

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**IMMUNSZENZOR FEJLESZTÉSE
ÉLELMISZER- ÉS KÖRNYEZETANALITIKAI
FELHASZNÁLÁSRA**

MAJERNÉ BARANYI KRISZTINA

**Témavezető: Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra
DSc**

**Budapest
2015**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Felföldi József
Egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra
Tanácsadó, DSc
NAIK-ÉKI

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2015. év június 09-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc, BCE

Tagjai

Cserhalmi Zsuzsanna, PhD, NAIK-ÉKI

Pokol György, DSc, BMGE

Salgó András, DSc, BMGE

Simonné Sarkadi Livia, DSc, BCE

Opponensek

Halász Anna, DSc, NAIK-ÉKI

Rezessyné Szabó Judit, PhD, BCE

Titkár

Takács Krisztina, PhD, NAIK-ÉKI

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 Immunszenzorok	5
2.2 Detektálási módszerek.....	6
2.2.1 Elektrokémiai immunszenzor.....	6
2.2.1.1 Potenciometriás mérésen alapuló rendszerek.....	6
2.2.1.2 Amperometriás mérésen alapuló rendszerek.....	7
2.2.1.3 Konduktometriás mérésen alapuló rendszerek.....	7
2.2.2 Optikai immunszenzorok.....	8
2.2.2.1 Jelöléses optikai immunszenzorok.....	8
2.2.2.2 Jelölésmentes optikai technikák	9
2.2.3 Piezoelektromos immunszenzorok.....	12
2.2.3.1 Kvarckristály mikromérleg (QCM).....	12
2.2.3.2 Mikro- és nanomechanikus erőkarok (mikrokonzolok).....	13
2.3 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia technika elvi alapjai.....	13
2.3.1 OWLS működési elve.....	13
2.3.2 Hordozó jellemzése	15
2.3.3 Hordozó felületének módosítása	15
2.3.3.1 Szilanizálás.....	16
2.3.4 Biomolekulák rögzítésének lehetőségei a szenzorfelületen	17
2.4 Deoxynivalenol.....	19
2.4.1 Trichotecének	19
2.4.2 A DON-toxin jellemzése	21
2.5 DON meghatározásra alkalmas analitikai módszerek	22
2.5.1 Nagyműszeres analitikai technikák	22
2.5.2 Gyors vizsgálati módszerek.....	25
2.5.3 ELISA módszerek	26
2.5.4 Immunszenzorok	28
2.6 Vitellogenin mint biomarker a környezetanalitikában	29
2.6.1 Hormonális működésre ható vegyületek	29
2.6.2 Vitellogenin	30
2.6.3 Vitellogenin meghatározásra alkalmazott technikák.....	31
3. Célkitűzések	34
4. Anyagok és módszerek.....	35

4.1	Anyagok	35
4.2	Módszerek	36
4.2.1	OWLS mérőrendszer felépítése.....	36
4.2.2	Szenzor felületének módosítása szilanizálással.....	37
4.2.3	Biomolekulák rögzítése EDC/NHS eljárással	37
4.2.4	Biomolekulák rögzítése glutáraldehiddel	38
4.2.5	Fehérje koncentráció meghatározása Bradford-módszerrel	38
4.2.6	Tisztított lipovitellin fehérjék előállítása	38
4.2.6.1	Ponty lipovitellin előállítása.....	38
4.2.6.2	Béka lipovitellin előállítása	39
4.2.7	DON-fehérje konjugátum ellenőrzése izoelektromos fókuszálással	39
4.2.8	Lipovitellin preparátumok ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel	39
4.2.9	ELISA eljárás referencia vizsgálatokhoz	40
4.3	Mintaelőkészítés	41
4.3.1	Búzaminták előkészítése DON méréshez.....	41
4.3.2	Ponty minták előkészítése Vtg méréshez	41
4.3.3	Béka minták előkészítése Vtg méréshez	41
4.4	Alkalmazott számítástechnikai és statisztikai módszerek	41
5.	Eredmények.....	42
5.1	A szenzorválasz vizsgálata modellkísérletekkel.....	42
5.1.1	Különböző fehérjék rögzítése során kialakult rétegvastagságok vizsgálata.....	42
5.1.2	Szenzorválasz vizsgálata az analitikum molekulatömege és koncentrációja függvényében.....	43
5.1.3	Szenzorválasz reakcióideje és a mérés pontossága	45
5.1.4	Különböző méretű küveták alkalmazásának mérésre gyakorolt hatása	46
5.2	DON meghatározására alkalmas immunszenzor fejlesztése	47
5.2.1	A szenzorfejlesztéshez szükséges immunanyagok előállítása.....	47
5.2.1.1	DON konjugátum szintézise.....	47
5.2.1.2	Fehérjefrakciók ellenőrzése izoelektromos fókuszálással.....	47
5.2.1.3	DON specifikus antitestek előállítása	48
5.2.1.4	DON antigénspecifikus tisztított IgG előállítása.....	48
5.2.1.5	DON specifikus antitestek antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata.....	49
5.2.2	Immunszenzor fejlesztés DON kimutatására	50
5.2.2.1	Szenzor felületének módosítása és fehérjék immobilizációja.....	51
5.2.2.2	Direkt immunszenzor DON kimutatására	51

5.2.2.3	Kompetitív immunszenzor fejlesztése DON meghatározásra.....	52
5.2.2.3.1	Poliklonális antitest mennyiségének meghatározása	53
5.2.2.3.2	A rögzített antigén optimális koncentrációjának meghatározása.....	54
5.2.2.3.3	Áramlási sebesség hatásának vizsgálata	55
5.2.2.3.4	Inkubációs hőmérséklet hatásának vizsgálata.....	55
5.2.2.3.5	Inkubációs idő hatásának vizsgálata	56
5.2.2.3.6	DON meghatározására alkalmas immunszenzor statisztikai paraméterei ...	56
5.2.2.3.7	Valós minták mátrixhatása.....	57
5.2.2.3.8	Biológiai minták vizsgálata	58
5.3	Immunszenzor fejlesztés vitellogenin meghatározásra	59
5.3.1	A szenzorfejlesztéshez szükséges immunanyagok előállítása.....	59
5.3.1.1	Lipovitellin fehérjefrakciók ellenőrzése SDS-PAGE vizsgálattal	59
5.3.1.2	Ponty és béka lipovitellin specifikus poliklonális antitest előállítása	61
5.3.1.3	Ponty lipovitellin specifikus antitest antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata.....	61
5.3.1.4	Béka lipovitellin specifikus antitest antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata.....	62
5.3.2	Immunszenzor fejlesztése ponty vitellogenin kimutatásra	62
5.3.2.1	Direkt mérési módszer ponty vitellogenin mérésére.....	62
5.3.2.2	Kompetitív immunszenzor kifejlesztése ponty Vtg meghatározásra	64
5.3.2.2.1	Alkalmazott poliklonális antitest koncentrációjának meghatározása	64
5.3.2.2.2	A rögzített antigén koncentráció meghatározása	65
5.3.2.2.3	Az áramlási sebesség hatása	66
5.3.2.2.4	Az inkubáció hatása a mérésre.....	66
5.3.2.2.5	Dinamikus méréstartomány meghatározása	67
5.3.2.2.6	Ponty lipovitellin antitest szubsztrát-specifitása.....	68
5.3.2.2.7	A ponty minták mátrixhatása, Vtg meghatározása biológiai mintákból.....	69
5.3.3	Immunszenzor fejlesztése béka vitellogenin kimutatásra	71
5.3.3.1	Szenzorfelület módosítása, fehérjék immobilizálása	71
5.3.3.2	Direkt mérési módszer béka vitellogenin mérésére	71
5.3.3.3	Kompetitív immunszenzor kifejlesztése béka vitellogenin meghatározáshoz.....	72
5.3.3.3.1	Alkalmazott poliklonális antitest koncentrációjának meghatározása	72
5.3.3.3.2	A rögzített antigén optimális koncentrációjának meghatározása.....	73
5.3.3.3.3	Béka lipovitellin antitest szubsztrátspecifitása	74
5.3.3.3.4	Biológiai minták mátrixhatása	74

5.3.3.3.5	Biológiai minták vizsgálata	75
6.	Új tudományos eredmények.....	77
7.	Következtetések, javaslatok	78
8.	Összefoglalás.....	80
9.	Summary	83
10.	Irodalomjegyzék	86
11.	Köszönetnyilvánítás	102

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

API	atmoszférikus nyomású ionizáció - atmospheric pressure ionization
APTS	amino-propil-trietoxi-szilán - (3-Aminopropyl)-triethoxysilane
BSA	marhaszérum albumin – bovine serum albumin
CMD	karboxi-metil-dextrán - carboxymethyl-dextran
DAS	diacetoxi-szcirpenol - diacetoxyscirpenol
DON	deoxynivalenol - deoxynivalenol
ECD	elektronbefogási detektor- electron capture detector
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid - 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDCs	endokrin zavaró hatású vegyület - endocrine disrupting chemical
ELISA	enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat - enzyme-linked immunosorbent assay
EN-MOS	elektromos orr- fémoxid félvezető - electronic nose-metal oxide semi-conductor sensors
ESI	elektrospray ionizáció - electrospray ionization
FD	fluoreszcens detektor - fluorescence detector
FDA	amerikai Élelmiszer és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság - Food and Drug Administration
FIA	átfolyó injektálós analitika - flow injection analysis
FID	lángionizációs detektor - flame ionization detector
FI-IA	átfolyó befecskendezéses immunkötődéses vizsgálat - flow-injection immunoassay
FITC	fluoreszcein izotiocianát - fluorescein isothiocyanate
FP	fluoreszcens polarizáció - fluorescence polarization
GC	gázkromatográfia – gas chromatography
GOPS	γ -glicidoxi-propil-trimetoxi-szilánnal - γ -glycidoxypropyl trimethoxy silane
GOx	glükózoxidáz – glucose oxidase
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia - high-performance liquid chromatography
HPLC-QTOF-MS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia- kvadrupól repülési idő hibrid tömegspektrometria - high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry
IACs	immunaffinitás oszlopok - immunoaffinity columns
IgG	immunoglobulin - immunoglobulin
ISFET	ion érzékeny tervezérlésű tranzisztor - ion-sensitive field-effect transistor
ITO	indium ón-oxid - indium tin oxide
LC-MS	folyadékkromatográfia-tömegspektroszkópia - liquid chromatography-mass spectrometry
LFD	síkáramlású teszt – lateral flow device
LOD	kimutatási határ – limit of detection
Lpv	lipovitellin - lipovitellin
MIP	molekuláris lenyomatú polimerek - molecularly imprinted polymer
MIPPy	molekuláris lenyomatú polipirrol - molecularly imprinted polymer polypyrrole
MS	tömegspektrometria – mass spectrometry
MZI	Mach-Zender interferométer - Mach-Zehnder interferometer

NEO	neosolanid - neosolaniol
NHS	N-hidroxi-szukcinimid - N-hydroxysuccinimide
NIV	nivalenol - nivalenol
OVA	ovalbumin - ovalbumin
OWLS	optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia – optical waveguide lightmode spectroscopy
PEEK	poliéter-éter-keton - polyether ether ketone
QCM	kvarckristály mikromérleg - quartz crystal microbalance
RfS	reflexiós interferencia spektroszkópia - reflectometric interference spectroscopy
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz-láncreakció - reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPE	szilárd fázisú extrakció - solid-phase extraction
SPR	felületi plazmon rezonancia – surface plasmon resonance
T-2 toxin	T-2 toxin – T-2 toxin
TIRE	teljes belső visszaverődéses ellipszometria - total internal reflection ellipsometry
TIRF	teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia - total internal reflection fluorescence
TLC	vékonyréteg kromatográfia – thin layer chromatography
TOPAS	cikloolefin kopolimer - cyclic olefin copolymer
TRIS	2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Vtg	vitellogenin - vitellogenin

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az élelmiszeriparban a fogyasztók által támasztott egyre magasabb igényekkel párhuzamosan növekednek az élelmiszerbiztonsági és minőségi követelmények. A globalizáció és az élelmiszerek szabad kereskedelme miatt elengedhetetlen a biztonságos élelmiszer előállítás feltételeinek megteremtése. A szennyező anyagok kimutatása, a kockázatbecslés és kockázatelemzés ma nélkülözhetetlen eleme az élelmiszerbiztonsági előírásoknak az emberek egészségének megóvása érdekében. A gyártók számára ezért elengedhetetlen az élelmiszer-előállítás teljes folyamatát végigkísérő (a nyersanyagtól a késztermék fogyasztó elé való kerüléséig) folyamatos, gyors ellenőrzés. A gabonák mikotoxin szennyezettsége világszerte fontos humán- és állategészségügyi kockázatot jelent. Magyarországon a fusárium penészgombák által termelt toxinszennyezés a leggyakoribb, ezen belül elsősorban a deoxynivalenol szennyezettség jelent problémát. A globális felmelegedésnek, illetve az iparszerű mezőgazdasági termelési gyakorlatnak köszönhetően a gabonák fuzáriumos kiegészése hatalmas gazdasági veszteséget okoz, és egyben a szennyezett gabonák takarmányként történő felhasználásával az állattenyésztési hozamban jelentős visszaesést eredményez, míg a szennyezett gabonából készített élelmiszer közvetlen humán egészségkárosító hatását.

Az ipar gyors fejlődésével, az iparszerű mezőgazdaság és állattenyésztési gyakorlat alkalmazásával egyre növekszik a különböző vegyszerek, gyógyszerek, növényvédőszer alkalmazása, ami nem csak élelmiszerbiztonsági kérdéseket vet fel, de komoly környezetvédelmi problémát is jelent. Az utóbbi évtizedben kerültek a figyelem középpontjába a hormonrendszerre ható anyagok (endokrin zavaró hatású anyagok, EDCs), melyek súlyos hormonháztartási zavarokat idézhetnek elő, elsősorban szaporodási problémákat okozva. Jelenlétükre különösen a vízi élőlények érzékenyek. Az esetek jelentős részében növényvédőszereket, műanyagokat és humángyógyszereket találtak felelősnek e hatás kialakulásáért.

Ahhoz, hogy ezen anyagokra irányuló kockázatbecslést és értékelést el tudjuk végezni, olyan analitikai módszerek szükségesek, amelyek alkalmasak gyorsan, olcsón, nagy érzékenységgel és szelektivitással meghatározni ezen anyagok jelenlétét és koncentrációját. A hagyományos analitikai módszerek sok esetben nem alkalmazhatók a minőségbiztosítási rendszerek kiépítésénél, mint például a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), gázkromatográfia (GC), tömegspektrometria (MS), HPLC-MS, GC-MS, hiszen drágák, lassúak, jól képzett szakembereket és sok esetben bonyolult minta előkészítést igényelnek. Az elmúlt három évtizedben előtérbe kerültek a hagyományos analitikai módszerek mellett a sorozatvizsgálatokra alkalmas, gyors, nagy érzékenységgel automatizálható módszerek fejlesztése. E módszerek közül kiemelkedő a bioszenzor fejlesztésekben elért eredmények. Áttörő

eredményeket elsősorban a klinikai, környezetvédelmi analitikában és a biotechnológiai folyamatok nyomon követésében érték el, de számos élelmiszeriparban alkalmazható szenzor is született. Ma a szenzorkutatás elsősorban az immunszenzor fejlesztések irányába indult meg.

Munkámmal 2007-ben kapcsolódtam be a KÉKI, majd 2014. január 1-től a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetének optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) alapú bioszenzor kutatási témáiba. Az intézetben a 2000-es évek elején indult el az OWLS technika alkalmazási lehetőségeinek kutatása, melynek eredménye számos új mérési módszer kidolgozása volt (Székács *et al.*, 2003, Trummer *et al.*, 2001, Levkovets *et al.*, 2004, Adányi *et al.*, 2007). A GVOP-3.1.1-2004-05-0429/3.0 „Immuneszt és immunszenzor kidolgozása endokrin zavaró hatások biomarker fehérjéjének kimutatására” című pályázat, illetve a GVOP-3.1.1.-2004-05-0283/3.0 „Élelmiszerbiztonság a bor termékpályán” című pályázat keretén belül elsősorban élelmiszer és környezeti minták vizsgálatára alkalmas különböző OWLS alapú immunszenzorok kifejlesztése volt a cél. A disszertáció egyik felében deoxynivalenol (DON) kimutatására alkalmas OWLS alapú immunszenzor fejlesztés eredményeit mutatom be. A kialakított szenzorral búzaliszt minták vizsgálatát végeztem el. A dolgozat második felében vitellogenin (Vtg), mint hormonrendszer zavaró környezetszennyezők kimutatására alkalmas biomarker meghatározására kifejlesztett immunszenzorral történő mérések eredményeit foglalom össze.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Immunszenzorok

Immunszenzorok a bioszenzorok azon speciális csoportja, ahol a rögzítendő, specifikus biológiailag érzékeny anyagként antitestet vagy antigént alkalmaznak. A szenzor működése alapvetően két folyamatból áll: a receptor felületén végbemenő specifikus antigén-antitest kötődés kialakulásából, melyet molekuláris felismerő folyamatnak is nevezünk, majd ezt követi a jelátalakító folyamat, mely a specifikus kötés kialakulása közben bekövetkezett változásokat (elektrokémiai, optikai, mágneses, piezoelektromos stb.) detektálja és azt mérhető, feldolgozható és tárolható elektromos jellé alakítja (Ruan *et al.*, 2002).

