál a DTG-görbék (12., 13. és 14. ábra) jól jellemzik a mintákban hevítés hatására végbemenő, tömegváltozást okozó részfolyamatokat. Az ábrákon feltüntettem a lejátszódó folyamatok csúcshőmérsékletét, illetve a 350 °C (az ábrákon vörös szaggatott vonal) alatti (30–350 °C) és feletti (350–1000 °C) tömegveszteség százalékos értékeit is.



12. ábra Szegi kaolin minták DTG-görbéi

A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt, D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

A kezeletlen kaolinok DTG-görbéin (12., 13., 14. ábra) 100 °C alatt megfigyelhető kis tömegveszteség mutatja meg a minta adszorpciós víztartalmát. 510–527 °C körül jóval nagyobb tömegveszteség jelentkezik, amit a kaolinit dehidroxilációja, vagyis a kémiaailag kötött víz távozása okoz. Az adszorpciós víz és a hidroxilcsoportok jelen vannak a kaolinit-komplexekben és a kialakult nanotekercsekben is, így ezek a folyamatok a kezelt minták DTG-görbéin is megjelennek. [26] Összehasonlítva a három kezeletlen kaolint, megállapítható, hogy a szegi kaolin tartalmazza

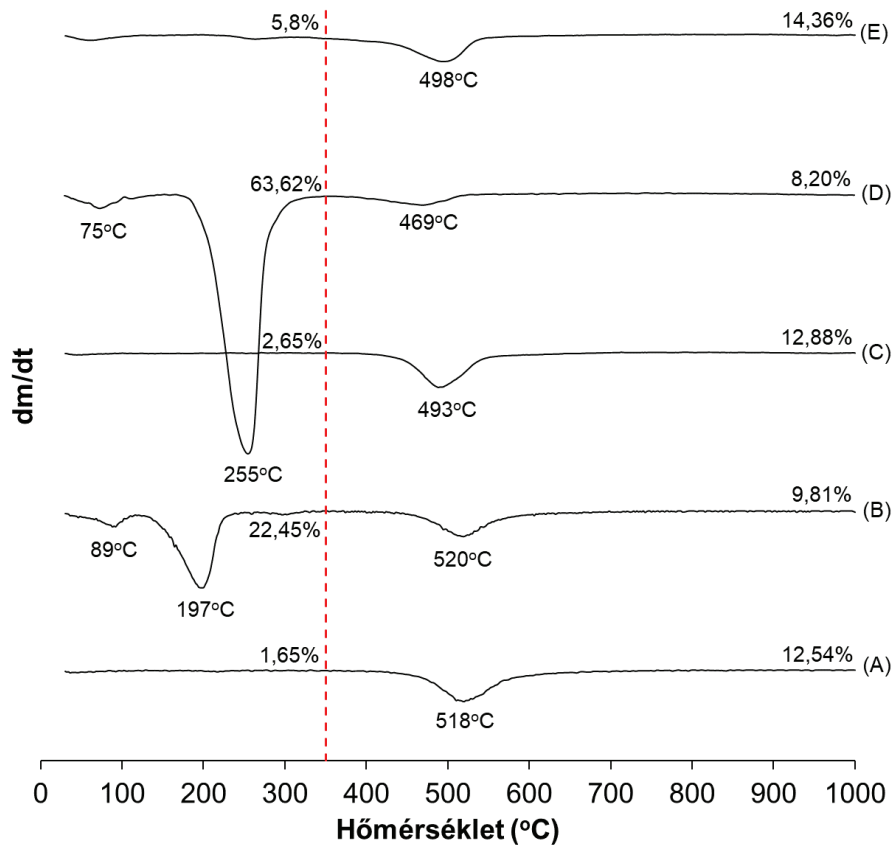
a legtöbb adszorbeált és kémiaailag kötött vizet. Ennek egyik oka, hogy a szegi kaolin halloysitot is tartalmaz, amelyben kisebb mennyiségű rétegeközi víz is jelen van. Ennek másik oka, hogy a szegi kaolin összességében 95%(m/m) kaolinitet és halloysitot tartalmaz, míg a másik két kaolinnak 90%(m/m) alatt van a kaolinit tartalma. Megfigyelhető továbbá, hogy a kémiaailag kötött víz távozásának (dehidroxilációnak) a DTG-csúcs hőmérséklete a kristályosodottsági fok csökkenésével csökken.

A kaolinit-DMSO komplexeket tartalmazó mintáknál a DTG-görbén az interkalálószer távozásával egészülnek ki a tömegváltozást okozó részfolyamatok (12., 13., 14. ábra). A szakirodalom leírásának megfelelően a komplex 200 °C-ig képes megőrizni a stabilitását. A DMSO két jól elkülönülő lépésben deinterkalálódik, ami arra enged következtetni, hogy az interkalálószer két különböző orientációban kapcsolódik a kaolínrétegek felületéhez. A gyengébben kötött molekulák az interkalált DMSO ~15%-át teszik ki, és 25–125 °C között távoznak. Az erősebben kapcsolódó része a molekuláknak 125–250 °C között távozik a rétegek közül. [21]

A kaolinit-metanol komplexek DTG-görbéin (12., 13., 14. ábra) látható, hogy a kezelés hatására a DMSO-t sikerült eltávolítanom, mert a DMSO-ra jellemző 250 °C alatti DTG-csúcsok eltűnnek. Az interkaláció során a metanol egy része a kaolínrétegek felületén adszorbeálódik, a másik része pedig a felületi OH-csoportok helyére épül be [1]. A metanol ezért két lépésben, az adszorpciós vízzel és a kémiaailag kötött vízzel együtt távozik. Emiatt jelenléte a mintában csak a tömegvesztés növekedésében figyelhető meg. A szegi kaolínból készült minta esetén nagyobb tömegvesztést kaptam a másik két kaolínból készült mintához képest.