Az immunszenzorokat az immunreakció során kialakult komplex detektálására alkalmazott módszer szerint csoportosíthatjuk (Patel, 2002). Megkülönböztethetünk jelöléses, illetve jelölésmentes immunszenzort. A jelölésre akkor van szükség, ha az antigén-antitest komplex kialakulása nem jár könnyen detektálható termékkel, ezért mesterséges jelölőt, például radioaktív izotópot, enzimet, fluoreszcens vagy kemilumineszcens molekulát, mágneses nanorészecskéket alkalmaznak. A leggyakrabban használt enzimjelöléses eljárásokban elsősorban torma peroxidázt, glükóz oxidázt, β -galaktozidázt vagy alkalikus foszfátáz jelzőenzimet használnak. A jelöléses immunszenzor esetén kétféle mérési módszer, a szendvics illetve a kompetitív módszer alkalmazható. A szendvics eljárás során az antigénnel specifikusan reagáló ellenanyag-molekulákat kötünk a szenzor felületére. Az ily módon rögzített ellenanyag specifikusan köti az antigént, és ezért az antigén komplex mintából izolálható és kimutatható. Az ellenanyag-antigén kötődés az antigénnel specifikusan reagálni képes jelzett ellenanyaggal mutatható ki. A keletkezett jel az analitikum koncentrációjával arányosan növekszik. A kompetitív módszer során a mérendő antigént tartalmazó mintához a vizsgált antigénnel azonos, de jelölt antigénmolekulákat adunk, melyek a mérendő antigénmolekulákkal versenyeznek az antitest kötőhelyeiért. A jelzett antigén kötődését a nem jelzett antigént tartalmazó ismeretlen minta gátolja. A gátlás mértéke a gátló anyag koncentrációjával arányos, de nagymértékben függ az ellenanyag és az antigén között kialakult kötés erősségétől, az ellenanyag affinitásától is. A módszer igen kis mennyiségű ellenanyag és antigén kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas (Pokol *et al.*, 2011). A jelöléses immunszenzor esetén a jelölő alkalmazása drágábbá és bonyolulttá teszi a rendszert. Az utóbbi időben ezért a kutatás egyre inkább a jelölésmentes technikák fejlesztése felé irányult, ahol az immunreakciót nem további kémiai, biokémiai reakciók segítségével detektáljuk, hanem a folyamat során bekövetkező fizikai változásokat jelölésmentesen mérjük igen érzékeny mérési technikák alkalmazásával (Bange *et al.*, 2005). Jelölésmentes technikánál is kétféle, direkt és

indirekt mérési módszert különböztethetünk meg. Direkt módszernél a szenzor felületén közvetlenül az antitestet rögzítjük és vizsgáljuk a minta által adott jel nagyságát. A technika előnye az egyszerűség, ugyanakkor kis molekulák esetén az érzékenység sok esetben nem megfelelő. A kompetitív immunszenzornál az antigének, vagy kis molekulák esetén a fehérjével képzett konjugátuma kerül rögzítésre. A mérések során a mintákat meghatározott mennyiségű antitestet tartalmazó szérummal keverjük össze, inkubáljuk, majd injektáljuk a rendszerbe. Csak a szabadon maradt antitestek kötődnek a felszínre, így a jelintenzitás fordítottan arányos a vizsgált anyag koncentrációjával.

2.2 Detektálási módszerek

Míg a bioszenzor szelektivitását és specificitását elsősorban a rögzített biológiailag érzékeny anyag határozza meg, addig az érzékenységet az alkalmazott érzékelő-jelátalakító rendszer befolyásolja (Leca-Bouvier *et al.*, 2005). Az immunszenzorokban az érzékelés alapját egy részről a célmolekula és a felismerő elem között létrejövő specifikus reakció képezi. A felismerés alapja, hogy a célmolekula és a felismerő elem között létrejövő kapcsolat fizikai-kémiai változást okoz a rendszerben, mely változás azután egy alkalmas jelátalakító segítségével detektálható és mérhető. Az alkalmazott detektorok szerint megkülönböztethetünk elektrokémiai-optikai-, piezoelektromos immunszenzorokat.

2.2.1 Elektrokémiai immunszenzor

Az elektrokémiai immunszenzorok az antigén-ellenanyag kötődést követően az alkalmazott jelölő vegyület és az elektroaktív szubsztrát kémiai reakciója során bekövetkező változásokat követi nyomon. Vizsgálhatja a rendszerben kialakuló potenciálkülönbséget (potenciometria), a rajta átfolyó áramot (amperometria), illetve a rendszer vezetőképességének változását (konduktometria) is.

2.2.1.1 Potenciometriás mérésen alapuló rendszerek

A potenciometriás detektorok a referencia, illetve az indikátor elektród közti potenciálkülönbséget mérik. A mérés során a referenciaelektród potenciálja állandó, míg az indikátor elektród potenciálja függ a mérni kívánt anyag koncentrációjától. Napjaink egyik legígéretesebb potenciometriás immunszenzora az ion érzékeny térvezérlésű tranzisztor (ISFET) alapú immunszenzor, ahol az antitestet az ionszelektív elektród felszínét borító membránon rögzítik, és az antigén-antitest komplex képződése során bekövetkező változásokat regisztrálja a jelátalakító. Starodub és mtsai (2000) simazin gyomirtó kimutatására alkalmas ISFET-alapú

immunszenzort fejlesztettek ki, ahol az ISFET felületére simazin elleni poliklonális antitestet rögzítettek *Staphylococcus* eredetű protein-A segítségével. A vizsgálatban kétféle mérési módszert alkalmaztak. Kompetitív módot, ahol a natív és peroxidázzal jelölt simazin molekulák versengtek az ISFET felületére kötött antitestek kötőhelyeiért, valamint a szekvenciális telítés technikát (sequential saturation of antibodies). A megkötődött peroxidáz aktivitását aszkorbinsav és hidrogén-peroxid jelenlétében mérték. Kompetitív rendszer esetén a simazin kimutatási határa 1,25 ng/ml, a lineáris tartomány 5-175 ng/ml volt, míg szekvenciális telítés technikát alkalmazva az érzékenység jóval nagyobb volt, 0,65 ng/ml kimutatási határral és 1,25-185 ng/ml lineáris tartománnyal. Az IFSET immunszenzorként való alkalmazásának jelentősége a miniaturizálásban és többcsatornás rendszer kialakításának lehetőségében rejlik.

2.2.1.2 Amperometriás mérésen alapuló rendszerek

Az amperometriás rendszerek működése az elektroaktív ionok oxidációján vagy redukcióján alapszik. A mérés során a munkaelektrod potenciálja állandó, és azt vizsgálják, hogy az analitikum koncentrációjának hatására hogyan változik az átfolyó áram erőssége. A vizsgált anyag koncentrációja és az áramerősség között egyenes arányosság áll fenn. Az amperometriás szenzorok gyorsak, ugyanakkor szelektivitás terén a rendszerben jelen lévő elektroaktív anyagok redox potenciálja a meghatározó, így a mért áram a mintában lévő több anyag együttes jeléből tevődik össze. Gyors, egyszerű, olcsó alkalmazhatóságának köszönhetően a legelterjedtebb detektálási mód a bioszenzorok körében. Micheli és mtsai (2005) tejből aflatoxin M₁ kimutatására alkalmas amperometriás immunszenzort fejlesztettek ki, ahol a monoklonális antitestet közvetlen az elektród felszínén (szitanyomott-elektrod) rögzítették, kompetitív mérési módszert alkalmazva, enzim jelölőként pedig tormaperoxidázt használtak. A rendszer kimutatási határa 25 pg/ml, lineáris tartománya 30-160 pg/ml volt. A rendszer nagy előnye, hogy a vizsgálat a tej centrifugálásán kívül semmilyen egyéb mintaelőkészítési eljárást nem igényel. Badea és mtsai (2004) szintén tej aflatoxin M₁ tartalmának kimutatására fejlesztettek ki egy átfolyó injektációs immunoassay-en (FI-IA) alapuló amperometriás immunszenzort. Az automatizált rendszer egyesítette az átfolyó injektációs vizsgálatra jellemző gyorsaságot és reprodukálhatóságot az immunkémiai reakciókra jellemző érzékenységgel és szelektivitással.

2.2.1.3 Konduktometriás mérésen alapuló rendszerek

Konduktometriás mérésen alapuló detektálási módszert használják legkevésbé a bioszenzorok körében, habár olcsó és egyszerű. Csak olyan rendszernél alkalmazható, ahol a reakciók során ionok képződnek vagy a rendszer ionokat fogyaszt, megváltoztatva az oldat vezetőképességét. Ezt a folyamatot mérik a vezetőképesség időbeni változásának

nyomonkövetésével. A módszer hátránya, hogy a vezetőképességet a rendszerben jelen lévő összes ion vezetőképessége adja, ezért nem specifikus. Aflatoxin B₁ kimutatására alkalmas konduktometrián alapuló immunszenzort fejlesztett ki Liu és mtsai (2006), ahol tormaperoxidázt és aflatoxin B₁ specifikus antitesteket rögzítettek arany nanorészecskékkal funkcionizált mikroelektrodokon. A rendszer kimutatási határa 0,1 ng/ml aflatoxin B₁ volt.

2.2.2 Optikai immunszenzorok

Napjainkban az immunszenzor kutatásban az optikai jelátalakítók használata vette át a vezető szerepet, mert miniatürizálhatóak, olcsók, nagy érzékenyséű műszerek. Az optikai immunszenzorral történő detektálás alapját az adja, hogy az immunkomplex kialakulása során UV-VIS abszorpció, biolumineszcencia/kemilumineszcencia, fluoreszcencia/foszforeszcencia, visszaverődés, szóródás vagy refraktív indexbeli változás történik. Az optikai immunszenzorokon belül megkülönböztethetünk jelölt, illetve jelölésmentes immunszenzorokat. Az alábbiakban csak a legfontosabb optikai szenzorokat mutatom be röviden.

2.2.2.1 Jelöléses optikai immunszenzorok

A jelölt immunszenzorok az antigén - antitest kötődés detektálására egy nagy érzékenységgel meghatározható jelölő molekulát tartalmaznak. Jelölőként használhatók enzimek (pl.: peroxidáz, luciferáz), fluorofórok (pl.: FITC), fluoreszcens nanokristályok (quantum dots) stb.

➤ Fluoreszcencia alapú rendszerek

A fluoreszcencia olyan jelenség, amelynek során bizonyos molekulák adott energiájú fényt nyelnek el. Ennek a folyamatnak a következtében magasabb energiájú állapotba kerülnek, majd bizonyos idő alatt visszaállnak nyugalmi helyzetükbe, de közben a felvett energia egy részét leadják fénykibocsátás formájában. Az energia egy része a folyamat során elveszik, a kibocsátott fény kisebb energiájú, vagyis nagyobb hullámhosszú lesz, mint a gerjesztő fény. A fluoreszcencia alapú immunszenzorok fluoreszcens molekulákat alkalmaznak az antigén-antitest kötődés vizsgálatához, melyek vagy közvetlenül kötődnek a célmolekulához, vagy a mérés során, mint indirekt jelölő vesznek részt. Spektrométerrel a fluoreszcencia intenzitása mérhető, így az antigén-antitest reakció által indukált fluoreszcencia intenzitás változás vizsgálatából a célmolekula mennyisége számítható (Schobel *et al.*, 2000).

Maragos és mtsai (1999) aflatoxin és fuminozin meghatározására alkalmas fluoreszcens immunszenzort hozott létre, ahol az antitesteket optikai szálon rögzítették. Az aflatoxin meghatározás nem igényelt külön jelölést, hisz természetes fluoreszcens tulajdonsággal rendelkezik, míg a fuminozin B₁-et fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelölték. Standard

fuminozin B₁ oldatokat alkalmazva a kimutatási határ 10 ng/ml volt, míg kukoricából egyszerű metanolos extrakciót követve 3,2 µg/g, ha az extrahált mintát további affinitás kromatográfiás tisztításnak vetették alá, akkor 0,4 µg/g kimutatási határt értek el. Aflatoxin B₁ esetében a kimutatási határ 2 ng/ml volt.

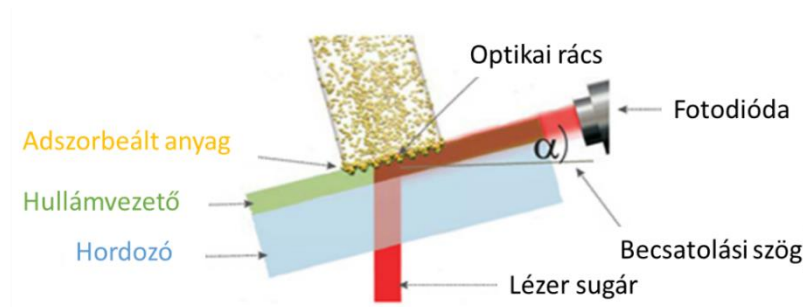
A fluoreszcens immunszenzorok közt a teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia (TIRF) szenzorok igen ígéretesek. A TIRF a fénynek azt a különleges tulajdonságát használja fel, hogy amikor a fény egy törőfelületre egy kritikusanál nagyobb szögben érkezik (63° üveg/víz határfelületnél), teljes visszaverődést szenved, így a fény közvetlenül nem hatol be a törőfelszín alá, azonban a törőfelszínt jelentő üveg-víz határvonalon mégis átjut egy evaneszcens hullámnak nevezett elektromágneses hullám. Az evaneszcens hullám a visszaverődő fény hullámhosszától és beesési szögétől függően 50–200 nm mélységben képes behatolni a mintába és gerjeszteni az ott lévő fluorofórokat. A technika alkalmas akár egy molekula valós idejű vizsgálatára (Engström *et al.*, 2006). Barzen és mtsai (2002) egy TIRF alapú, hordozható optikai immunszenzort fejlesztettek ki, felszíni vizek minőségének monitorozására (RIANA-river analyser). A rendszer előnye, hogy egy mintából egyszerre háromféle szennyező anyag kimutatására alkalmas és automatizált. A TIRF technika alapjait és bioszenzorként való széleskörű felhasználását számos tudományos cikk ismerteti (Mallat *et al.*, 2001, Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004, Tschmelak *et al.*, 2006, Tschmelak *et al.*, 2005).

2.2.2.2 Jelölésmentes optikai technikák

A jelölésmentes immunszenzoroknál az antigén–antitest komplex kialakulása következtében létrejövő fizikai változások közvetlenül vizsgálhatók (Zhang, 2008).

➤ Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS)

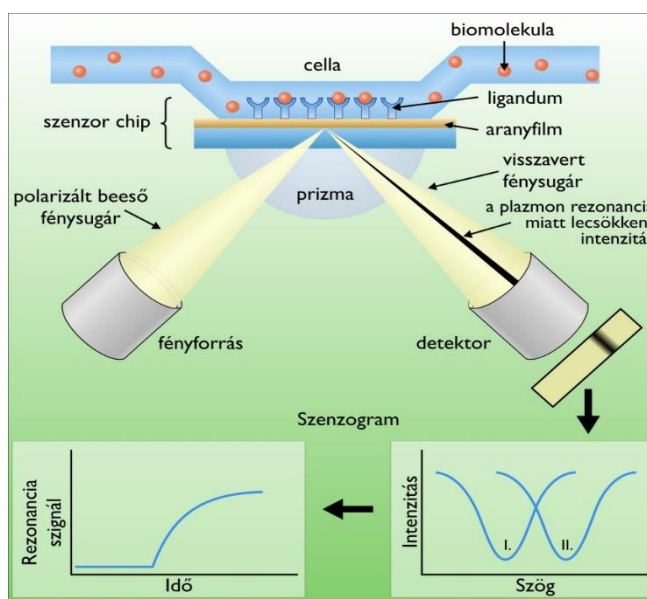
Az integrált optikai hullámvezető szenzor alapját a chip adja, amely egy kb. 0,5 mm vastagságú üveglemezre felvitt, 200 nm vastagságú, nagy törésmutatójú szilícium-dioxid – titán-dioxid (SiO₂-TiO₂) rétegből áll, amelyben finom optikai rácsot (2400 vonal/mm) alakítanak ki. Ezen optikai rács segítségével történik a méréshez használt lineárisan polarizált He-Ne lézer fény becsatolása a hullámvezető rétegbe. Az optikai hullámvezető felületén végbemenő változások (pl. adszorpció, deszorpció stb.) a határréteg optikai tulajdonságait módosítja, ami a hullámvezető vékonyréteg effektív törésmutatójának megváltozását eredményezi. Az effektív törésmutató megváltozása a becsatolási szög (rezonanciaszög) változásához vezet. A rezonanciaszögeket mérve (módusspektrum) a kérdéses közeg törésmutatója, vastagsága, anyag egységnyi felületre eső tömege számítható (Thiefenthaler, 1989) (1. ábra). Az OWLS szenzorok működésének elve bővebben a 2.3.1. fejezetben olvasható.



1. ábra: Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia működési elve
(www.exasol.hu)

➤ Felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópia

A felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópia a teljes visszaverődésen alapuló speciális spektroszkópai módszer. A technika azon a jelenségen alapul, hogy ha a teljes visszaverődés egy optikai elem (szigetelő) és egy vékony (10 nm, a behatolási mélységnél lényegesen kisebb) fémes vezetőrétet határára következik be, akkor a fémbe az evanescens hullámok az elektronok oszcillációját idézik elő. Egy speciális szög alatt a hullám fémbe való „elnyelődésének” maximuma van, ilyenkor a visszavert fény intenzitása minimális. Ennek a „völgypontnak” a szögfüggése meghatározható, síkban poláros fény alkalmazásával akár 10^{-5} fok érzékenységgel. A fém felületén rögzített biomolekulákhoz (pl.: antitest, antigén, DNS, RNS) való bekötődés megváltoztatja a felülettel közvetlenül érintkező réteg törésmutatóját, ami az SPR szög értékét kismértékben eltolja. Az analitikai és kinetikai információt a rezonanciaszög időbeli változásának nyomonkövetése szolgáltatja (Gyurcsányi, 2005) (2. ábra).



2. ábra: Felületi plazmon rezonancia mérési elve (Hegyi *et al.*, 2013)

Az SPR technikát a bioanalitikában az 1980-as évek elején Liedberg és mtsai (1983, 1995) alkalmazták először, immunglobulint adszorbeáltatva az ezüstréteget hordozó szenzorra, majd az immunglobulin ellen termeltetett antitest kötődését vizsgálták. Tüdös és mtsai (2003) búzából deoxynivalenol (DON) kimutatására alkalmas, SPR spektroszkópia alapú immunszenzort fejlesztettek ki. Kompetitív mérési módszert alkalmaztak, ahol kazein-DON konjugátum került rögzítésre. A mérés lineáris tartománya 2,5-30 ng/ml volt. A szenzor több mint ötszáz alkalommal volt újrahasználatos jelentősebb aktivitásvesztés nélkül, 6 M-os guanidin-kloriddal történő regenerálással. Mullett és mtsai (1998) fuminozin B₁ kimutatására alkalmas SPR alapú direkt immunszenzort fejlesztettek ki 50 ng/ml kimutatási határral. A technika alkalmas volt a toxin egyszerű, gyors (10 perc/minta) kimutatására.

➤ ***Reflexiós interferencia spektroszkópia (RIFS)***

Reflexiós interferencia spektroszkópia technika a fehér fénynek az eltérő törésmutatójú rétegek határfelületéről történő többszörös visszaverődésén alapszik. Általában egy vékony üveghordozón tipikusan 330 nm vastagságú magasabb törésmutatójú réteget alakítanak ki (interference layer), melyet, ha halogén lámpából származó fehér fénnel világítunk meg, a fény minden fázishatárnál részben visszaverődik. A visszaverődött sugarak interferálnak. Az interferencia függ a két határfelület közti távolságtól és a hullámhossztól. Ha a szenzor felületére molekulák kötődnek, akkor növekszik a rétegvastagság, ugyanakkor a két határfelület közötti távolság is, ami az interferenciaspektrum nagyobb hullámhossz felé történő eltolódását okozza. Az interferencia spektrum folyamatos felvétele diódákkal történik, mely spektrumból számítható az optikai denzitásban bekövetkezett változás az idő függvényében (Schmitt *et al.*, 1997). A mérés során meghatározható, vizsgálati módszertől függően, a vizsgált anyag koncentrációja, valamint termodinamikai és kinetikus állandók. Az SPR-rel szemben, itt szenzorfelületként nem csak fémes felületek alkalmazhatók, hanem SiO₂ (szilícium-dioxid), ITO (indium ón-oxid), TiO₂ (titán-dioxid), még műanyag, úgynevezett TOPAS (cikloolefin kopolimer) felületek is (Pröll *et al.*, 2005).

➤ ***Ellipszometria***

Az ellipszometria működésének lényege, hogy eltérő határfelületeken a különböző polarizációjú (beesési síkkal párhuzamos vagy arra merőleges rezgési síkú) fény visszaverődése során a térerővektor amplitúdója és fázisa is megváltozik. Ez a változás eltér a beesési síkkal párhuzamosan és arra merőlegesen polarizált komponensekre, amelyek között fáziskülönbség lép fel. A fáziskülönbség függ a felületen lévő réteg vastagságától és törésmutatójától (Garipcan *et al.*, 2011).

Napjainkban az egyik leggyakrabban használt ellipszometriás immunszenzor a teljes belső visszaverődéses ellipszometria (TIRE). Nabok és mtsai (2011) aflatoxin B₁ kimutatására alkalmas TIRE- immunszenzort fejlesztettek ki mintegy 0,04 ng/ml-es kimutatási határral. T-2 mikotoxin (insariotoxin) kimutatására szintén sikeresen alakítottak ki immunszenzort, mellyel jóval alacsonyabb kimutatási határt tudtak elérni, mint QCM (kvarckristály mikromérleg) vagy SPR alkalmazásával (Nabok *et al.*, 2005, Nabok *et al.*, 2007).

➤ **Interferometria**

Az interferométerek működési elve, hogy a rendszerébe jutó fényt két egymástól független útvonalon juttatja el a detektorig, ahol azokat interferáltatva a két nyaláb (mérő és referencia ágak) fáziskülönbségéről kapunk információt. Interferometria alapú, jelölésmentes bioérzékelésre alkalmas eszközök közül a legismertebbek a Mach-Zender interferométer (MZI) alapú eljárások. A műszer működésének alapja, hogy a mérő ágakban haladó fény a mintán halad át, miközben a referenciaágban haladóhoz képest fáziseltolódást szenved. Amennyiben az oldat optikai sűrűsége változik, a detektált interferencia intenzitás is ezzel arányosan módosul (Sepúlveda *et al.*, 2006). MZI technika immunszenzorként való alkalmazhatóságát számos kutatócsoport bizonyította (Lechuga *et al.*, 1995, Schipper *et al.*, 1997, Heideman *et al.*, 1993).

2.2.3 Piezoelektromos immunszenzorok

2.2.3.1 Kvarckristály mikromérleg (QCM)

A kvarckristály mikromérleg (QCM) egy rendkívül érzékeny, piezoelektromos effektus alapján működő tömegmérő rendszer. A kvarckristály érzékelő, mely mindkét oldalán arannyal bevont, váltóárammal magas frekvenciájú rezgésbe hozható. A kristály oszcillációs frekvenciáját a felületre rakódó anyagok megváltoztatják, és ezt a frekvenciaváltozást detektáljuk. Ha molekulák kötődnek a kvarckristály felületére, akkor növekszik a tömege és a rezonancia frekvenciája csökken. A mérések során már 0,1 ng/cm²-nél kisebb tömegváltozásnak megfelelő frekvenciaváltozás is mérhető (Sauerbrey, 1959, Tuantranont *et al.*, 2011). A QCM technika olcsó, használata egyszerű, nagy érzékenységgű és valósídejű, jelölésmentes vizsgálatra alkalmas ezért az immunszenzor fejlesztésben igen elterjedt technika.

A legújabb kutatások az úgynevezett mágneses QCM (magnetic QCM) technikák felé irányulnak, ahol mágneses nanorészecskék felhasználásával a kimutatási határ csökkenthető. Wang és mtsai (2009) aflatoxin B₁ kimutatására készített immunszenzorukban a szenzor felületén aflatoxin B₁ ellen termelt antitestekkel funkcionalizált mágneses nanorészecskéket rögzítettek. Az így kialakított szenzor lineáris mérési tartománya 0,3-7 ng/ml közt volt. Az immunérzékenyített mágneses részecskéket az érzékelő felület alatt elhelyezett elektromágnes vonzza, illetve rögzíti a

szenzorfelszínhez (Bruls *et al.*, 2009). Li és mtsai (2011) H5N1 influenza vírus kimutatására fejlesztettek ki QCM alapú immunszenzort, ahol a szenzor felületére poliklonális antitestet rögzítettek. A mintában lévő H5N1 vírus antitesthez való kötődése frekvenciaváltozást idéz elő a szenzoron, mely jelet tovább erősítettek H5N1 ellen termelt antitestekkel borított 30 nm-es mágneses nanogyöngyök hozzáadásával.

2.2.3.2 Mikro- és nanomechanikus erőkarok (mikrokonzolk)

A mikrokonzol szenzorok a mechanikus erőkarok megfelelő kémiai érzékenyítéssel kialakított változatai. A mikrokonzolk tipikusan 0,2-1 μm vastag, 20-100 μm széles és 100-500 μm hosszú rugalmas lapkák, amelynek egyik vége egy szilárd tartóhoz van rögzítve. A mérés során a mikrokonzol elhajlásának mértéke, vagy a rezonanciafrekvencia változása detektálható. Ennek alapján megkülönböztethetünk statikus és dinamikus mikrokonzol szenzorokat. A mikrokonzol elhajlását a lapka végére irányított lézersugár visszaverődésén keresztül detektálható. Dinamikus üzemmódban a mikrokonzolk mikromechanikai oszcillátorokként működnek és a mikrokonzol tömegváltozása a rezonanciafrekvencia változásán keresztül határozható meg. Ha a felülethez molekulák kötődnek az megváltoztatja a mikrokonzol tömegét és ez a tömegváltozás valós időben nyomonkövethető a rezonanciafrekvencia változásán keresztül (Gyurcsányi, 2005). Mivel a mikrokonzolk könnyen tömbbe rendezhetők, velük nagyszámú párhuzamos mérés végezhető. Campbell és mtsai (2007) *Staphylococcus aureus* által termelt enterotoxin B kimutatására mechanikus erőkar alapú szenzort alkalmaztak. A konzol aminocsoportokkal módosított felszínére rögzítették az enterotoxin B ellen termelt poliklonális antitestet, majd a toxint tartalmazó mintát 1 ml/perc sebességgel áramoltatták a szenzor felületén. A kialakított szenzor mérési tartománya 12,5 pg/ml és 50 pg/ml közt volt.

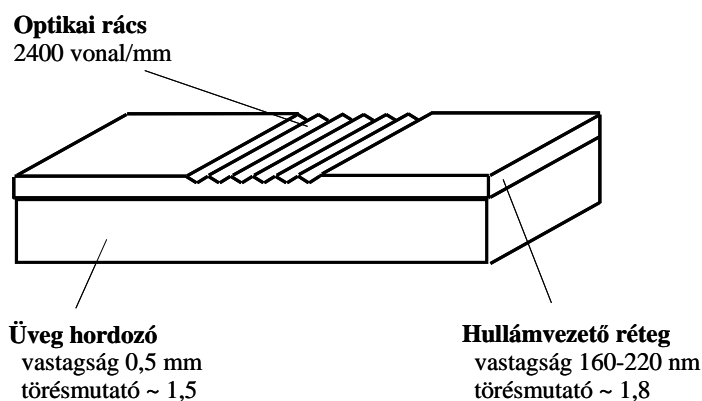
2.3 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia technika elvi alapjai

Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia technika az 1980-as évek végén alakult ki a többi felületi adszorpciós eljáráshoz hasonlóan. Az OWLS technika alkalmas az optikai hullámvezető felületén, molekuláris szinten végbemenő, affinitáson alapuló folyamatok valósídejű, jelölésmentes vizsgálatára.

2.3.1 OWLS működési elve

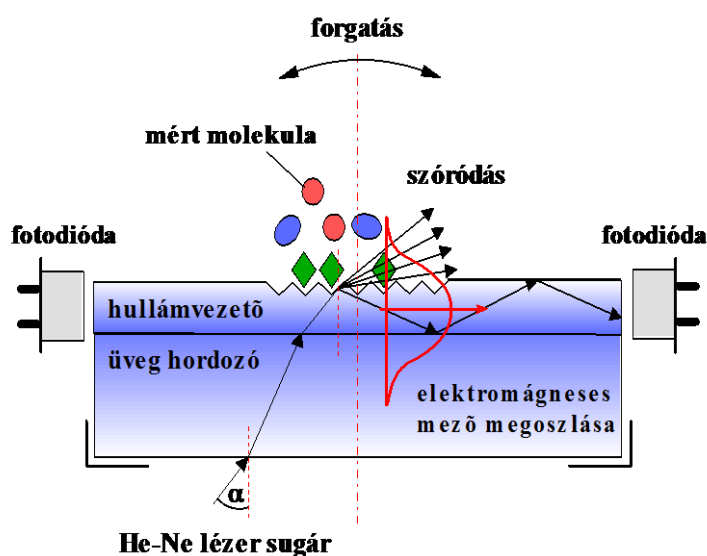
Az optikai hullámvezetés jelenségét felhasználó technika alkalmazásának alapja egy integrált optikai hullámvezető szenzor, röviden chip, amely két eltérő törésmutatójú rétegből áll: egy 0,5 mm vastag kisebb törésmutatójú üveghordozóból ($n=1,57$) és az erre felvitt vékony (160-

220 nm) nagy törésmutatójú hullámvezető rétegből ($n=1,7\pm0,3$). Ezen a hullámvezető rétegen finom optikai rácsot (2400-3600 vonal/mm sűrűségű) alakítanak ki, aminek segítségével lehet a lineárisan polarizált He-Ne (632,8 nm) lézer fényt a hullámvezető rétegbe becsatolni. Az integrált optikai hullámvezető szenzor szerkezetét a 3. ábra mutatja be.



3. ábra Integrált optikai hullámvezető szenzor felépítése (OW2400, MikroVákuum Kft.)

A becsatolás egy pontosan definiált beesési szögnél lejátszódó rezonancia jelenség, amely függ a hullámvezető, valamint a hullámvezető felületén lévő anyag törésmutatójától. A becsatolt fény a hullámvezetőben teljes visszaverődések sorozatával terjed, és a hullámvezető végén elhelyezett fotodiódákkal detektálható (4. ábra).



4. ábra Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia működési elve

A becsatolási szögek ismeretében, a négyrétegű hullámvezető linearizált módusegyenlete segítségével (amikor a felületen adszorbeált réteg is jelen van), a hullámvezetőre abszorbeálódott anyag törésmutatója (n_A) és rétegvastagsága (d_A) kiszámítható. E két paraméter ismeretében a Feijter képlet (De Feijter *et al.*, 1978) felhasználásával pedig az egységnyi felületre abszorbeálódott tömeget (M) kaphatjuk meg.

$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc}$$

A dn/dc a felületre abszorbeálódott anyag törésmutatójának koncentrációtól való függésére jellemző, és értéke fehérjék többségére univerzális és állandó ($0,182 \text{ cm}^3/\text{g}$) (Vörös *et al.*, 2002).

2.3.2 Hordozó jellemzése

A hullámvezető réteg egy speciális üvegréteg melynek törésmutatója nagyobb ($n=1,6-2,2$) az üveghordozóénál ($n=1,5$) és rétegvastagsága ($160-220 \text{ nm}$) kis ingadozást ($5-10\%$) mutat. A hullámvezető hordozójaként általában bórszilikát üveget alkalmaznak, melynek magas a BaO (bárium-oxid) és Al_2O_3 (alumínium-oxid) tartalma, alkálimentes, szintetikus anyag.

A hullámvezető anyaga $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ 75%-25% arányú keverékből áll, de a TiO_2 mennyiség akár a 40%-ot is elérheti. A szerves $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ hordozóként történő alkalmazása számos előnyt jelent a szerves hordozókkal szemben, elsősorban fizikai tulajdonságai alapján. A szerves hordozók nagyobb mechanikai ellenállóképessége, hőstabilitása, szerves oldószerekkel, ill. mikrobákkal szembeni ellenállóképessége, egyszerűbb regenerálhatósága, hosszú élettartama alkalmasabbá teszi az ipari felhasználásra. A szenzor felületén szilanol (SiOH) ill. titanol csoportok találhatók, melynek mennyisége a $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ arányától, illetve a hullámvezető réteg kialakításánál használt hőmérséklettől függ. Minél nagyobb a TiO_2 aránya annál jobban nedvesíthető a felület. Minél magasabb a hullámvezető réteg kialakításánál használt hőmérséklet annál hidrofóbbá válik a felület, annál nehezebb a rehidratáció. Weetall és Filbert (1974) kísérlete alapján egy SiO_2 felületen $5,3 \text{ db SiOH csoport}/\mu\text{m}^2$ volt található, mely $400 \text{ }^\circ\text{C}$ -os kezelést követően $2,6 \text{ db SiOH csoport}/\mu\text{m}^2$ -re csökkent, $850 \text{ }^\circ\text{C}$ -os kezelést követően pedig kevesebb, mint $1 \text{ db SiOH csoport}/\mu\text{m}^2$ -re csökkent.

2.3.3 Hordozó felületének módosítása

A hullámvezető felülete hidrofób, erősen dehidratált, a rajta lévő $-\text{OH}$ csoportok kevés lehetőséget biztosítanak a biomolekulák kovalens rögzítésére, ezért a szenzor felületét módosítani kell. A felületmódosításra leggyakrabban alkalmazott eljárás a szilanizálás. Az eljárás célja, hogy könnyebben tudjunk kialakítani a hordozó és a biomolekula között kovalens kötést. E mellett a

szilanizálás csökkenti a nem specifikus adszorpciót, ellenállóbbá teszi a felületet a külső hatásokkal szemben, pl.: a lúgokkal szembeni érzékenység csökken.

A szilanizálási folyamat megkezdése előtt a hordozót meg kell tisztítani minden szennyeződéstől. A felülettisztítás lehet igen egyszerű vagy többlépcsős bonyolult fizikai (hőkezelés, ultrahang vagy O₂ plazma kezelés), vagy kémiai (savak és lúgok) eljárás. A legegyszerűbb módszer a hőkezelés, mely során a hordozót nagyon magas hőmérsékletre hevítik, így távolítva el az esetleges szerves szennyeződéseket. Általában a fent említett módszerek kombinációját alkalmazzák (Cras *et al.*, 1999). A tisztítás és hidratálás történhet 5%-os salétromsav oldatban való 45 perces forralással, majd ezt követően desztillált vizes mosással, illetve 80-90°C-os salétromsavban történő (0,75-4 óra) melegítéssel (Williamson *et al.*, 1989, Weetal, 1993, Williams és Blanch, 1994). A felület tisztítható lúgokkal és detergenssekkel (Deconex) is (Clerc és Lukosz, 1997).

2.3.3.1 Szilanizálás

A fém-oxid felületek módosítására használt szilánok általános képlete: R_n Si X_(4-n), ahol az R egy olyan nem hidrolizálható funkciós csoport, amely a rögzítendő molekulával közvetlenül, vagy keresztkötő vegyületek segítségével közvetetten tud kapcsolódni. Az X egy hidrolizálható csoport, amely lehet alkoxi-, amino- vagy klorocsoport. Az X csoport vesz részt a szilán és a hordozó között kialakuló sziloxán kötésben. A leggyakrabban alkalmazott alkoxicsoporthoz a metoxi- és etoxi- csoportok, melyek a kötés kialakulásakor melléktermékként metanolt és etanolt képeznek. A kloroszilánok alkalmazásánál melléktermékként sósav keletkezik, ezért felhasználásuk jóval szűkebb körű. A kötési folyamat négy lépésben játszódik le:

- Először megtörténik az X csoport hidrolízise, melynek során reaktív szilanol csoport keletkezik. A hidrolízishez szükséges víz számos forrásból származhat. Lehet hozzáadott víz, de a felületen jelenlevő víz is betöltheti e szerepet, vagy az atmoszférából, illetőleg a felhasznált oldószerből is származhat.
- Ezt követően a szilánmolekulák oligomerekké kapcsolódnak.
- A harmadik lépésben az oligomerek a hordozó hidroxil csoportjához hidrogénkötésekkel kapcsolódnak.
- Végül pedig egy szárítási folyamat következik, melynek során vízkilépés kíséretében kialakul a hordozó és a szilán közt a kovalens kötés.