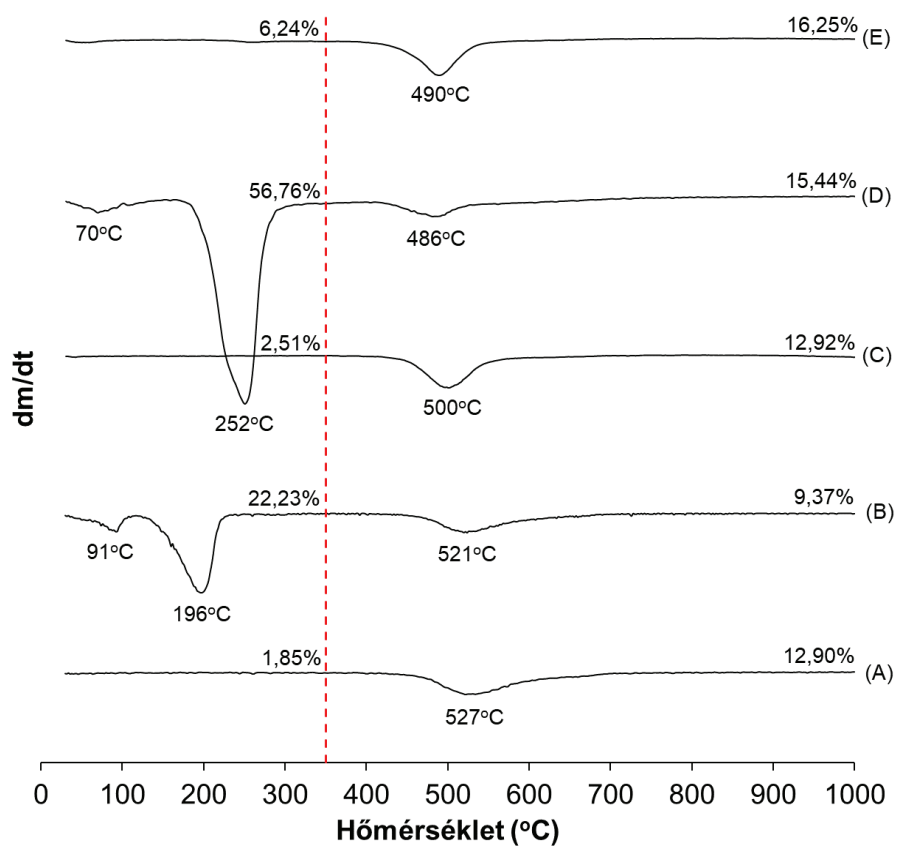
A CTAC-vel kezelt minták DTG-görbéin (12., 13., 14. ábra) jól láthatók az interkalálószerre jellemző DTG-csúcsok 250 °C körül. A minták 170–350 °C közötti tömegvesztését összehasonlítva a tiszta CTAC azonos hőmérséklet-tartományban mért tömegvesztésével kiszámolható a minták CTAC-tartalma [14]. Ebben a hőmérsékleti tartományban a szegi kaolínból készült minta tömegvesztése 56,61%, a zettlitzai kaolínból készült minta tömegvesztése 57,44%, és a surmini kaolínból készült minta tömegvesztése 48,94%. Az 1:1 arányú CTAC-korund (Al_2O_3) keverék tömegvesztése 170–350 °C között 49,53%. Ezekből az adatokból a CTAC-s kezelések interkalációfokát figyelembe véve azt kaptam, hogy a szegi minta ~57%, a zettlitzai minta ~58%, a surmini minta pedig ~49% CTAC-t tartalmazott.

Az etanollal mosott minták DTG-görbéi (12., 13., 14. ábra) hasonlóak a metanollal kezelt mintákéhoz, a látható tömegvesztés-növekedést a mosás után visszamaradó CTAC, metanol és metoxi-csoportok okozzák.



13. ábra Zettlitz kaolin minták DTG-görbéi
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

A különböző komplexek a hevítés hatására hasonlóan viselkednek, és a meghatározott tömegveszteségek is közel azonosak. Az ábrákon megfigyelhető, hogy a DMSO-s, metanolos és CTAC-s interkalációs lépések során (B, C, D), ahol a kaolinrétegeket egyre jobban elválasztjuk egymástól, egyre kisebb lesz a dehidroxilációs DTG-csúcs hőmérséklete. A nanotekercsek kialakulása után pedig megnő, de nem éri el az eredeti hőmérsékletet.



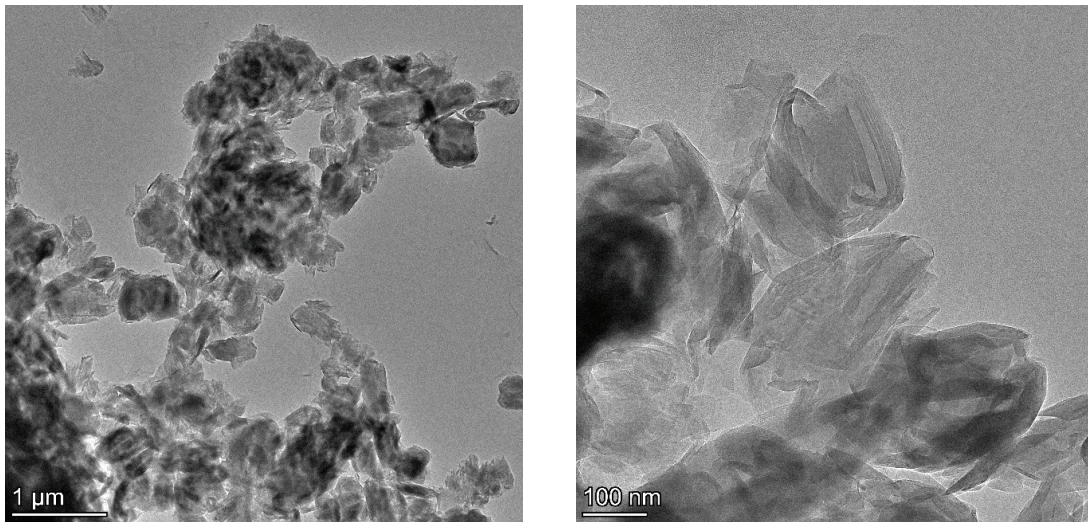
14. ábra Surmini kaolin minták DTG-görbéi
 A: kezeletlen, B: DMSO-val kezelt, C: metanollal kezelt,
 D: CTAC-val kezelt, E: etanollal mosott

3.8. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek a kezeletlen kaolinokról és az etanollal mosott (deinterkalált) mintákról készültek. A képeken észrevehető a kísérleteim hatására bekövetkezett szerkezeti átalakulás mindhárom kaolinit esetén.

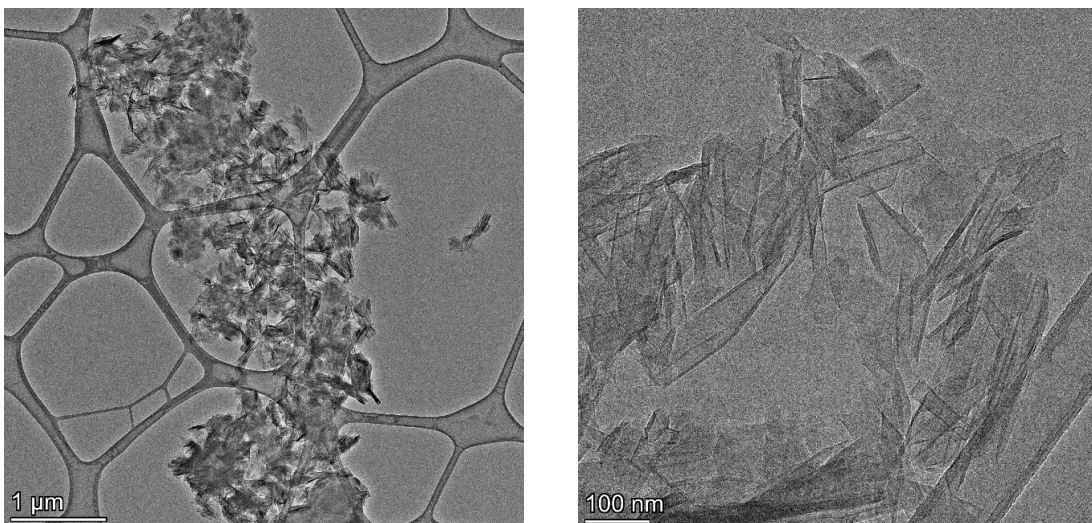
A felvételek lehetőséget adnak arra is, hogy megfigyeljem a különböző kaolinokból készült nanotekercsek közötti morfológiai eltéréseket. A nanotekercsek átlagos hosszának megállapítására mintámként 20 darabot mértem meg.

A 15. ábrán a kezeletlen szegi kaolinról készült TEM-felvételek láthatók. A kaolinit rossz kristályosodottsága miatt a kristályai nehezen azonosíthatók, viszont feltűnnek a halloysitra jellemző keskeny, gyűrött, görbült kristályok.