A felületmódosításhoz alkalmazott szilán típusát elsősorban a biológiailag aktív molekula szerkezete, illetve az alkalmazott rögzítési módszer alapján határozzuk meg. A fentiekből is

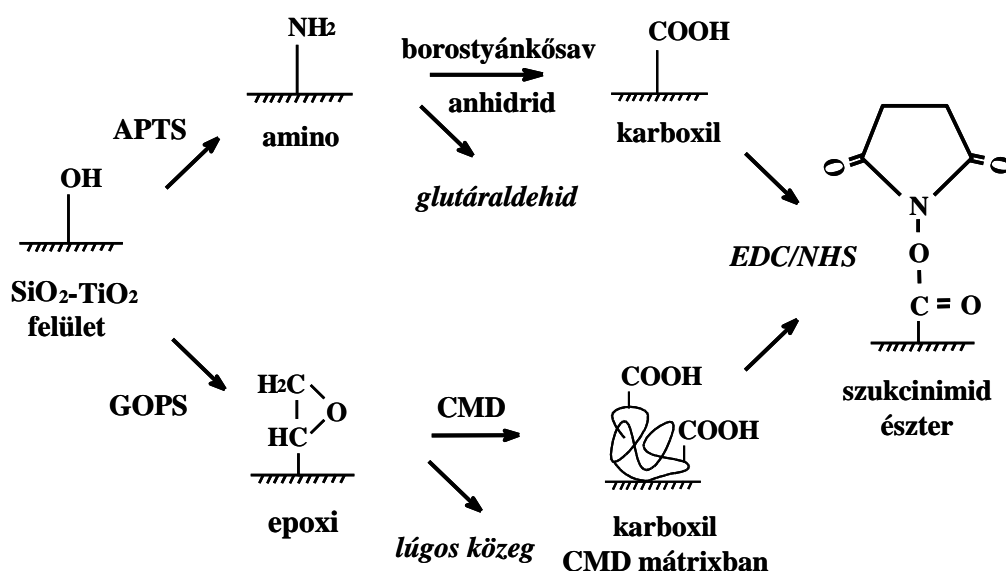
látszik, hogy a kötés tulajdonságait nagymértékben befolyásolja, hogy az adott szilánmolekula hány hidrolizálható csoportot tartalmaz. Leggyakrabban három hidrolizálható csoportot tartalmazó szilánmolekulákat szoktak alkalmazni. E szilánmolekulák a hidrolizálható csoportok hidrolízise révén, többszörösen összekapcsolódnak, és egy háromdimenziós erősen keresztkötött hálózatot hoznak létre, így kapcsolódva a hordozóhoz, multimolekuláris réteget alkotva (Wang *et al.*, 1994). A trifunkciós szilánok merev felületet, de maximális hidrolitikus stabilitást biztosítanak. A bifunkciós szilánokkal kevésbé rigid felület hozható létre, mint a trifunkciós szilánok alkalmazásával. Az egy funkciós csoportot tartalmazó szilánok monomolekuláris réteget képeznek, erősen hidrofób felületet adnak és hidrolitikus stabilitásuk kicsi.

A kialakított szilánréteg vastagságát az alkalmazott szilán típusa határozza meg, azonban az oldószer, az oldat koncentrációja és víztartalma, de az alkalmazott hőmérséklet és időtartam is befolyásolja (Bier és Schmid, 1994, Spinke *et al.*, 1997).

A szilánvegyület oldásához használt oldószert tekintve a szilanizálás vizes és szerves fázisban történhet. Vizes fázisban történő szilanizálás esetén a kezelni kívánt anyagot a szilán vizes oldatában áztatják. Ezzel az eljárással vékony, egyenletes szilánréteg hozható létre, habár kevesebb funkciós csoport alakítható ki, mint szerves szilanizálással, ugyanakkor a kapott hordozó sokkal stabilabb. Szerves szilanizálásnál a szilánt illékony, illetve kevésbé illékony oldószerben oldják. Illékony oldószer alkalmazásánál a felületen a szilánoldatot kíméletesen bepárolják, az oldószert alacsony hőmérsékleten elpárologtatják. Kevésbé illékony oldószert alkalmazva a hordozót az oldatba történő bemerítéssel szilanizálják. Így vastagabb nagyobb kapacitású szilánréteget lehet kialakítani, bár a réteg felületen történő eloszlása nem teljesen egyenletes.

2.3.4 Biomolekulák rögzítésének lehetőségei a szenzorfelületen

A biomolekulák számos reaktív csoporttal rendelkeznek, melyek alkalmasak kovalenskötés kialakítására. Ezek közül leggyakrabban az amino-, szulfhidril-, karboxil- és aromás csoportokat használjuk. A biomolekulák hullámvezetőn történő kovalens rögzítéséhez a szenzor felületét a rögzítést megelőzően egy vagy több lépésben aktiválni kell, azaz rajta olyan reaktív funkciós csoportokat kell kialakítani, amelyekhez a fehérjék már közvetlenül, egy lépésben köthetők. A szilanizálással módosított szenzor felületén történő biomolekulák rögzítésének különböző lehetőségeit az 5. ábra mutatja be.



5. ábra Biomolekulák rögzítésének lehetőségei a szenzorfelületen (Adányi, 2014)

Az APTS-sel módosított szenzorfelületen a biomolekulák rögzítése történhet rövid bifunkciós keresztkötő vegyületekkel (glutáraldehid), vagy más egyéb reaktív csoportok kialakítására alkalmas vegyületekkel (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (EDC) és N-hidroxi-szukcinimid (NHS)) (Hunt *et al.*, 2010). A glutáraldehid egy olyan kis bifunkciós molekula, amely a molekula két végén található aldehidcsoporttal két aminocsoport összekapcsolására alkalmas. A keresztkötő vegyület a hordozó aminocsoportjait és a fehérje aminocsoportjait hídként kapcsolja össze.

A másik lehetőség, hogy az APTS reagenssel kezelt szenzorfelületek aminocsoportjait borostyánkősavanhidrides kezeléssel karboxilcsoportokká alakítjuk, melyhez EDC/NHS technikával a biomolekulák a hordozóhoz rögzíthetők. Az EDC egy amino- és karboxilcsoportok összekapcsolására alkalmas karbodiimid, mely az aktiválás során az NHS karboxilcsoportához való kötődését teszi lehetővé. Az NHS kötődésével a fehérjék aminocsoportjai számára könnyen támadható szukcinimid észter alakul ki, ami a rögzítés során lehasad a hordozóról és a fehérje közvetlen a karboxilcsoportához kapcsolódik.

A γ -glicidoxi-propil-trimetoxi-szilánnal (GOPS) kezelt, epoxicsoportokat tartalmazó felületek nem igényelnek külön aktiválást, rajtuk a fehérjék lúgos közegben közvetlenül rögzíthetők, vagy karboxi-metil-dextránt (CMD) rögzítve a szenzoron, a kialakított dextránmátrixban az EDC/NHS eljárással rögzíthetők a biomolekulák.

2.4 Deoxynivalenol

Az élelmiszerek mikotoxin szennyezettsége az egész világon súlyos élelmiszerbiztonsági problémát jelent. Európában elsősorban a *Fusarium* penészgombák által okozott fertőzések jelentik a fő veszélyt. A gombák jelenléte az élelmiszerek, illetve élelmiszer-nyersanyagok minőségét hátrányosan befolyásolja, hiszen jelentős szerepük van az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságainak romlásában, tápértékének csökkenésében és az általuk termelt mikotoxinok egészségkárosító hatásában. A deoxynivalenol (DON) a takarmánynövényekben, gabonákban az egyik leggyakrabban előforduló mikotoxin. Ahhoz, hogy az élelmiszerek DON tartalmát meghatározzuk megbízható, olcsó, gyors, egyszerű analitikai módszerek szükségesek. Az eddigi hagyományos mérési módszerek HPLC, GC-MS megbízhatóak, de igen költséges és bonyolult eljárások, ezért szükséges olyan technikák kidolgozása, amelyek lehetővé teszik a DON gyors kimutatását, ugyanakkor megfelelően szelektívek és érzékenyek.

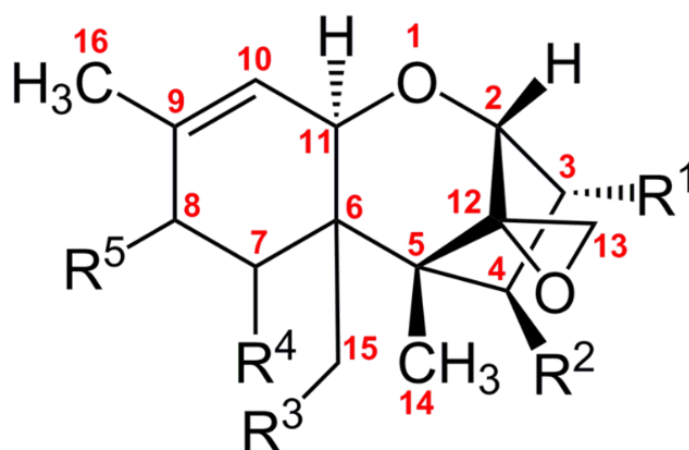
2.4.1 Trichotecének

A mikotoxinok szekunder metabolitok, amiket leggyakrabban penészgombák termelnek. Ezek a vegyületek nem szükségesek a gomba növekedéséhez vagy szaporodásához, de az állatokra és emberekre nézve igen veszélyes, mérgező anyagok. Egy gombafaj akár többféle mikotoxint is termelhet, ugyanakkor egy adott toxint többféle gomba fertőzésére is utalhat. Eddig több mint háromszáz különböző mikotoxint fedeztek fel, ismertek meg, de a természetben a számuk valószínű ennél jóval nagyobb. Számos jelentés szerint évente a learatott gabonák, iparnövények kb. 25-50%-a fertőzött mikotoxinokkal (Ricciardi *et al.*, 2013). Az elmúlt évtizedekben a fuzáriumos csőpenészedés jelentette a legsúlyosabb, penészek által okozott megbetegedést a kukoricatermesztésben, mely az egész világon hatalmas gazdasági veszteséget okoz (Osborne és Stein, 2007). A Kárpát-medencében elsősorban a *Fusarium graminearum* által okozott fertőzések kerültek előtérbe, amely a klímaváltozás hatásainak és az ipari mezőgazdasági gyakorlat következményeinek tudható be.

A mikotoxinok legnagyobb csoportját a trichotecének alkotják, melyeket elsősorban *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium* és egyéb szaprofita gombák termelnek. A trichotecének kémiaiilag szeszkviterpén vázú vegyületek. Ez több mint 50 kémiaiilag rokon vegyületet jelent. Minden, a trichotecénvázaz fusariotoxinok csoportjába tartozó, természetben előforduló mikotoxin tartalmaz egy 15 szénatomból álló lánchoz kapcsolódó epoxid gyűrűt, egy telítetlen kötést a 9. és a 10. szénatom között és egy epoxi gyököt a 12. és a 13. szénatomnál. Ez utóbbi alapján nevezik ezeket a vegyületeket 12,13-epoxitrichotecéneknek (ApSimon *et al.*, 1990). A trichotecénvázaz mikotoxinok toxicitásának kémiai alapját a 12,13-epoxid gyűrű, és azon hidroxil

és acetyl oldalláncok adják, melyek ehhez a gyűrűhöz kötődnek. Számos e csoportba tartozó mikotoxin kettős kötést is tartalmaz a 9. és 10. szénatomja között, amely nagymértékben befolyásolja az adott mikotoxin toxicitását. Előfordulnak olyan *Fusarium* fajok is, amelyek egy adott mikotoxin acetylált, illetve nem-acetylált formáját is képesek termelni, ami szintén toxicitást befolyásoló tényező.

A trichotecének kémiai struktúrájuk alapján „A”, „B”, „C” és „D” alcsoportba sorolhatók (Ueno, 1977). Az „A”, „B”, „C” típusú trichotecének a 8. szénatomon lévő funkciós csoportok alapján különböztethetők meg. Az „A” trichotecének a 8. szénatomon hidroxilcsoportot tartalmaznak, mint pl. a neoszolaniol esetén, vagy észter kötést, mint a T-2 toxin esetén. Az „A” trichotecének domináns termelője a *F. sporotrichoides* és az esetlegesen toxintermelő *F. poae*. A négy csoport közül ez a legnagyobb, amely magában foglalja a T-2 toxinokat, és a HT-2 toxinokat, illetve a diacetoxi-szcirpenolt (DAS) és a neoszolaniolt (NEO). A „B” csoport tagjai (DON, Nivalenol, Fusareon-X) a 8. szénatomon ketocsoportot tartalmaznak. A „B” csoport esetében a két domináns toxintermelő gombafaj a *F. culmorum* és a *F. graminearum*. A *F. graminearum* esetében a fajon belül két típust különítenek el, amelyek közül az egyik DON-t, a másik pedig nivalenolt (NIV) termel (Perkowski *et al.*, 1997). A „C” csoport szerkezete abban különbözik az előző csoportoktól, hogy a 7., 8. szénatomokhoz egy második epoxid gyűrű is kapcsolódik, a „D” csoport trichotecénjei pedig a 4. és a 15. szénatom között kettős észterkötéssel kapcsolva egy makrociklusos gyűrűt tartalmaznak. A leggyakrabban előforduló B trichotecéneket, mint a deoxynivalenol, nivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, valamint a fusarenon X-et mutatja be a 6. ábra.



6. ábra A „B” trichotecének szerkezete

(Deoxynivalenol – $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{O=}$; Nivalenol - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{O=}$; 3-acetyl-deoxynivalenol - $R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{O=}$; 15-acetyl-deoxynivalenol - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OAc}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{O=}$; Fusarenon X - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OAc}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{O=}$)

2.4.2 A DON-toxin jellemzése

A trichotecén mikotoxinok közül a mérsékelt égövi országokban -irodalmi adatok alapján- leggyakrabban a DON mikotoxin szennyezettség fordul elő (Scott, 1989; Placinta *et al.*, 1999; WHO/FAO, 2000). A DON-t, más néven vomitoxint, de ismert dehidro-nivalenolként vagy RD-toxinként is, először Japánban az 1970-es években izolálták és jellemezték *Fusarium* gombával fertőzött árpából. DON mikotoxin fertőzöttség általában a búza, árpa, zab, rozs és kukoricára jellemző. Rizsben, cirokban és tritikáléban ritkábban található meg. A vomitoxin jelenlétét leginkább a *Fusarium graminearum* (*Gibberella zae*) és a *Fusarium culmorum* gombák jelenlétével kapcsolják össze (Sobrova *et al.*, 2010). A *Fusarium* gomba fertőzés következtében kiég a búza felső része, a *Gibberella* esetében pedig elkezd rothadni a kukorica kalásza. Kimutatták, hogy közvetlen kapcsolat van a kalász fuzáriumos kiégése és a vomitoxin mért szintje között. A *Fusarium graminearum* legjobban 25 °C-on és 0,88-os vízaktivitási szint fölött szaporodik el. A *Fusarium culmorum* legjobban 21 °C-os környezetben 0,87-os vízaktivitás fölött fejti ki hatását. A két faj földrajzi elterjedését leginkább a hőmérséklet határozza meg. A *F. graminearum* a gyakrabban előforduló faj, ami főként a melegebb égtájakon található meg (Canady *et al.*, 2001).

Az élelmiszerek mikotoxin szennyezettsége az egész világon súlyos élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. A DON toxicitása más gabonákban és a takarmányban előforduló trichotecén mikotoxinokkal összehasonlítva enyhének mondható, csak néhány esetben jelentettek súlyos akut mérgezést. Mivel a DON az egyik leggyakrabban előforduló mikotoxin, ezért élelmiszerbiztonsági szempontból kiemelkedő fontosságú. Ember és állategészségügyi kockázatot a DON-nal fertőzött élelmiszer illetve takarmány elfogyasztása jelenti. Általában krónikus toxikózisról beszélhetünk, melynek tünetei a csökkent élelembevétel és az ezzel együtt járó teljesítménycsökkenés, hányás, anorexia. A DON erős fehérjeszintézis gátló hatású, felborítja a citokinin szabályozást, megváltoztatja a sejt proliferációt és sejthalálhoz vezet. A fehérjeszintézis gátlása miatt az agy növeli a triptofán felvételét, s ennek következtében fokozódik a szerotonin szintézise. Az eddigi kutatási eredmények alapján feltételezhető, hogy a DON és más trichotecének a megnövekedett szerotoninszinten keresztül felelősek az anorexia kialakulásáért. Az is szerepet játszhat a csökkent élelembevételben, hogy a vomitoxin irritálja az emésztő szervrendszert. Igen erős immunrendszer gátló (Rotter *et al.*, 1996, Pestka, 2010). Vízben és poláros oldószerekben oldódik, mint a víz-metanol, víz-acetonitril, etil-acetát. A DON szerves oldószerekben stabil, leggyakrabban etil-acetátban vagy acetonitrilben oldják. A toxin az élelmiszerekben illetve takarmányban stabil marad az alapvető feldolgozási és főzési folyamatok során is, ezért az alapanyagok szennyezettségének mértéke kulcskérdés. Számos országban ezért irányelveket és ajánlásokat

fogalmaztak meg, mind a takarmány, mind az élelmiszer alapanyagok és a feldolgozott élelmiszerek DON tartalmának tekintetében. Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (FDA) ajánlásában az emberi fogyasztásra szánt feldolgozott búzatermékek DON tartalmát max. 1000 µg/kg szinten szabályozta, míg a takarmányokét 5000 µg/kg-on. Az Európai Bizottság a DON élelmiszerekben megengedett maximális szintjét 200 µg/kg-ban határozta meg a csecsemőknek, illetve a kisgyermekeknek szánt gabona alapú feldolgozott élelmiszerek esetén, 1750 µg/kg feldolgozatlan durumliszt, kukorica, zab esetén és 1250 µg/kg-ban más feldolgozatlan gabona esetén, 700 µg/kg tésztafnál, 500 µg/kg kenyér és cereália alapú élelmiszerek esetén (Comission Regulation, 2006, EFSA, 2013).

2.5 DON meghatározásra alkalmas analitikai módszerek

Az utóbbi évtizedben a mikotoxinnal szennyezett gabonafélék előfordulásának száma folyamatos növekedést mutat, ezért mind gazdasági, mind állategészségügyi, mind élelmiszerbiztonsági szempontból különösen fontos olyan DON kimutatására alkalmas analitikai módszerek fejlesztése, amelyek megbízhatóak, használatuk egyszerű és olcsó. A mikotoxinok kémiai szerkezetének sokszínűsége, és az, hogy sokféle mátrixban található meg, az analitikusok számára nagy kihívást jelentenek. A szelektivitás igénye mellett egyre nagyobb figyelmet kapnak az olyan technikák, amelyek megfelelően érzékenyek, hisz legtöbbször csak nyomokban található meg a toxin a mintában, így sokszor ppb vagy ppt szintű meghatározás szükséges. Legtöbbször ugyanazon mintában többféle mikotoxin van jelen, amelyek egymásra szinergista hatással lehetnek, ezért előtérbe kerültek azok a technikák, amik többféle mikotoxin egyidejű meghatározására alkalmasak (Pietro-Simon *et al.*, 2007).