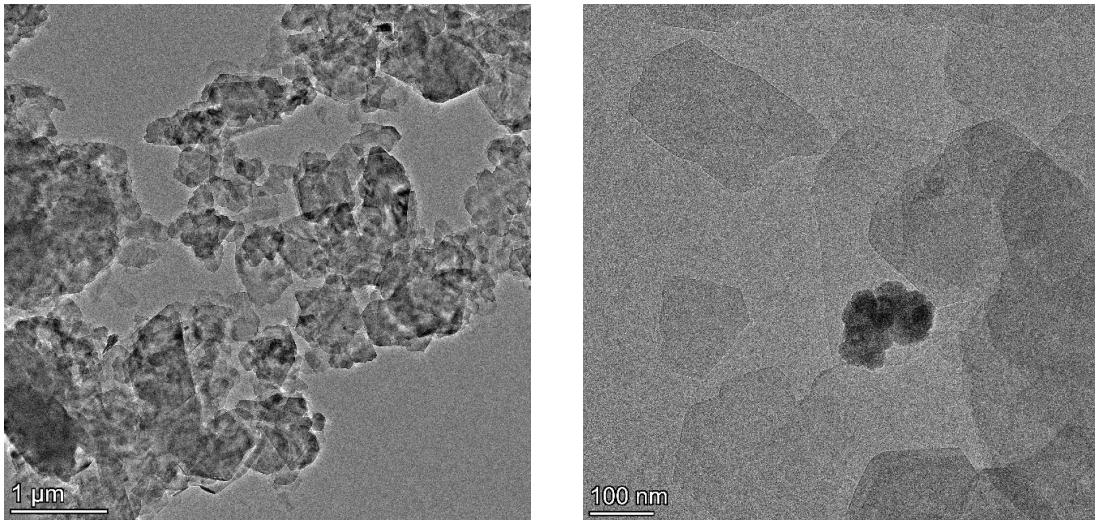
15. ábra Kezeletlen szegi kaolin TEM-felvételei

A 16. ábrán a szegi kaolinról a deinterkalációt követően készült TEM-felvételek láthatók. A kezelés hatására jelentős morfológiai változás történt. Sok nanotekercs keletkezett, melyek láthatóan töredezték vagy görbültek. A tekercsek rendezetlenül állnak, csak elvétve alkotnak kötegeket. A tekercsek átlagos hossza 190 nm.



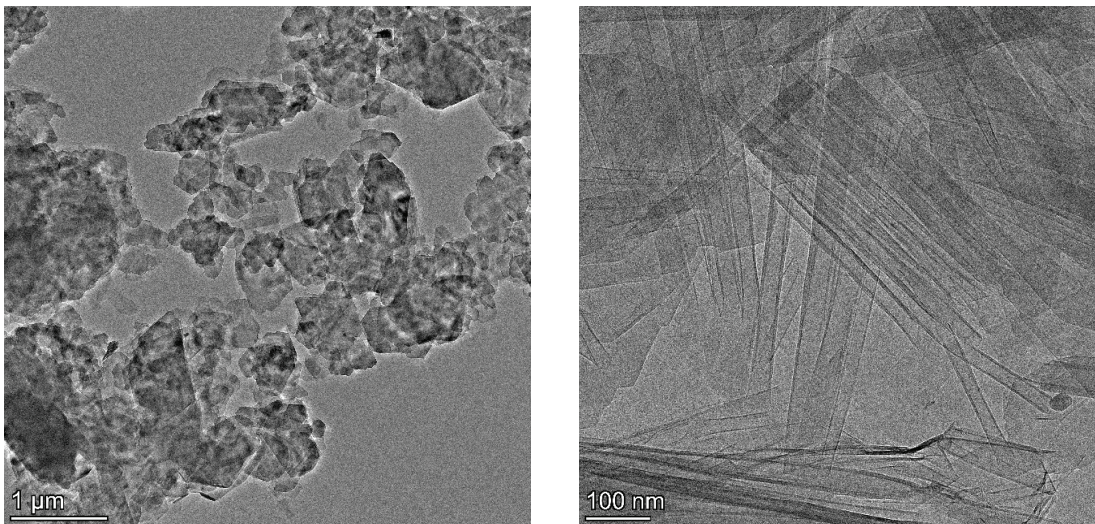
16. ábra Deinterkalált szegi kaolin TEM-felvételei

A 17. ábrán a kezeletlen zettlitzai kaolinról készült TEM-felvételek láthatók. A szegi kaolinnal összehasonlítva a kaolinit pikkelyszerű, álhatszögös kristályai jól kivehetők, de a kristályok szélei majdnem minden esetben töredeztettek, csipkézettek.



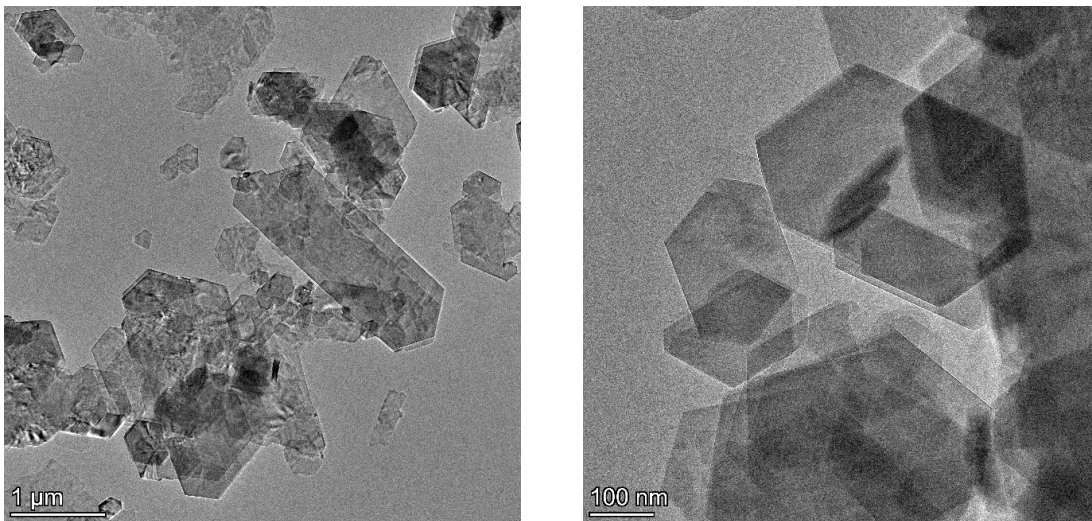
17. ábra Kezeletlen zettlitzai kaolin TEM-felvételei

A 18. ábrán a zettlitzai kaolinról a deinterkalációt követően készült TEM-felvételek láthatók. Az eljárás hatására a kaolinit kristályok jelentős szerkezeti változáson mentek keresztül. A keletkezett nanotekercsek hasonlóan a szegi kaolinhoz jelentős mennyiségben láthatók. Előfordulnak törött tekercsek és csak részlegesen feltekeredettek is. A tekercsek kötegeket alkotnak. A tekercsek átlagos hossza 484 nm. A kötegek közel azonos darabszámú tekercsből állnak. Az egy kötegben lévő tekercsek paraméterei közel azonosak.



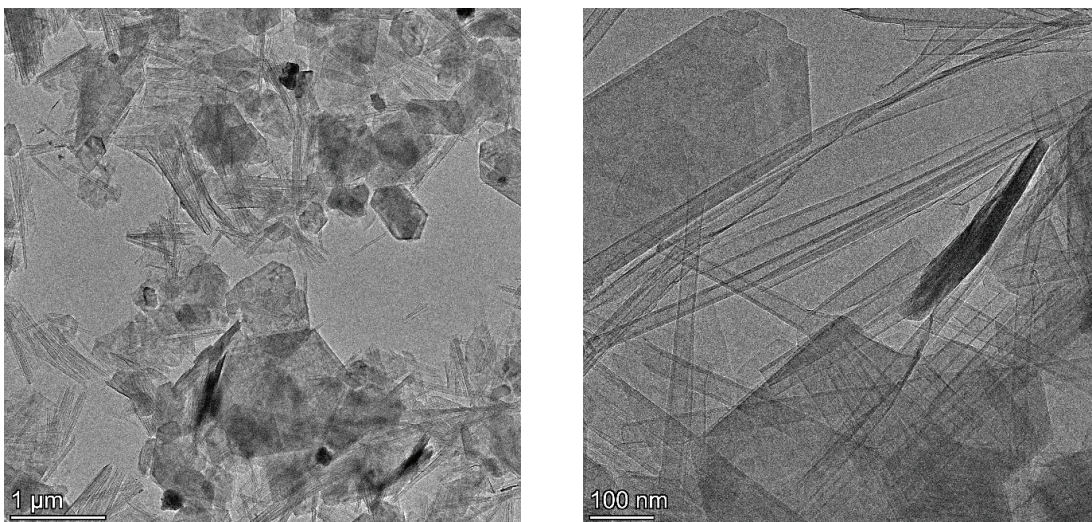
18. ábra Deinterkalált zettlitzai kaolin TEM-felvételei

A 19. ábrán a kezeletlen surmini kaolinról készült TEM-felvételek láthatók. A kaolinit pikkelyszerű, álhatszöges kristályai jól kivehetők. A kaolinit nagy kristályosodottsági foka abban jelenik meg, hogy a kristályok szélei élesek és egyenesek, kevés helyen található töredezett vagy csipkézett szélű kristály.



19. ábra Kezeletlen surmini kaolin TEM-felvételei

A 20. ábrán a surmini kaolinról a deinterkalációt követően készült TEM-felvételek láthatók. A kezelések hatására a lemezes kaolinit kristályok jelentős része feltekeredett. A keletkezett nanotekercsek nagy arányban vannak jelen az át nem alakult lemezes kaolinit kristályokhoz képest. A tekercsek a másik két kaolinithez viszonyítva hosszabbak, és kötegekbe rendeződtek. A tekercsek átlagos hossza 797 nm. A felvételeken az is megfigyelhető, hogy az egy kötegben lévő tekercsek paraméterei (hossz, átmérő) közel azonosak.