2.5.1 Nagyműszeres analitikai technikák

A DON kimutatására általánosan használt technikák nagy beruházást igénylő, nagyműszeres analitikai technikák, mint a nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) és gáz kromatográfia (GC), amit különböző detektorokkal kombinálnak, mint pl.: ultraviola-látható fény (UV-Vis) vagy fluoreszcens érzékelővel (FD), láng ionizációs detektorral (FID), elektronbefogási detektorral (ECD), tömeg spektroszkópiával (MS) vagy tandem MS-sel csatolnak (MS/MS).

A nagyműszeres technikákon belül a gázkromatográfias módszerek alkalmazása a mikotoxin meghatározásban kiemelkedő volt. Scott és mtsai (1986) DON kimutatására használt gázkromatográfias módszert ismertettek, mely módszer megbízható, ugyanakkor időigényes volt. Az analízisidőt a tisztítási lépés optimalizálásával próbálták lerövidíteni (Jiménez és Mateo, 1997).

Onji és mtsai (1998) olyan GC-MS módszert mutattak be, amely nyolc különböző trichotecén meghatározására volt alkalmas a minta származékképzése nélkül. A vizsgálatban egy továbbfejlesztett hideg injektálós módszert alkalmaztak. Cunha és Frenandes (2010) kifejlesztett egy QuEChERS (gyors, könnyű, olcsó, hatékony, robosztus és biztonságos) eljárásos nyugvó GC-MS alapú új, validált analitikai eljárást DON és 15-acetil-DON szimultán meghatározására. A kialakított módszerrel reggelizőpelyhek és lisztek mikotoxintartalmát vizsgálták. Reggelizőpelyhekben a kimutatási határ DON és 15-acetil-DON esetén 11 µg/kg és 8 µg/kg volt, lisztben mindkét analitikum esetén 8 µg/kg. Ibáñez-Vea és mtsai (2011) A és B típusú trichotecének szimultán meghatározására alkalmas validált GC-MS módszert mutattak be, mely módszerrel árpa mikotoxin tartalmát határozták meg. Jakovac-Strajn és Tavčar-Kalcher (2012) szintén különböző gabonákból történő A és B típusú trichotecének szimultán meghatározására alkalmas validált GC-MS módszert ismertettek. Ma azonban egyre inkább a nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás módszerek veszik át a mikotoxin meghatározásban a vezető szerepet, mert a maszkolt mikotoxin gázkromatográfiás módszerrel történő meghatározása nehézkes, erőteljes származékképzési reakciókat kell alkalmazni, hisz a maszkolt mikotoxinok nagy része nem illékony vegyület.

Napjainkban a DON kimutatásra leggyakrabban alkalmazott módszer a különböző detektorokkal kombinált nagy teljesítményű folyadékkromatográfia. Klinglmayr és mtsai (2009) búza alapú élelmiszerek és takarmányok DON tartalmát vizsgálták HPLC-UV detektálással 220 nm-en. A DON kimutatási határa 200 µg/kg volt, míg a meghatározási határ 380 µg/kg-nak adódott. Böhm és mtsai (2008) DON kukoricából történő meghatározását végezték HPLC-UV technikával, mely során a DON kimutatási határa 74 µg/kg volt. Egy másik kutatócsoport HPLC-FD meghatározást használt DON kimutatására automatizált kétsatornás oszlop utáni származékképzést alkalmazva. A detektálást 360 nm-en végezve a DON kimutatási határa durum búzából 14 µg/kg volt (Muscarella *et al.*, 2012). A HPLC előnye a nagy érzékenység, ugyanakkor UV illetve FD detektálást alkalmazva a módszer nem kellően szelektív. Mikotoxinok kimutatására a HPLC-MS, illetve a HPLC-MS/MS módszerek a nagyfokú szelektivitásuk, nagy érzékenységük miatt a nyomnyi mennyiségek komplex mátrixokban történő meghatározásában az első számú módszerekké léptek elő az utóbbi évtizedben (Ran *et al.*, 2013). Lattanzio és mtsai (2009) olyan LC-ESI-MS/MS technikát fejlesztettek ki, ami 11 különböző mikotoxin szimultán meghatározását teszi lehetővé, köztük DON, aflatoxin és ochratoxin A vizsgálatot kukorica mintákból. A minta előkészítés során tisztításához egy új típusú multi-toxin immunaffinitás oszlopot (Mycobin1, Vicam, USA) alkalmaztak, ami az összes vizsgálandó mikotoxin elleni specifikus antitestet tartalmazta.

Annak ellenére, hogy az LC-MS/MS technikánál igen fontos szerepe van a mintaelőkészítésnek, tisztításnak, a közelmúltban olyan LC-MS/MS technikát fejlesztettek ki mikotoxinok szimultán meghatározására, ami nem igényel minta tisztítást. A vizsgálatban kukorica és rizs minták mikotoxintartalmát (aflatoxin, ochratoxin, DON, fuminosin, zearalenon, T-2, HT-2 toxin) határozták meg. A mintákat acetonitril:víz:ecetsav 79:20:1 arányú keverékéből álló oldószeres extrakciót követően további tisztítás nélkül vizsgálták. A kimutatási határ 0,01-20 ng/g tartományban volt. (Soleimany *et al.*, 2012).

Az LC-MS/MS technika alkalmazása a rejtett, maszkolt mikotoxintartalom (masked toxin) kimutatásában és mennyiségi meghatározásában is jelentős. Ezek a rejtett mikotoxinok az élelmiszerekben egy lényegesen polárosabb anyaggal (pl.: glükóz) konjugálódnak, így a rutin analitikai vizsgálatokkal nem kimutathatók, ugyanakkor az emésztőrendszerben hidrolízis útján felszabadulnak. Az LC-ESI-MS/MS analízisek alapján a leggyakoribb rejtett mikotoxin a deoxynivalenol-3-glükozid (DON-3-Glc), ami a szennyezett kukorica és búzaminták össz DON tartalmának a 12%-át is jelentheti (Berthiller *et al.*, 2005).

A fent ismertetett nagyműszeres technikák szelektívek és érzékenyek, de időigényesek, bonyolult mintaelőkészítést, minta tisztítást igényelnek. A minta tisztítására leggyakrabban szilárd fázisú extrakciót (SPE), immunaaffinitás oszlopokat (IACs), multifunkciós oszlopokat alkalmaznak, de a molekuláris lenyomatú polimerek mintatisztításra való felhasználására is számos alkalmazást találhatunk az irodalomban. Többféle kereskedelmi forgalomban kapható SPE oszlop létezik, a töltetek rendkívül széles skálájával. Az SPE oszlopok trichotecének vizsgálatára történő alkalmazásánál figyelembe kell venni a technika hátrányait is, hiszen ezek a toxinok különböznek egymástól mind polaritásban, mind oldhatóságban, ezért néhányuk visszanyerése gondot okozhat. Ennek a problémának a leküzdésére számos kereskedelmi cég új tölteteket fejlesztett ki, mint pl. az Agilent Technologies Inc. létrehozta a Bond Elut Mycotoxin patront, ami 12 különböző A és B típusú trichotecén szimultán tisztítására alkalmas, beleértve a zearalenont is. Ezzel a technikával mind az analízisidő, mind az elemzés költségei csökkenthetők (Rahmani *et al.*, 2009). Trichotecének tisztítására szintén gyakran alkalmazzák a multifunkciós oszlopok körébe tartozó MycoSep oszlopokat (Romer Lab Inc.). Az A és B típusú trichotecének tisztításához háromféle töltetű oszlop kapható, mely alkalmazása elsősorban a vizsgálati anyagtól függ (Langset *et al.*, 1998, Krska *et al.*, 2005). Ezen multifunkciós oszlopok alkalmazásával értékes analízisidőt lehet megtakarítani, hiszen nincs szükség az oszlop előkondicionálására és mosására.

Az immunaaffinitás oszlopok (IACs) alkalmazása a mintatisztításban szintén igen elterjedt. Senyuva és mtsai (2010) publikáltak egy összefoglaló tanulmányt az IAC használatáról az élelmiszeranalízisben, beleértve a mikotoxinanalízist is. A technika legfőbb előnye az antitest és a kérdéses analitikum közötti specifikus kölcsönhatásban rejlik. Azonban, mint minden antitest

alapú technikánál, a nem specifikus reakciók, amik a másféle trichotecénekkal való keresztreakciók miatt jönnek létre, az eredményeket ronthatják. A szerzők szerint az IAC alkalmazása a trichotecén analízisben rendkívül nagy jelentőségű. Egy hátránya van a technikának, mégpedig az a kereskedelmi forgalomban kapható oszlopok árában nyilvánul meg, hisz ezek igen drága, egyszerhasználatos oszlopok.

A mintatisztításnál a molekuláris lenyomatú polimerek (MIP) alkalmazása iránt egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik. A MIP-ek olcsók, könnyen előállíthatók, nagy kémiai stabilitással és hosszú élettartammal rendelkeznek. DON meghatározására alkalmas MIP-ek szintézisét és karakterisztikáját Weiss és mtsai (2003) ismertették cikkükben.

2.5.2 Gyors vizsgálati módszerek

Az élelmiszerek és takarmányok mikotoxin monitorozásában nagyon fontos analitikai eszközök a gyors ellenőrzési (screening) technikák. Ezek általában minőségi meghatározást tesznek lehetővé, csak az analitikum jelenlétéről, illetve hiányáról adnak felvilágosítást, de vannak félmennyiségi és mennyiségi meghatározásra alkalmas gyors tesztek is. E tesztek előnye elsősorban a gyorsaságban, mintaelőkészítés egyszerűségében és az alacsony költségekben rejlik. Ugyanakkor vannak hátrányai is. Meg kell említeni a megbízhatóság kérdését, hisz gyakran álpozitív eredményeket kapunk. E teszteknel kíváncsi vagyok, hogy az álpozitív eredményeket 5% alatt kell tartani, míg az álnegatív eredményeket ki kell küszöbölni. A gyorsmódszerek közül használatukat tekintve a legegyszerűbb technikák a tesztsíkok (lateral flow device (LFD)). Alkalmazásuk nem igényel képzett személyzetet, rendkívül gyors, a termékek minőségének ellenőrzésére az átvétel helyén is alkalmazható. Yang és mtsai (2010) búza illetve kukorica DON tartalmának kimutatására alkalmas kolloid arannyal jelzett DON specifikus monoklonális antitestet tartalmazó immunkromatográfiás tesztsíkot alakítottak ki. A teszt kimutatási határa 50 ng/ml volt, míg az analízisidő 10 perc. Zhi-Bing és mtsai (2012) hasonló kompetitív rendszerű kolloid arannyal konjugált antitestet tartalmazó immunkromatográfiás tesztsíkot fejlesztettek ki DON és zearalenon együttes kimutatására búza és kukoricamintákból. A teszt kimutatási határa DON esetén 1000 µg/kg, míg ZON esetén 60 µg/kg volt. Egy mérés kb. 5 percet vett igénybe. Kolosova és mtsai (2008) publikációjukban olyan LFD tesztet mutattak be, amely két méréstartományban működött 250-500 µg/kg és 1000-2000 µg/kg tartományban. A mintánál metanol-víz (80/20% v/v) eleggyel történő extrakciót végeztek. Számos kereskedelmi forgalomban is kapható tesztsík létezik, mint a Reveal for DON SQ (Neogen Corp. USA), amely árpa, zab, búza, búzakorpa, liszt DON tartalmának félmennyiségi meghatározására alkalmas az AccuScan leolvasó alkalmazásával. A műszer a tételeket négy osztályba sorolja: negatív a minta,

ha a minta DON tartalma $\leq 0,5$ mg/kg, pozitív, ha $0,5 \text{ mg/kg} \leq \text{DON} \leq 1 \text{ mg/kg}$, valamint $1 \text{ mg/kg} \leq \text{DON} \leq 2 \text{ mg/kg}$, valamint $\text{DON} \geq 2 \text{ mg/kg}$. Hasonlóan alkalmazható a RIDAQUICK DON (R-Biopharm Ag. Germany) nevű gyorseszteszt, ami gabonák DON tartalmának meghatározására alkalmas. A teszt kimutatási határa $0,5 \text{ mg/kg}$ DON. A DON-V teszt (Vicam) durum búza, liszt, tészta DON tartalmának mennyiségi meghatározására alkalmas $0-5 \text{ mg/kg}$ tartományban. A teszt kimutatási határa $0,2 \text{ mg/kg}$ (Liu *et al.*, 2012). A QuickTox Kit for Quick Scan DON (EnviroLogix, USA) megkapta az AOAC International Research Institute Performance Tested MethodSM tanúsítványát. A teszt $0-5 \text{ mg/kg}$ közti tartományban alkalmas DON meghatározására búza, kukorica, búzakorpa, búzaliszt és árpa mintákból (Albert *et al.*, 2013).

Említést kell tenni az elektronikus orr, mint kémiai szenzor alkalmazásáról a gyors vizsgálati módszerek között. Campagnoli és mtsai (2011) bemutattak egy olyan elektronikus orr - fémoxid félvezető (EN-MOS) szenzort, ami alkalmas a durum búza minták DON tartalmuk alapján történő megkülönböztetésére. A rendszer három csoportba osztályozta a mintákat aszerint, hogy szennyezett vagy nem szennyezett, illetve, hogy a DON tartalma a határ alatt ($1,75 \mu\text{g/kg}$) vagy felett van. Egy másik kutatócsoport árpa DON tartalmának meghatározási lehetőségét vizsgálta az illékony komponensek elektronikus orral történő vizsgálatával (Olsson *et al.*, 2002).

2.5.3 ELISA módszerek

Ma a mikotoxinok kimutatására legáltalánosabban használt módszer az enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat (ELISA). Az ELISA vizsgálat nem igényel extra tisztítási vagy dúsítási lépést, a minta extrakciót követően azonnal vizsgálható. Maragos és mtsai (2006) DON és NIV szimultán meghatározására alkalmas kompetitív direkt és indirekt ELISA módszert fejlesztettek ki, monoklonális antitestet alkalmazva. Ji és mtsai (2011) búzából történő kimutatásra alkalmas indirekt kompetitív ELISA módszert hoztak létre. Kétféle, BSA-hoz és OVA-hoz kötött 3-O-hemiszukcinil-DON konjugátumot készítettek a vizsgálatához, illetve a DON specifikus egér antiszérum termeltetéséhez. A lineáris mérési tartomány $10-100000 \text{ ng/ml}$ közt volt. Ehhez hasonlóan Dos Santos és mtsai (2011) BSA-hoz kötött DON-hemiglutarát konjugátumot készítettek, amellyel monoklonális antitesteket állítottak elő, a DON vizsgálatára alkalmas indirekt kompetitív ELISA teszt kialakításához. A DON kimutatási határa $177 \mu\text{g/kg}$ volt. A kereskedelmi forgalomban kapható DON kimutatására alkalmas ELISA tesztek az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Kereskedelmi forgalomban kapható DON kimutatására alkalmas ELISA tesztek

Teszt neve	Alkalmazható mátrix	LOD	Gyártó
AgraQuant®DON	árpa, árpamaláta, kukorica, kukoricakorpa, cirok, zab, búzaliszt, szója	0,2 mg/kg	Romer Labs
Green Spring DON	sör mogyoró, kukorica, gabonák, búza, maláta, takarmány	10 µg/L 200 µg/kg	Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co.
DON EIA	sör gabona takarmány és ételek	10 µg/kg 30 µg/kg 30 µg/kg	ELISA Technologies Inc.
Veratox for DON HS	búza, kukorica, árpa, zab, árpa maláta, feldolgozott gabonák	5 µg/kg	Neogen Corp.
MaxSignal® Deoxynivalenol (DON) ELISA Test kit	gabona, takarmány, fűszer, szérum, vizelet	15-1000 µg/kg 15 µg/kg 12,5 µg/kg 25 µg/kg	Bioo Scientific Co.
DON ELISA kit	gabona, takarmány		Frontier-Institute Co.
DEOXYNIVALENOL ELISA (5121 DON)	gabona, élelmiszer, takarmány, sör,	30 µg/kg	EuroProxima
RIDSCREEN®FAST DON	búza, maláta, árpa, kukorica	0,2 mg/kg	r-Biopharm GmbH

Az ELISA tesztek egyszerű és olcsó megoldást jelentenek a mikotoxin vizsgálatokban, ugyanakkor a kompetitív rendszernél a kis koncentrációknál gyakran a pontossága nem megfelelő, és csak bizonyos élelmiszer-mátrixokban alkalmazható.

Hasonlóan ígéretes és igen gyorsan fejlődő technika a fluoreszcens polarizációs immunoassay (FP). Maragos és mtsai (2002) búzából és kukoricából történő DON meghatározásra fejlesztett ki fluoreszcens polarizációs immunoassay módszert, azonban az általuk kialakított rendszer kb. 20%-kal nagyobb DON koncentrációt mért a mátrixhatás miatt. Lippolis és mtsai (2006) a Maragosék által kifejlesztett módszert fejlesztették tovább. Vizsgálataikat durum búza, dara és tészta minták alkalmazásával végezték, és figyelembe vették a minta mátrixhatásából adódó jeleltolódást is. A kimutatási határ mind három mátrix esetén 0,10 µg/g volt. Az eredmények igen jó egyezést mutattak ($r > 0,995$) a HPLC referencia módszerrel mért értékekkel.

2.5.4 Immunszenzorok

Az eddig bemutatott technikák ugyan gyors és olcsó megoldást nyújtanak a mikotoxin meghatározásban, de a mérések reprodukálhatósága, a mérések megbízhatósága a különböző mátrixokban és a kimutatási határ számos problémát vet fel. E problémákra nyújthat megoldást a különböző bioszenzorok alkalmazása a mikotoxin vizsgálatokban. A bioszenzorok, azon belül is az immunszenzorok alkalmazásával lehetőség nyílik a gyors, olcsó, megfelelően szelektív és szenzitív toxin mérésekre. A szenzor nagyérzékenységű, sorozatmérésekre is alkalmas módszerek kifejlesztését teszi lehetővé.