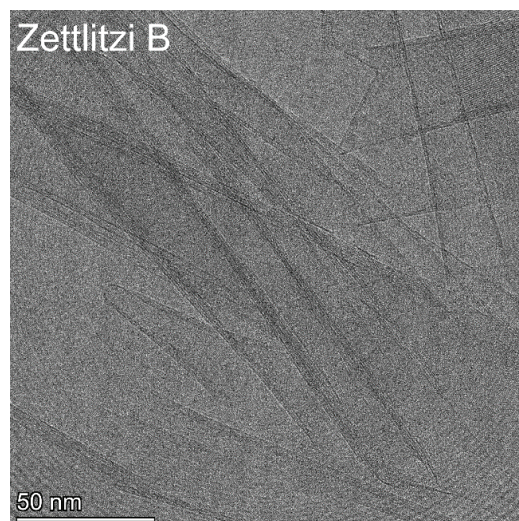
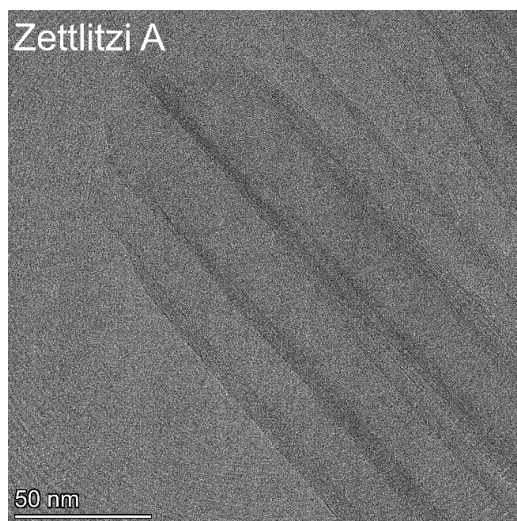
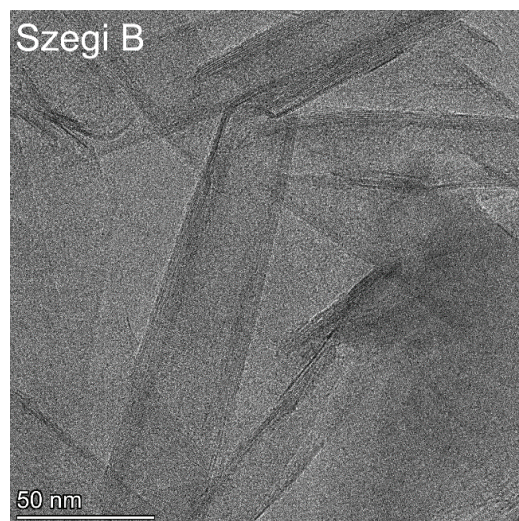
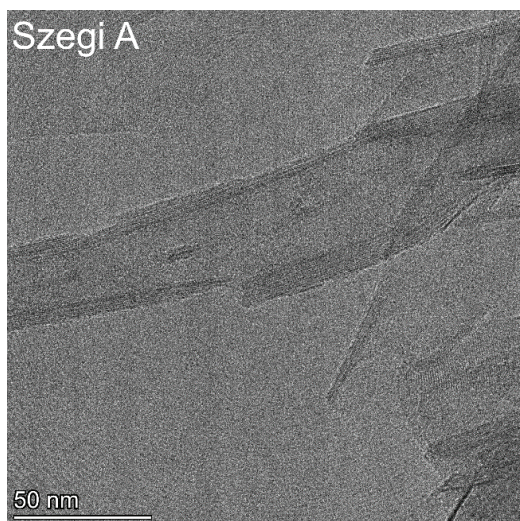
20. ábra Deinterkalált surmini kaolin TEM-felvételei

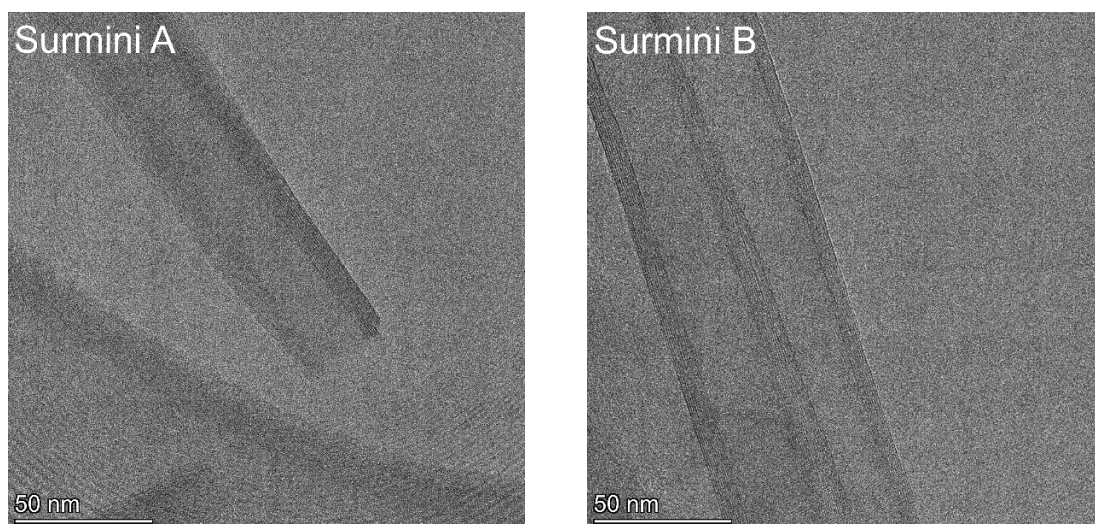
Ezek után nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópos (HRTEM) felvételeket készítettünk a mintákról (21. ábra). Ezeken megfigyelhető az egyes kaolinitekből kialakult nanotekercsek morfológiája, valamint lehetőséget adnak a nanotekercsek több paraméterének mérésére. A képeken a Velox Lite szoftverrel végeztem a méréseket, és mintánként ~20 darab nanotekercset vizsgáltam meg.