Napjainkban a jelölésmentes immunszenzorok fejlesztése került előtérbe. Számos kutatócsoport végez jelölésmentes mikotoxin szenzor fejlesztéseket, elsősorban aflatoxin és ochratoxin meghatározására, de csak igen keveset alkalmaznak DON kimutatásra. Kadota és mtsai (2010) búza DON és NIV tartalmának meghatározására kifejlesztett SPR alapú immunszenzort mutattak be, ahol a kompetitív vizsgálati módszerhez monoklonális ellenanyagot alkalmaztak, és a mintát előzetesen egy DON specifikus immunaffinitás oszlopon tisztították. A kimutatási határ 0,2 és 0,1 mg/kg volt NIV és DON esetében. Egy másik kutatócsoport olyan SPR alapú DON szenzort alakított ki, ahol felismerő elemként az arany chip felületre molekuláris lenyomatú polipirrol (MIPPy) filmet hozott létre. A MIPPy-SPR szenzor lineáris méréstartománya 0,1-100 ng/ml közt volt (Choi *et al.*, 2011). Meneely és mtsai (2010) búzából, búza alapú reggelizőpehelyből, illetve kukorica alapú bébiételből történő DON meghatározására alkalmas, igen gyors mérésre képes (9 perc/minta) SPR szenzort fejlesztettek. Van der Gaag és mtsai (2003) szimultán DON, aflatoxin B₁, fuminosin B₁ és zearalenon mikotoxin meghatározásra használható SPR bioszenzort alakítottak ki. A szimultán meghatározást négy sorba kapcsolt áramlási cella tette

lehetővé. Az SPR-hez hasonló jelölésmentes bioszenzort fejlesztett ki Maragos kutatócsoportja (2011). A biolayer interferometriás immunszenzorral búzaliszt DON tartalmát határozták meg. A mérés igen gyors (7 perc/minta) és a kimutatási határ 100 µg/kg volt. Amennyiben a vizsgálathoz kolloid arannyal konjugált antitestet alkalmaztak, az analízisidő lecsökkent 6 perc/mintára és a kimutatási határ is 90 µg/kg-ra (Maragos *et al.*, 2012).

2.6 Vitellogenin mint biomarker a környezetanalitikában

Az utóbbi évtizedekben bebizonyosodott, hogy az ipari, iparszerű mezőgazdasági és egyéb társadalmi tevékenység nyomán a környezetbe kerülő szennyező anyagok különféle humán- és ökotoxikológiai hatásokat váltanak ki. A társadalom manapság egyre több gyógyszert és háztartási vegyszert használ fel. Az iparszerű mezőgazdaságban a termelékenység és a minőség fenntartásában elengedhetetlen a növényvédőszer alkalmazása. Az intenzív állattartásban gyógyszerek nélkül nem lehet tartani a termelési szintet. Ezek az anyagok közvetlen a környezetbe kerülve, illetve ezek metabolitjai a vizelettel, széklettel ürülve bekerülnek a szennyvízbe és szennyvíziszapba. A szennyvíztisztító telepek tisztítási folyamatai során ezek a vegyületek csak részlegesen bomlanak le, és az ipar növekvő termelése által túlterhelt szennyvíztisztító telepek nem képesek teljesen szennyeződésmentessé tenni a folyókba engedett szennyvizet (Boros, 2004). Mivel ezek a vegyületek jól adszorbeálhatóak, ezért a folyók, patakok medrében az iszapra kötődve ún. biofilmen feldúsulhatnak és onnan a vízi élővilág szervezetébe juthatnak, ahol a zsírraktárakban feldúsulnak, így a szermaradványok az egész táplálékláncban kimutathatók.

Az utóbbi évtizedben egyre nagyobb figyelmet kaptak azok a környezetbe kerülő antropogén kémiai szennyező anyagok, melyekről bebizonyosodott, hogy képesek megváltoztatni, illetve megzavarni mind az állatok, mind az emberek hormonrendszerének működését. Az Európai Unió 1999 óta jogi keretek közt szabályozza az endokrin zavaró anyagok alkalmazását és meghatározta ezek tiltó listáját, amely azóta folyamatosan bővül (Commission of the European Communities, 1999). Az endokrin zavaró hatású anyagok analitikájában, az ún. hatás alapú biomonitorozásban lehet nagy segítségünkre az endokrin zavaró hatás felléptét jelző biomarker jelenlétének detektálása. Ilyen specifikus biomarker a vitellogenin (Vtg) fehérjecsald (Arcand-Hoy *et al.*, (1998), Hutchinson *et al.*, (2006).

2.6.1 Hormonális működésre ható vegyületek

A hormonális működésre ható vegyületeket (EDCs) az irodalomban nagyon sokféleképpen definiálták, de a leggyakrabban használt és elfogadott meghatározás a következő: A hormonháztartást megváltoztató anyagoknak azokat az exogén vegyületeket nevezzük, amelyek a

szabályozásban és a növekedésben szerepet játszó természetes hormonok termelését, kibocsátását, transzportját, kötődését, reakcióját, vagy kiürülését zavarják (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1997). Ezek az anyagok a hormonrendszer működését számos módon módosítják (Mendes, 2002):

- Ösztrogénreceptorokhoz kötődnek és aktiválják azokat, így az endogén hormonok hatását utánozzák.
- Ösztrogénreceptorokhoz kötődnek, de nem aktiválják azokat, így akadályozzák a természetes endogén hormonok hatásának megjelenését.
- Megváltoztatják a természetes hormonok szintézisének és metabolizmusának módját
- Módosítják a természetes hormonok metabolizációjának útját.

Az endokrin zavaró hatású anyagok csoportjába számos különböző típusú vegyület tartozik, mint a természetes hormonok (fitoösztrogének), gyógyszerek (pl. hormonális fogamzásgátlók), peszticidek (DDT, lindán), fenolok (BPA, APE), ftalátok, poliklórozott-bifenilek (PCB), lángfogók, fémek, halogénezett többgyűrűs égési melléktermékek (dioxinok). Az EDCs-re jellemző, hogy stabilak, nehezen bomlanak le, évekig intakt formában megmaradnak az élő szervezetekben és a természetben, az állati és emberi szervezet zsírraktáraiban felhalmozódnak. E kémiai anyagokra legérzékenyebbek a vizes környezetben élő állatok, hisz egész testfelületükkel érintkeznek a vízzel, innen szerzik táplálékukat és szaporodásuk is vízhez kötött. Számos kutatócsoport vizsgálta a vízi élővilágra gyakorolt hatásukat, ahol első sorban a nemi funkciók megváltozását, megszűnését (hermafroditizmus, szupernő szindróma, hímeknél vitellogenin termelés), eltolódott nőstény-hím születési arányt, rákos megbetegedéseket, immunrendszer károsodást, viselkedési zavarokat, tojáshéj elvékonyodást írtak le.

2.6.2 Vitellogenin

Halakban, kételtűekben a máj által előállított vitellogenin a legfontosabb alkotóeleme a szikfehérjének (Tyler *et al.*, 1991). A vitellogenin normál esetben csak az ivarérett nőstények vérében mutatható ki. A vérplazma vitellogenin koncentrációja a nőstény egyedekben vitellogenezis kezdetén hirtelen megnő, és a növekedési fázis végéig azonos szinten marad. A vér magas vitellogenin koncentrációja a vitellogenezis alatt az oocyta növekedését eredményezi. Hím, illetve ivaréretlen egyedek vérében nem mutatható ki vitellogenin, azonban a hím egyedek is rendelkeznek Vtg-t kódoló génekkel és ösztrogén receptorokkal, így az EDCs-k hatására, a hímek vérében is abnormális szintre emelkedhet mennyiségük (Sumpter and Jobling, 1995;

Wheeler *et al.*, 2005). Ezért a vízi és kétéltű hím állatok vérében található Vtg alkalmas biomarkernek bizonyult a környezetben lévő endokrin zavaró anyagok jelenlétének felismeréséhez.

EDCs-k monitorozására leggyakrabban használt teszt hal a közönséges ponty (*Cyprinus carpio*), hisz világszerte igen elterjedt halról van szó, és igen jól tolerálja a szennyezett környezetet is. Japánban egy nagyváros folyóhálózatán a Tama folyón végeztek vizsgálatokat a lehetséges környezeti szennyezők kimutatására. A vizsgálatban hím pontyok vitellogenin szintjét vizsgálták, amelyeket a szennyvíztisztító telepről kifolyó élővízből fogtak ki. A kifogott halaknál igen magas Vtg szinteket mértek és szövettani eltéréseket mutattak ki a herékben (Nakamura *et al.*, 1998). Purdom és mtsai (1994) Angliában hím szivárványos pisztrángokat telepítettek a szennyvíztisztító telepek kilépő ágához. Vizsgálatukban bebizonyították, hogy a hím halakban a szennyvíz által kiváltott Vtg szintézis indult meg.

2.6.3 Vitellogenin meghatározásra alkalmazott technikák

Számos analitikai és bioanalitikai módszert alkalmaznak biológiai minták vitellogenin szintjének kimutatására. A leggyakrabban alkalmazott nagyműszeres analitikai eljárás vitellogenin meghatározására a tömegspektrométerrel kapcsolt folyadék kromatográfia (LC-MS). Cohen és mtsai (2006) egy igen egyszerű módszert mutattak be szivárványos pisztráng és lazac véréből vitellogenin meghatározására. A vizsgálatban a kontroll vérmintákat és a β -ösztradiollal kezelt halak vérmintáit tripszinnel kezelték, majd a jellemző ún. „signature peptide”-et elválasztották és kvadrupól-repülési idő hibrid tömegspektrométerrel kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC-QTOF-MS) módszerrel vizsgálták.

Van Veld és mtsai (2005) egy univerzális elektroforetikus fehérje meghatározási módszert ismertettek, ami a vitellogeninek nagy molekula tömegén és kimagasló foszfoserin tartalmán alapult. A kísérletben tűzcselle (*Pimephales promelas*), fogasponty (*Fundulus heteroclitus*), szúnyogírtó fogasponty (*Gambusia holbrooki*) eredetű vér és mukozális fehérje mintákat választottak el poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE). A vizsgálat lehetővé tette különböző fajok nőstény, illetve ösztradiollal kezelt hím egyedek vitellogenin koncentrációjának meghatározását.

Vitellogenin meghatározásához gyakran alkalmaznak molekuláris biológiai módszereket is. An és mtsai (2006) kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR) eljárást dolgoztak ki Vtg mRNS mennyiségi meghatározására tengeripérhalból (*Mugil soiuy*). Barucca és kutatócsoportja (2006) különböző specifikus primert terveztek számos mediterrán halfaj Vtg mRNS koncentrációjának RT-PCR eljárással történő meghatározásához. Vizsgálatukban ivaréretlen európai angolna (*Anguilla anguilla*) egyedeket vizsgáltak, amelyeket

17- β -ösztradiollal kezelték, melynek következtében az egyedekben beindult a Vtg mRNS szintézis, bizonyítva az ösztrogénhatás iránti érzékenységet, illetve a kialakított primerek specifikusságát.

A leggyakrabban használt Vtg meghatározási eljárás az ELISA módszer. Számos különböző halfajból történő Vtg kimutására alkalmas Vtg specifikus sandwich ELISA (sELISA) módszert fejlesztettek már ki, mint pl.: ponty (*Cyprinus carpio*) (Kera *et al.*, 2000), tűzcselle (*Pimephales promelas*) (Parks *et al.*, 1999), zebrahal (*Brachydanio rerio*) (Brion *et al.*, 2002) esetén. Liao és mtsai (2006) kínai fűrgeselle (*Gobiocypris rarus*) Vtg szintjének meghatározására alkalmas kompetitív ELISA módszert fejlesztettek ki. A meghatározáshoz a halból tisztított Vtg-t és az ellene nyulakban termeltetett poliklonális antitestet alkalmazták. A kialakított ELISA rendszerrel olyan fiatal kínai fűrgeselle egyedek Vtg koncentrációját határozták meg, melyeket etetési kísérletben három különféle eredetű táppal etettek: szennyvízből fogott csővájó fűreggel, sórák lárvával (*Aretmia nauplii*) és kereskedelmi haltáppal. A kísérlet célja az volt, hogy megvizsgálják, hogy a táplálékokban jelen levő ösztrogén hatású összetevők az egyedekben beindítják-e a vitellogenezist. A táplálék ösztrogénhatású összetevőinek mennyiségét GC-MS módszerrel határozták meg. Eredményeik szerint az ELISA rendszerrel mért vitellogenin válaszok igen jó egyezést mutatott a táplálékból GC-MS analízissel meghatározott ösztrogénhatású anyagok mennyiségével, továbbá így bebizonyosodott, hogy a kínai fűrgeselle igen érzékeny modell hal a vízi környezet ösztrogén hatású EDCs-kel történő szennyezettségének monitorozására.

A környezetszennyezés hatásának kimutatására a békák gyakran jobb bioindikátorok mint a halak, ezért Vtg kimutatásra alkalmas ELISA módszerek nem csak halak, de kétélűek és hullók esetében is kidolgozásra kerültek. Egy igen érzékeny sELISA módszer került kialakításra ökörbéka (*Rana catesbeiana*) Vtg szintjének mennyiségi meghatározására. A módszer mérési tartománya 9,4 ng/ml-1200 ng/ml közt volt, míg a kontroll hím ökörbéka vérszérumhoz adott Vtg visszanyerése 92,0-108,8% (Li *et al.*, 2006). Sifuentes-Romero és mtsai (2006) 17- β -ösztradiollal kezelt hím fekete teknősök (*Chelonia mydas agassizii*) véréből ioncserés kromatográfiával tisztítottak Vtg-t. A tisztított Vtg egy 500000 Da dimer volt, ami két azonos monomerből állt. A fekete teknős Vtg ellen termelt poliklonális antitest igen magas aktivitást és specificitást mutatott mind az ELISA, mind a Western blot analízis alapján. A rendszer mérési tartománya 15 ng/ml és 2 μ g/ml közt volt.

Az utóbbi évtizedben a gyorskimutatási technikák fejlesztése egyre inkább a gyors, olcsó egyszerű, sorozatmérésekre alkalmas technikák felé irányult, amiben a bioszenzorok igen ígéretes és érdekes alternatívát jelentenek. Darain és mtsai (2005) amperometriás immunszenzort hoztak létre ponty Vtg gyors meghatározására. A szenzor munkaelektrodjaként vezető polimerrel borított szitanyomott szén elektródot alkalmaztak, aminek a felületére rögzítették a tormaperoxidáz

enzimet és a ponty Vtg elleni specifikus monoklonális antitestet. A minta Vtg tartalma és a glükózoxidázzal kapcsolt Vtg (GOX-Vtg) glükóz mint szubsztrát jelenlétében versengnek a szabad antitest kötőhelyekért. A minta Vtg tartalma fordítottan arányos a szenzor felületére kötődött GOX-Vtg mennyiségével. Az enzim által indukált jelet amperometriásan detektálták. A szenzor lineáris mérési tartománya 0,25 és 7,8 ng/ml közt volt, míg a kimutatási határ 0,09 ng/ml. Ugyanez a kutatócsoport vizsgálta Vtg kimutatásának lehetőségét elektrokémiai impedancia spektroszkópia technikával (Darain *et al.*, 2004). Fukada és mtsai (2003) kemilumineszcens immunassay alapú kimutatási módszert fejlesztett ki ponty Vtg meghatározására. A módszer lineáris mérési tartománya 1,95 és 1000 ng/ml közt volt. Soh és mtsai (2002) tanulmányukban egy szekvenciális injektációs analízis technikát mutattak be ponty vitellogenin meghatározására. A módszer kimutatási határa 5 ng/ml volt. Bulukin és mtsai (2007) egy jelölésmentes felületi plazmon rezonancia (SPR) alapú optikai immunszenzort fejlesztettek ki ponty Vtg szintjének meghatározására. A szenzor alkalmas volt a Vtg ppm tartományban történő kimutatására mind vérsérumból, mind mukózus mintákból. A mérés viszonylag gyors, 20 perc/minta volt.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célja OWLS alapú immunszenzorok fejlesztése volt élelmiszer- és környezetanalitikai alkalmazásra. Kísérleteimben búza deoxynivalenol-tartalmának vizsgálatára alkalmas immunszenzor, illetve EDCs szennyezőanyagok jelenlétének kimutatására biomarkernek tekinthető vitellogenin fehérje meghatározására alkalmas szenzor kialakítását tűztem ki célul, béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) és hal (ponty, *Cyprinus carpio*) egyedekből. A megvalósítás során a legfontosabb feladat a szenzor kialakításához szükséges immunanyagok előállítása, a direkt és indirekt mérési módszer alkalmazási lehetőségének vizsgálata, a mérési rendszer optimalizálása, valamint az új mérési módszerek felhasználhatóságának igazolása volt. A kifejlesztett technika megbízhatóságának ellenőrzéseként az OWLS immunszenzor eredményeit az élelmiszer- és környezetanalitikában alkalmazott ELISA referencia meghatározási módszerrel hasonlítottam össze. A kialakítandó mérési eljárásokkal céltom olyan technika kifejlesztése volt, ami gyors, egyszerű, sorozatmérésekre alkalmas és lehetővé teszi az analitikum nagy érzékenységgel és szelektivitással történő meghatározását.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

A szenzor felület szilanizálásához az γ -amino-propil-trietoxi-szilánt (APTS), valamint az aktiválásához a glutáraldehidet, a borostyánkősavanhidridet, az 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (EDC), valamint az N-hidroxi-szukcinimidet (NHS) a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) szereztem be.

Az immunizáláshoz használt komplett és inkomplett Freund adjuváns a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) származott. A tormaperoxidázzal jelölt anti-nyúl kecske IgG konjugátum a Jackson ImmunoResearch Inc. (USA) terméke volt. A kromogén orto-fenildiamin (OPD) és H_2O_2 szubsztrát szintén a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) terméke volt. Az immunglobulinok tisztításához használt dializáló zsák a SERVA Electrophoresis GmbH terméke. A konjugátumok készítéséhez szükséges marhaszérum-albumin (BSA), ovalbumin (OVA), anti-BSA IgG (2,6 mg/ml) és a 2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol (TRIS) szintén a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) termékei voltak.

A modellkísérleteknél alkalmazott hirudin, tripszin inhibítor, ovalbumin, marha szérum albumin, glükózoxidáz, γ -globulin és hemocianin a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) származott.

A deoxynivalenol mikotoxin a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) terméke volt.

A vitellogenin méréshez szükséges fehérjék és antitestek a munka során készültek.

A Bradford-féle fehérjemeghatározáshoz BIO-RAD (Cat.#500-0006) festéket alkalmaztam.