A 21. ábrán a szegi kaolinból kialakult nanotekercsek HRTEM-felvételein jól megfigyelhetők a különböző morfológiai hibák. A tekercsek átmérője és falvastagsága (a rétegek száma) is gyakran változik a tekercs hossza mentén. Ennél a kaolinnál szakadások és törések is megfigyelhetők a tekercsek falában. A tekercsek átlagos külső átmérője **30,3 nm**, belső átmérőjük **17,8 nm**, falvastagságuk **12,5 nm**, a rétegek száma a tekercsek falában átlagosan **15**.

A 21. ábrán a zettlitz kaolinból előállított nanotekercsekről készült HRTEM-képeken is láthatók kisebb szerkezetbeli hibák és eltérések a rendezettségben. A tekercsek átmérője a legtöbb esetben nem változik hosszirányban, de a tekercsek vége felé a faluk elvékonyodik. A tekercsek átlagos külső átmérője **29,0 nm**, belső átmérőjük **18,8 nm**, falvastagságuk **10,2 nm**, a rétegek száma a tekercsek falában átlagosan **12**.

A 21. ábrán a surmini kaolinból készült nanotekercsek HRTEM-felvételein látható, hogy a tekercsek átmérője nem változik a tekercs hossza mentén, és végig megtartják falvastagságukat. Ezeken a képeken jól mérhető a külső és belső átmérő, a falvastagság és a rétegek száma a tekercsek falában. A tekercsek átlagos külső átmérője **31,3 nm**, belső átmérőjük **18,7 nm**, falvastagságuk **12,6 nm**, a rétegek száma a tekercsek falában átlagosan **15**.





21. ábra A különböző kaolinokból készült nanotekercsek HRTEM-felvételei

A nanotekercsek paramétereinek mérésével kapott eredményeimet az 5. táblázatban foglaltam össze. Összehasonlítva a különböző kaolinokból előállított nanotekercsek paramétereit, megállapítható, hogy a kapott adatok közül egyedül a tekercsek hosszában van jelentős eltérés, ami a kristályosodottság csökkenésével csökken.

5. táblázat Az előállított nanotekercsek átlagos paramétereit és (tartományuk)

| Kaolin | Hossz [nm] | Külső átmérő [nm] | Belső átmérő [nm] | Falvastagság [nm] | Rétegek száma [db] |
|------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------|
| Szegi | 190 (264-107) | 30,3 (42,9-22,0) | 17,8 (24,2-13,8) | 12,5 (21,0-6,6) | 15 (25-8) |
| Zettlitzi | 484 (796-241) | 29,0 (40,6-17,9) | 18,8 (29,2-12,0) | 10,2 (18,6-3,8) | 12 (22-4) |
| Surmini | 797 (1296-537) | 31,3 (46,0-22,2) | 18,7 (30,1-13,0) | 12,6 (21,8-5,2) | 15 (27-6) |

4. Összefoglalás

A rosszul kristályosodott szegi, a közepesen kristályosodott zettlitzzi és a jól kristályosodott surmini kaolinit interkalálhatóságát, valamint a belőlük készített nanotekercsek morfológiáját vizsgáltam meg. A vizsgálatok eredményeként megállapíthatom, hogy mindhárom kaolinitet nagy interkalációfokkal tudtam átalakítani kaolinit-DMSO-, kaolinit-metanol- és kaolinit-CTAC-komplexeiké, majd a deinterkalációt követően jelentős számú nanotekercs képződött. A nanotekercsek külső és belső átmérője, falvastagsága és a rétegek száma a tekercsek falában közel azonos volt. A tekercsek hossza és rendezettsége azonban eltér, és a kristályosodottság csökkenésével csökken. Minél gyakoribbak a rácshibák a kiindulási kaolinitben, annál több törött, hajlított és részlegesen átalakult tekercs jelenik meg a termékben.

Külön-külön vizsgálva a nanotekercseket, az állapítható meg, hogy az ugyanabból a kaolinitből elkészült tekercsek paramétereiben és rendezettségében nem mutatkozik nagy különbség. A kívánt minőségű tekercsek reprodukálhatók, ami elősegíti a felhasználást.