A poliakrilamid-gélelektroforézishez (SDS-PAGE) alkalmazott SDS, valamint az akrilamid (oldott állapotú) a BIO-RAD Laboratories Inc. terméke volt. A β -merkaptotanol a MERCK KGaA terméke volt. A karbamid, TRIS, Coomassie Brilliant Blue G-250 és R-250 festékek a Reanal Finomvegyszergyár Zrt.-től származtak. A fixáláshoz használt triklórecetsav a CARLO ERBA Reagents S.A.S terméke volt.

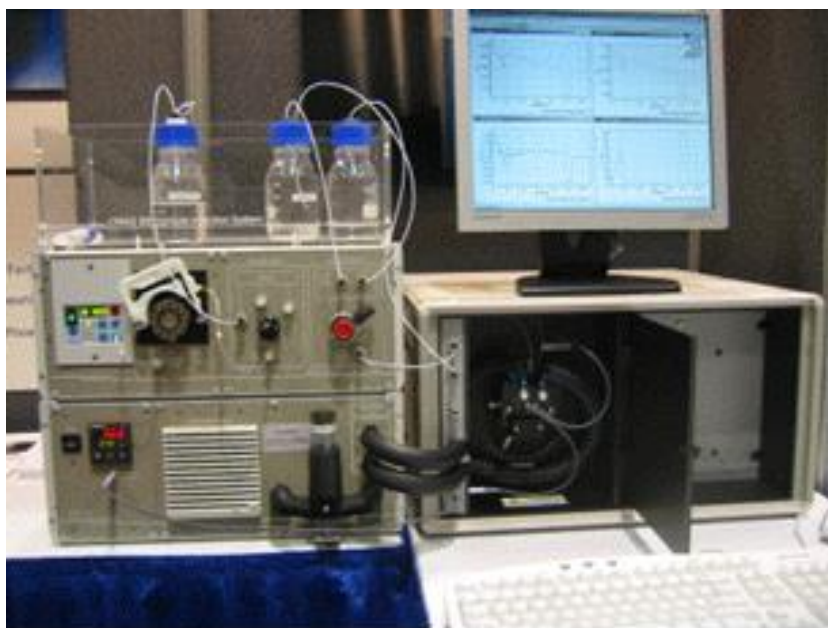
Az ELISA vizsgálatokhoz alkalmazott mikrotiterlemez az Analyzer Kft. terméke volt. A kecskéből nyert anti-nyúl IgG-HRP konjugátum a BIO-RAD Laboratories Inc.-től származott. A szubsztrát-oldat (H_2O_2 /OPD), valamint az inhibítor oldat a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) termékei voltak.

Minden további vegyszer analitikai minőségű kereskedelmi termék volt.

4.2 Módszerek

4.2.1 OWLS mérőrendszer felépítése

A mérésekhez OW 2400 típusú amino funkcionális integrált optikai hullámvezető szenzort (chip) (MikroVakuum Kft, Budapest) használtam. A vizsgálatokat a MikroVakuum Kft. által gyártott OWLS 120-as típusú berendezéssel végeztem. A műszert a BioSense 2.2 szoftver vezérelte. A berendezés fényforrása lineárisan polarizált He-Ne lézer (632,8 nm). A szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében az OWLS szenzort folyamatosan áramló injektálós rendszerben (FIA) működtettem. A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába (küvetta) helyezve használtam. Az állandó áramlási sebességet Gilson Minipulse 3 típusú perisztaltikus pumpa biztosította. A mintatartó átfolyó cella hőmérsékletét az OWLS TC hűtő/fűtő egység szabályozta. A minta injektálását egy Rheodyne típusú injektorral végeztem, mely 200 µl-es mintavevő hurkot tartalmazott. Az eredmények kiértékelését a MikroVakuum Kft. BioSense 2.6 szoftverrel végeztem. A 7. ábra a FIA rendszerrel ellátott OWLS 120 mérőműszert mutatja be.



7. ábra: FIA rendszerrel ellátott OWLS mérőműszer

4.2.2 Szenzor felületének módosítása szilanizálással

A hullámvezető szenzor felülete igen hidrofób, csak kevés hidroxilcsoport található rajta, ami nem alkalmas a biomolekulák közvetlen rögzítésére, a felületet kémiaiilag módosítani kell. Az egyik leggyakrabban alkalmazott felületmódosítási eljárás a szilanizálás. A szilanizálással különböző funkciós csoportokat lehet biztosítani az alkalmazott szilán molekulának megfelelően, amihez már a megfelelő kémiai lépésekkel rögzíthetők a biomolekulák.

Kísérleteimhez a szenzor felületén aminocsoportokat alakítottam ki γ -amino-propil-trietoxi-szilánt (APTS) alkalmazva (Trummer *et al.* 2001). A felületmódosításhoz a szenzort előzőleg tisztítani és hidratálni kell. A tisztítást krómkénsavban történő áztatással (1 óra) végeztem, majd a szükséges hidroxilcsoportok kialakításához a tisztított szenzorokat forró vízzel hidratáltam (90 °C, 1 óra). A szilanizálás vizes fázisban, bemeztéses technikával történt. A megtisztított és forró vízben hidratált szenzorok felületét az APTS (pH 3) 10%-os oldatával 75 °C-on, 3 órát kezeltem. Desztillált vízzel való mosás után a képződött szilánréteg stabilizálódása érdekében a szenzorokat hőkezeltam (95 °C, 16 óra), és Eppendorf-csőben tároltam a további felhasználásig.

4.2.3 Biomolekulák rögzítése EDC/NHS eljárással

A szenzor felületének módosítása, majd az ezt követő immobilizáció az úgynevezett inkubációs küvetában (MikroVakuum Kft.) történt, ahol az APTS reagenssel kezelt szenzorfelület aminocsoportjait borostyánkősavanhidrides kezeléssel karboxilcsoportokká alakítottam. A karboxilcsoportokat az aminocsoportok származékképzésével hoztam létre, melyhez a chipet 100 μ l 0,2%-os borostyánkősavanhidriddel (dimetil-formamidban oldva) kezeltem szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően a szenzort desztillált vízzel mostam, majd 90 °C-on 15 percig szárítottam. Hogy reaktív szukcinimid észtert hozzak létre a felületet 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbidiimiddel (EDC) és N-hidroxi-szukcinimiddel (NHS) kezeltem, ahol 0,4 mol/l EDC / 0,1 mol/l NHS (1:1) arányú keverékét alkalmaztam. A szenzort ezt követően desztillált vízzel mostam, majd 13 mM-os pH 5-ös acetát pufferrel mostam a felületet, hogy biztosítsam az optimális feltételeket a fehérjék immobilizációjához. A rögzítendő biomolekulákat ugyanebben az acetát pufferben hígítottam és immobilizáltam a felületen. A rögzített biomolekulát tartalmazó szenzort Eppendorf csőben 4 °C-on tároltam a felhasználásig. A mérés indításakor a szabadon maradt reaktív észterköthelyeket 1 mol/l etanolamin injektálásával blokkoltam.

4.2.4 Biomolekulák rögzítése glutáraldehiddel

Az aminoszilanizált szenzorfelülethez a biomolekulák közvetlen köthetők glutáraldehid segítségével. A rögzítés során a chipet az OWLS mérőműszer szenzortartójába helyeztem, és a rögzítést FIA rendszerben végeztem. Az alkalmazott áramlási sebesség 0,16 ml/perc volt. A mérőcellán először desztillált vizet áramoltattam, majd a rendszerbe 200 µl glutáraldehid oldatot (2,5% desztillált vizes) injektáltam. A glutáraldehid által okozott effektív törésmutató változást folyamatosan figyelve, amikor a törésmutató változást leíró görbe eléri a maximumot (a szenzor felületén ekkor csak glutáraldehid található), az áramlást 3 percre leállítottam. Ez alatt az idő alatt a glutáraldehid hozzá kapcsolódik a szenzorfelület aminocsoportjaihoz, polimerizálódik, és térhálós szerkezetet alakít ki. Három perc elteltével újra elindítottam az áramlást. Az oldat kimosódását követően a desztillált vizet TRIS pufferre (42 mmol/l, pH 7,4) cseréltem. A biomolekula rögzítése a molekula megfelelő koncentrációjú oldatának injektálásával történt. Az injektálást követően az áramlást hasonlóan a glutáraldehidnél leírtak alapján 3 percre leállítottam. Az áramlás újbóli elindítása után a szenzort rövid ideig pufferrel mostam, majd a meg nem kötődött molekulák eltávolítására 50 mM HCl-at injektáltam. Az érzékenyített szenzorfelület ezt követően alkalmas a minták mérésére.

4.2.5 Fehérje koncentráció meghatározása Bradford-módszerrel

A meghatározáshoz 20 µl vizsgálandó anyaghoz 1000 µl BIO-RAD (Cat.#500-0006) festék / desztillált víz 1:5 arányú keverékét adagoltam, alaposan összekevertem és 5 perc elteltével a festék fényelnyelési maximumánál 595 nm-en spektrofotométerrel vizsgáltam a fényelnyelés mértékét. A meghatározáshoz a kalibrációt BSA standard oldatok felhasználásával készítettem.

4.2.6 Tisztított lipovitellin fehérjék előállítása

A lipovitellin fehérjék tisztítása nőstény ponty és Keleti vöröshasú unka petefészkéből történt az alábbiak szerint.

4.2.6.1 Ponty lipovitellin előállítása

A Lpv tisztításához a nőstény ponty (*Cyprinus carpio*) petefészkét izotóniás foszfátpufferben (pH 7,4) mostuk, 0,5 mol/l NaCl-oldatban homogenizáltuk (0,5 g/ml, 12 óra, 4 °C). A homogenizátumot 3000 g-n centrifugáltuk, majd a fehérjefrakciót izotóniás foszfátpufferrel (pH 7,4) szemben dializáltuk. A dializátumból a Lpv fehérjét telített ammónium-szulfát (1:1 v/v) adagolásával kicsaptuk, a csapadékot ismét centrifugáltuk 3000 g-n és ammónium-szulfát oldattal mostuk, hogy a színyanyagokat eltávolítsuk. A fehérjéket 0,2 mol/l NaCl-oldatban visszaoldottuk, DEAE-cellulóz-oszlopon gélszűrőssel tovább tisztítottuk (0,1 mol/l TRIS puffer, pH 7,8, 0-300 mmol/l NaCl gradiens). A tisztított Lpv-készítményt 37%-os ammónium-szulfát oldatban 4 °C-on

csapadékként tároltuk. A tisztított ponty Lpv preparátum koncentrációja 3 mg/ml volt a Bradford-féle (1986) fehérje meghatározási módszer alapján (ld. 4.2.5. fejezet).

4.2.6.2 Béka lipovitellin előállítása

Lipovitellin tisztításához a nőstény Keleti vöröshasú unka (*Bombina orientalis*) homogenizált petefészket használtuk. A béka Lpv előállítás lépései megegyeztek az 4.2.6.1. fejezetben ismertetett ponty Lpv előállítással. A béka Lpv preparátum koncentrációja 3 mg/ml volt a Bradford-féle módszer szerint.

4.2.7 DON-fehérje konjugátum ellenőrzése izoelektromos fókuszálással

A DON-fehérje konjugátumot tartalmazó mintákat fehérjeoldó pufferben (8 M karbamid, 32 mM ditio-treitol és 11,5%(w/v) glicerin) oldottam és 15-15 µl-t vittem fel a gélre. A fehérjék izoelektromos fókuszálását 7,2 M karbamidot tartalmazó 4,35%-os poliakrilamid gélben végeztem pH:3-10 tartományban Multiphor II készüléken (Pharmacia LKB Biotechnology). Anód oldatként 5%(w/v)-os foszforsav oldatot, katódként pedig 2%(w/v)-os NaOH-ot használtam. Az izoelektromos fókuszálás paraméterei a következők voltak (2. táblázat):

2. táblázat: Izoelektromos fókuszálás során alkalmazott paraméterek

Lépés	Idő (perc)	Feszültség (V)	Áramerősség (mA)	Teljesítmény (W)
1.	60	max. 2500	max. 15	konst. 4
2.	60	max. 2500	max. 5	max. 20
3.	40	max. 2500	max. 6	max. 20

A fókuszálás befejezése után a fehérjéket fixáltam, 15 percig 15% (w/v)-os triklór-ecetsavban ráztatva, majd Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel detektáltam.

4.2.8 Lipovitellin preparátumok ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel

A Lpv-preparátumok tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltam (Hajós és Idei, 2001). Ehhez a tisztított ponty Lpv fehérjét feloldottam 12,5 ml fehérjeoldó pufferben (0,75 g SDS, 0,189 g TRIS, 2,5 ml glicerin, 2,5 ml β-merkapto-etanol, desztillált víz, pH 6,8). A mintákból 2,5; 5,0; 8,0; 10,0 µl-t vittem fel a gélre. Béka eredetű Lpv esetén 8-12 µl tisztított Lpv mintát oldottam fehérjeoldó pufferben és vittem fel a gélre. Molekulatömeg markerként 29000, 37000, 51000, 96000, 115000, 200000 Da fehérjét tartalmazó standardot alkalmaztam. A fő gél 12%-os (akrilamidra nézve) volt, ami 3,2 ml 30%-os akrilamid/bis-akrilamid 29:1 arányú keverékéből, 1,8 ml TRIS-ből (2 mol/l, pH 8,8), 50 µl SDS-ből (10%), 2,85 ml desztillált vízből, 6 µl tetrametil-etilén-diamin és 50 µl ammónium-

perszulfátból (10%(w/v)) állt. A gyűjtő gél 6%-os volt, ami 0,5 ml 30%-os akrilamid/bis-akrilamid 29:1 arányú keverékéből, 330 µl TRIS-ből (0,5 mol/l, pH 6,8), 27,5 µl SDS-ből (10%), 1,6 ml desztillált vízből, 3 µl tetrametil-etilén-diamin és 25 µl ammónium-perszulfátból (10%(w/v)) állt. Az alkalmazott távtartó 0,75 mm volt. A mintafelvitelt követően a gél elektroforézis cellába helyeztem. Az elektroforézis kamrát futtatási pufferrel (3,03 g TRIS, 1 g SDS, 14,4 g glicin 1000 ml-re desztillált vízzel kiegészítve) töltöttem fel. A vizsgálatokat BIO-RAD Mini Protean 3 Cell készüléken végeztem. A gél 200 V-on, max. 400 mA-en 55 percig futtattam, majd 20%-os triklórecetsav oldatban 20 percig fixáltam. Háromszori mosást (100 ml etanol, 50 ml ecetsav, 850 ml desztillált víz) követően Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkel festettem meg a gél.

4.2.9 ELISA eljárás referencia vizsgálatokhoz

Az ELISA vizsgálatokat 96-üreges ELISA mikrotálcán a szilárd fázisú immunassay elve alapján végeztem el (Hegedűs *et al.* 2000). A mikrotiterlemezeket üregenként 100 µl antigénnel vagy antigénkonjugátummal (1 µg/ml, 0,1 mol/l karbonátpufferban, pH 9,6; éjszakán át 4 °C-on inkubálva) fedtem. A nem specifikus kötőhelyeket 0,01 mol/l PBS pufferrel (0,8% NaCl, pH 7,4) való mosás után blokkoltam üregenként 150 µl blokkoló reagenssel (1% zselatin PBS pufferben, pH=7,4) 38 °C-on 1 óra inkubálással. A mikrotiterlemezt 0,2% Tween 20 detergenst tartalmazó PBS (PBST 0,2) oldattal mostam, majd minden üregbe 50 µl standardot vagy mintát és 50 µl PBST 0,2 oldattal hígított antiszérum oldatot adtam, és 38 °C-on 60 percig inkubáltam. Újabb mosás után (PBST 0,2), 100 µl kecskéből nyert anti-nyúl-IgG–HRP konjugátumot (1:12000 hígításban PBST 0,05) adtam, és ismét 60 percig inkubáltam. Mosás után (PBST 0,2) 200 µl szubsztrátoldatot (1,2 mmol/l H₂O₂ és 3 mmol/l 1,2-fenilén-diamin (OPD) 200 mmol/l kálium-dihidrogén-citrát-pufferban, pH 3,8) adagoltam. A szín kialakulása után (10 - 60 perc) az enzimreakciót 50 µl 4 N H₂SO₄ reagenssel állítottam le. A színintenzitást az üregekben 492 nm hullámhosszon mértem. A mért értékekből a standard görbéket 4-paraméteres (szigmoid) egyenlettel készítettem. A detektálás alsó határa (LOD) az a koncentráció, amely a vakminta szórásának (3x ismételés) háromszorosát adja.

4.3 Mintaelőkészítés

4.3.1 Búzaminták előkészítése DON méréshez

GC-MS vizsgálattal igazolt (LOD 0,01 mg/kg) DON-mentes búzalisztet szennyeztem különböző koncentrációjú DON-nal 0-100 mg/kg koncentráció tartományban. A vizsgálathoz 1 g búzalisztet mértem ki, majd szennyeztem a megfelelő koncentrációjú DON oldattal. A mintákat 10 ml acetonitril-víz 6:4 arányú keverékével hígítottam. A mintákat 10 percig kevertettem, majd hagytam ülepedni. A felülúszót méretkizárásos szűrőn (Millipore Ultrafree-MC 50.000 NMWL) 10 percig 10000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltam, majd a kapott szűrleteket 4 °C-on tároltam a felhasználásig.

4.3.2 Ponty minták előkészítése Vtg méréshez

A vizsgálathoz használt három hím és három nőstény ponty (*Cyprinus carpio*) az Aranyponty Zrt. (Rácegres, Rétimajor) ökológiai halgazdaságból származott. Az egyes egyedek vérmintáját 10 percig 6000 fordulat/perc fordulatszámon, majd 10 percig 11000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltam.

A halakból vett májmintákat felaprítottam (Ultra-turrax, IKA, Németország), és 1 g mintát 10 ml 42 mmol/l pH 7,4-es TRIS pufferben homogenizáltam. A mintákat vákuumcentrifugáltam 20 percig 4000 fordulat/perc fordulatszámon, majd ezt követően ismét 10 percig 12000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltam. A minták felülúszóját 4 °C-on tároltam a felhasználásig.