Irodalomjegyzék

- [1] Yuan, P.; Tan, D.; Annabi-Bergaya, F.; Yan, W.: „From platy kaolinite to aluminosilicate nanoroll via one-step delamination of kaolinite: Effect of the temperature of intercalation”, *Applied Clay Science*, 83-84, 2013, 68-76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2013.08.027>
- [2] Koch, S.; Sztrókay, K. I.: *Ásványtan, II. kötet*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1989.
- [3] Singh, B.; Mackinnon, I. D. R.: „Experimental transformation of kaolinite to halloysite”, *Clays and Clay Minerals*, 44, 1996, 825–834, <https://doi.org/10.1346/CCMN.1996.0440614>
- [4] Nemezc, E.: *Agyagásványok*, Akadémiai kiadó, Budapest, 1973.
- [5] Szőkefalvy-Nagy, Z.: *Ásvány- és kőzettan*, Tankönyvkiadó Vállalat, Budapest, 1992.
- [6] Hinckley, D. N.: „Variability in "crystallinity" values among the kaolin deposits of the coastal plain of Georgia and South Carolina”, *Clays and Clay Minerals in 11th Nat. Conf.* Pergamon Press, Oxford, 1963.
- [7] Aparicio, P., Pérez-Bernal, J.L., Galán, E., Bello, M.A., Kaolin fractal dimension. Comparison with other properties, *Clay Minerals*, 39, 2004, 75-84.
- [8] Aparicio, P.; Galán, E.: „Mineralogical interference on kaolinite crystallinity index measurements,” *Clays and Clay Minerals*, 47, 1999, 12-27, <https://doi.org/10.1346/CCMN.1999.0470102>
- [9] Neumüller, O. A.: „Römp vegyészeti lexikon”, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1981.
- [10] www.chemspider.com [Online]
- [11] Bergaya, F.; Lagaly, G.: „Handbook of Clay Science,” in *Developments in Clay Science*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [12] Weiss, A.; Choy, J. H.; Meyer, H.; Becker, H. O.: „Hydrogen reorientation, a primary step of intercalation reactions into kaolinite”, in: *Proceedings of the International Clay Conference*, Bologna, Pavia, 1981, 331.
- [13] Kristóf, J.; Frost, R. L.; Klopogge, J. T.; Horváth, E.; Gábor, M.: „Thermal behaviour of kaolinite intercalated with formamide, dimethyl sulphoxide and hydrazine”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 56, 1999, 885-891, <https://doi.org/10.1023/A:1010139113778>
- [14] Makó, É.; Kovács, A.; Antal, V.; Kristóf, T.: „One-pot exfoliation of kaolinite by solvothermal cointercalation”, *Applied Clay Science*, 146, 2017, 131-139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2017.05.042>
- [15] Li, X.; Liu, Q.; Cheng, H.; Komarneni, S.: „High-yield production of mesoporous nanoscrolls from kaolinite by ultrasonic assisted exfoliation”, *Microporous and Mesoporous Materials*, 241, 2017, 66-71, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.12.006>
- [16] Zsirka, B.; Horváth, E.; Makó, É.; Kurdi, R.; Kristóf, J.: „Preparation and characterization of kaolinite nanostructures: reaction pathways, morphology and structural order”, *Clay Minerals*, 50, 2015, 329-340, <http://dx.doi.org/10.1180/claymin.2015.050.3.06>
- [17] Klug, H., P.; Alexander, L. G.: „X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials,” John Wiley & Sons, London, 1972.
- [18] Klopogge, J. T.: „Spectroscopic Methods in the Study of Kaolin Minerals and Their Modifications”, Springer, Cham, 2019.
- [19] Frost, R.L.; Fredericks, P.M.; Bartlett, J.R.: Fourier transform Raman spectroscopy of kandite clays, *Spectrochim. Acta* 49A, 1993, 667-674.

- [20] Li, Z.; Jiang, W-T.; Hong, K.: „An FTIR investigation of hexadecyltrimethylammonium intercalation into rectorite”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71, 2008, 1525-1534. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.05.015>
- [21] Wendland, W. W.: „Thermal Methods of Analysis”, Wiley & Sons, New York, 1974.
- [22] Williams, D. B.; Carter, C. B.: „Transmission Electron Microscopy”, Springer, New York, 2009.
- [23] Makó, É.; Kovács, A.; Kristóf, T.: „Influencing parameters of direct homogenization intercalation of kaolinite with urea, dimethyl sulfoxide, formamide, and N-methylformamide”, *Applied Clay Science*, 182, 2019, 105287, <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105287>
- [24] Viola, T.: „Kaolinit-metanol organokomplex szolvotermális előállítás”, Szakdolgozat, Pannon Egyetem, Veszprém, 2021.
- [25] Frost, R. L.; Horváth, E.; Makó, E.; Kristóf, J.: „Modification of low- and high-defect kaolinite surfaces: implications for kaolinite mineral processing”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 270, 2004, 337-346, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2003.10.034>
- [26] Cheng, H.; Liu, Q.; Yang, J.; Ma, S.; Frost, R., L.: „The thermal behaviour of kaolinite intercalation complexes-A review”, *Thermochimica Acta*, 545, 2012, 1-13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2012.04.005>

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vágvölgy Veronikának és Dr. Zsirka Baláznak a kutatásom során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Pekker Péternek a TEM-felvételek elkészítéséért. A TEM-vizsgálatok a Pannon Egyetem Nanolab transzmissziós elektronmikroszkópos laboratóriumában, az Éghajlatváltozás Multidiszciplináris Nemzeti Laboratórium (RRF-2.3.1-21-2022-00014) pályázat támogatásával készültek.

Végezetül szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kristófné dr. Makó Éva tanárnőnek a türelmét, a kutatásom során nyújtott segítségét és útmutatását.