4.3.3 Béka minták előkészítése Vtg méréshez

A vizsgálatokhoz európai vöröshasú unkat (*Bombina bombina*) alkalmaztam. Tekintettel arra, hogy minden hazai békafaj védett, ezért a Természetvédelmi Felügyelőség engedélye alapján a természetből begyűjtött petecsomókból laboratóriumi tenyészetben nevelt vöröshasú unkat használtam. A fiatal egyedekből vett máj-, szív- és ivarmirigymintákat (Double Delta Kft.) ugyanúgy dolgoztam fel, ahogy azt a pontyminták esetében (ld. 4.3.2. fejezet).

4.4 Alkalmazott számítástechnikai és statisztikai módszerek

Az eredmények ábrázolásához, valamint statisztikai értékeléséhez az EXCEL (Microsoft Office professional Edition 2003) és az ORIGIN Scientific Graphing and Analysis Software (version 7) statisztikai programot használtam. Az eredmények összehasonlításához a Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztam $p < 0,05$ szignifikanciaszintet alkalmazva.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A szenzorválasz vizsgálata modellkísérletekkel

A mérések során a hullámvezető felszínén kialakított minden egyes réteg módosítja annak optikai és kémiai tulajdonságait. Annak érdekében, hogy megértsem az OWLS-sel történő érzékelés alapjait, valamint azt, hogy a vizsgálat során kialakított rétegek, és a felülettel kapcsolatba kerülő anyagok (minta, puffer stb.) hogyan változtatják meg az optikai tulajdonságokat, illetve, hogy bebizonyítsam, a felületmódosítási és rögzítési lépések a mérések során reprodukálhatóak, vizsgáltam a szenzor felületén kialakuló rétegek vastagságát, a szenzorválaszt az analitikum molekulatömege és koncentrációja függvényében, a szenzorválasz reakcióidejét, a mérés pontosságát, és a különböző vastagságú küveták alkalmazásának mérésre gyakorolt hatását. E modellkísérletek eredményei alapul szolgáltak az immunszenzor fejlesztésekhez. A fehérje koncentráció és szenzorválasz közti korreláció alapján az OWLS szenzort a továbbiakban immunanalitikai eljárások fejlesztésére alkalmaztam.

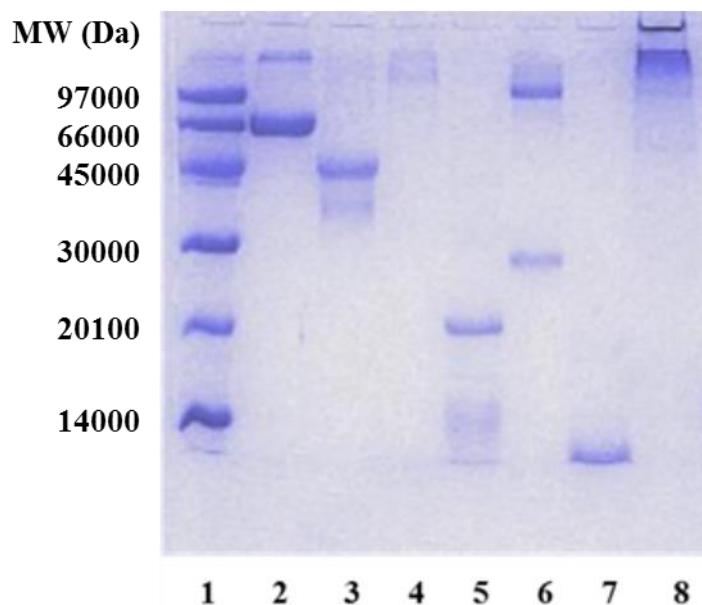
5.1.1 Különböző fehérjék rögzítése során kialakult rétegvastagságok vizsgálata

Kísérleteimben különböző fehérjéket (hirudint, tripszin inhibítort, ovalbumint, marha szérum albumint, glükózoxidázt, γ -globulint és hemocianint) rögzítettem a szenzor felületére glutáraldehiddel, és vizsgáltam az egyes fehérjék rögzítése során kialakult rétegvastagságot. A kísérletben OW 2400-as kezeletlen chipet használtam. Az immobilizálási protokoll végrehajtása során a rétegvastagság változása becsülhető, csak közelítő értékek határozhatóak meg. A kezeletlen szenzor hullámvezető rétegvastagsága 170-200 nm közt volt. A vizsgálatban a szenzor felületét 3-amino-propil-trietoxi-szilánnal (APTS) módosítottam. Tíz chipet vizsgálva az átlagos rétegvastagság változás APTS-sel történő módosítást követően, desztillált víz áramoltatás mellett $0,44 \pm 0,07$ nm volt. Következő lépésben 2,5 %-os glutáraldehid oldatot adagoltam. A glutáraldehid átlagosan $0,27 \pm 0,07$ nm rétegvastagság növekedést okozott. A keresztkötő molekula hozzáadása után a desztillált vizet lecseréltem a méréshez használatos 42 mM-os pH=7,4 TRIS pufferre. A TRIS puffer hatására a jel megváltozott, azonban itt nem a rétegvastagság növekedett, hanem az oldat törésmutatója (nc) változott, ez okozta a jeletolódást. Ebben az esetben új modellel kell tovább számolni, ezért igen fontos a mérések előtt az adott pufferrel az alapvonal felvétele. A TRIS alapvonal beállítását követően injektáltam a 0,1 μ M-os fehérjeoldatokat. A négyrétegű hullámvezető linearizált módusegyenletével a két módusra mért effektív törésmutató alapján kiszámítható az adszorbeált réteg törésmutatója és vastagsága, melyből meghatározható az egységnyi felületre adszorbeálódott anyag tömege (lsd. 2.3.1. fejezet). Azonban az eredményeim

ismertetésekor az ábrákon nem a ng/cm^2 mértékegységet tüntettem fel, hanem az „egység”-et (*arbitrary unit*, a.u.), mivel a három- és négyrétegű modellekkel történő tömegszámítás elsősorban a felületen adszorbeálódott molekulák tömegének meghatározására alkalmas. Kísérleteimben többretegű modellekkel dolgoztam. Az alkalmazott rögzítési módtól függően a meghatározandó fehérje a szenzor felületén az ötödik vagy hatodik réteg volt, ezért nem bizonyított, hogy a mért (látszólagos) tömegváltozás tényleg megfelel a szenzor felületén kötődő molekulák tömegének. Ez azonban nem befolyásolta az eredményeimet, mert minden esetben alkalmaztam standard oldatokat a kalibrációhoz, illetve a minták értékeléséhez.

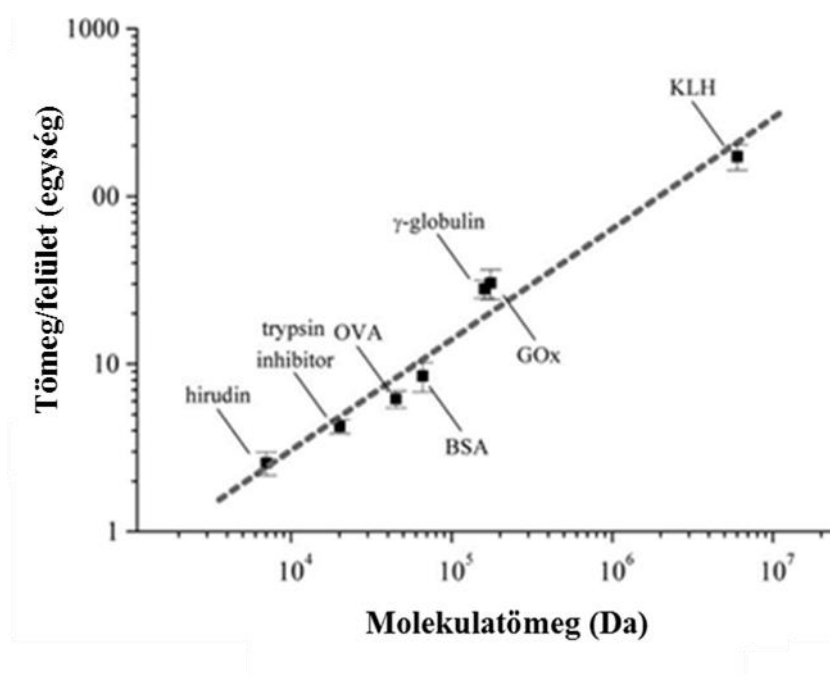
5.1.2 Szenzorválasz vizsgálata az analitikum molekulatömege és koncentrációja függvényében

Ahhoz, hogy megállapítsam, hogy az analitikum molekulaméretétől hogyan függ a válaszjel nagysága különböző molekulatömegű, de azonos molaritású ($0,1 \mu\text{M}$) fehérjeoldatokat immobilizáltam. A szenzor felületén glutáraldehiddel kovalensen rögzítettem a fehérjéket. Modellfehérjeként hirudint (MW~7000 Da), tripszin inhibítort (MW~20100 Da), ovalbumint (OVA, MW~45000 Da), marha szérum albumint (BSA, MW~66000 Da), glükózoxidázt (GOx, MW~160000 Da), γ -globulint (MW~175000 Da) és hemocianint (KLH, MW~6000000 Da) alkalmaztam. A molekulatömegüket poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE) is ellenőriztem (8. ábra).



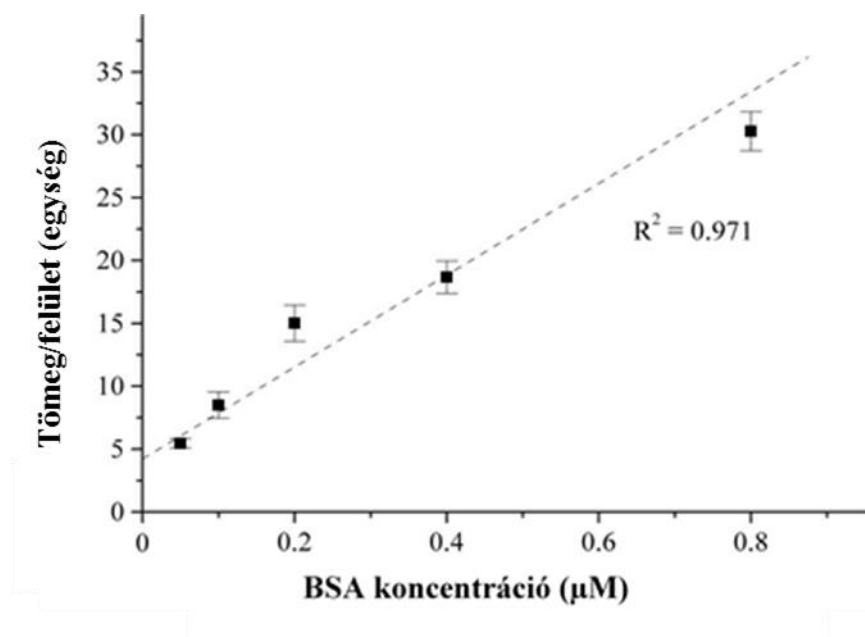
8. ábra Különböző molekulatömegű fehérjék elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel
(1: molekula standard, 14000-97000 Da, 2: BSA, 3: OVA, 4: GOx, 5: tripszin inhibitor,
6: γ -globulin, 7: hirudin, 8: KLH)

A fehérjék immobilizálása során a molekulatömegtől függően a rétegvastagság változása 0,02-1,25 nm között volt. A szenzor felületén immobilizált fehérjék molekulatömege és az OWLS szenzor válaszjele közti korrelációt a 9. ábra mutatja be. Az eredmények szerint, hacsak nincs különbség a kötődési tulajdonságokban, akkor a szenzorválasz nagysága egyenesen arányos a molekulatömeggel.



9. ábra A szenzor felületén immobilizált fehérjék molekulatömege és az OWLS szenzor válaszjele közti korreláció.

Szintén vizsgáltam, hogy hogyan változik a szenzorválasz nagysága egy adott fehérje különböző koncentrációban történő rögzítésekor. A vizsgálatban az aminoszilanizált szenzor felületére BSA-t rögzítettem glutáraldehiddel 0,005-0,8 μM koncentrációtartományban a korábban leírt módon. A kísérletben a szenzorválasz nagysága lineárisan nőtt a BSA koncentráció növekedésével ($r^2=0,971$) (10. ábra).



10. ábra A szenzor felületén immobilizált fehérjék koncentrációja és az OWLS szenzor válaszele közötti korreláció.

5.1.3 Szenzorválasz reakcióideje és a mérés pontossága

Az OWLS készülékben a fényforrás egy lineárisan polarizált He-Ne lézer (632,8 nm). A lézerfény a küvetában található chipre merőlegesen érkezik. A szenzortartó a számítógép által vezérelt léptető motor segítségével meghajtott mikrométercsavarral forgatható a lézer felett. A becsatolási szögeket -5° és 5° közötti tartományban forgatva vizsgáltam. A léptető motor egy körben 1000 lépést tesz meg. Egy lépés alatt a mikrométer csavar 0,0005 mm-t mozdul, ennek megfelelően a legkisebb vizsgálható szöglépés $0,000286^\circ$. A vizsgálatok indításánál minden chip karakterisztikus α_{TE} és α_{TM} csúcsait meg kell határozni. A kezdeti α_{TE} és α_{TM} csúcsok meghatározásához $0,01^\circ$ és $0,02^\circ$ fokenkénti szöglépést alkalmaztam, ugyanakkor a reakciók vizsgálatnál, a törésmutató mérési módban már elegendő a $0,02^\circ$ vagy $0,05^\circ$ léptetést alkalmazni. Így az OWLS technikával az alkalmazott beállítási protokolltól függően percenként 4-10 mérési pont felvétele lehetséges, azaz az adott szögtartományban legalább 6 másodperc szükséges egy mérési pont meghatározáshoz. Kémiai, biokémiai reakciók sebességének meghatározásához az ilyen sebességű adatszolgáltatás megfelelő, hogy a technikát valós idejű mérés technikának lehessen tekinteni. Egy immobilizációs reakció a szenzor felületén kb. 2-10 percet vesz igénybe reakciótípustól függően. A fent említett adatszolgáltatási sebességgel az egyensúlyi állapot kialakulása jól monitorozható.

Az érzékelés pontosságát nagyban befolyásolja, hogy a mérés során az olyan chip, amelynek felületén semmilyen felületi módosítás nem történt, annak a α_{TE} és α_{TM} becsatolási szöge az alapvonal felvételénél milyen variabilitást mutat. A kísérletben OWLS szenzor chipeket vizsgáltam szárazon, puffer áramoltatása nélkül. A mérést egy percre végeztem majd vizsgáltam az α_{TM} és az α_{TE} adatok változását. Átlagosan az $\alpha_{TM}=0,724627\pm0,0000824$ (relatív hiba 0,011%), míg a $\alpha_{TE}=3,197883\pm0,000157$ (relatív hiba 0,005%). Természetesen, ha a felületen bármilyen molekuláris kölcsönhatás létrejön, a becsatolási szög eltolódik. Vizsgálatom során kb. $0,005^\circ$ - $0,01^\circ$ eltérést tapasztaltam.

Vizsgálataimban külön figyelmet fordítottam a mérési körülmények, különös tekintettel a hőmérséklet állandó szinten tartására. A szenzor felületének hőmérsékletét a szenzortartóhoz csatlakoztatott hőmérséklet szabályzó egységgel (OWLS TC) tartottam állandó értéken. A szabályzó egység képes a beállított hőmérsékletet $\pm 0,1^\circ\text{C}$ -os pontossággal tartani.

5.1.4 Különböző méretű küveták alkalmazásának mérésre gyakorolt hatása

A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába (küvetta) helyezve használtam. A szenzor felett elhelyezkedő küvetta tömitése az üveg *chip*hez a küvetta kialakításának megfelelően ovális gumigyűrűvel történik. A küvetta biokompatibilis poliéter-éter-ke-ton (PEEK) anyagból készült, a folyadék ki-be vezetésére teflon- vagy PEEK csövek szolgáltak. Kísérletem célja az volt, hogy megvizsgáljam a készülékhez tartozó különböző méretű küveták használatával, hogyan változik a szenzorjel nagysága. A vizsgálathoz 0,8 és 0,3 mm mélységű küvetákat használtam. A kísérletet aminoszilanizált chippekkel végeztem, mintaként BSA/anti-BSA modell molekulapárt használtam. A chip felületén 2,5%-os glutáraldehiddel 20 $\mu\text{g/ml}$ BSA- t rögzítettem és mintaként különböző koncentrációjú anti-BSA-t (500-szoros, 1000-szeres, 2000-szeres, 4000-szeres hígításban) injektáltam és vizsgáltam a válaszjel nagyságát. A vizsgálatot 120 $\mu\text{l/min}$ áramlási sebességnél $24,5^\circ\text{C}$ -on termosztálva végeztem. Méréseim alapján megállapítottam, hogy a 0,3 mm mélységű küvetával sokkal nagyobb válaszjeleket kapok ugyanolyan koncentrációjú minta injektálásakor, mint a 0,8 mm mélységű küvetta alkalmazásával. Ez azzal magyarázható, hogy az injektált 200 μl mennyiségű minta sokkal hosszabb ideig tartózkodik a szenzor felületén a küvetta kisebb térfogata miatt, mint a 0,8 mm mélységű küvetta esetében.

5.2 DON meghatározására alkalmas immunszenzor fejlesztése

5.2.1 A szenzorfejlesztéshez szükséges immunanyagok előállítása

A vizsgálandó anyagok immunanalitikai meghatározásához előállítottam az antigének fehérjékhez kötött immunogénjeit, majd az immunogénekkal nyulakat immunizáltam. A poliklonális antitestet tisztítottam, ellenőriztem. Mivel a kisméretű (10 kD alatti móltömegű) molekulák önálló immunogén hatással nem rendelkeznek, vagyis a gerincesek szervezetébe bejutva nem tudnak humorális immunválaszt indukálni (az állatszervezet legfeljebb toxikus válaszreakciókat adhat, de antitestek termelésével nem válaszol a bejuttatott idegen anyagra), a célvegyületeket kellő méretű hordozómolekulához (fehérjékhez) kellett kapcsolni, hogy az immunizálás sikeres legyen, s a célvegyületekre specifikus antitesteket nyerhessek.

5.2.1.1 DON konjugátum szintézise

DON vizsgálatához kétféle konjugátumot készítettem: ovalbuminhoz (OVA) és BSA-hoz kötöttem. A kötés létrehozásához mind a fehérjéket, mind a DON-t elő kellett készíteni.

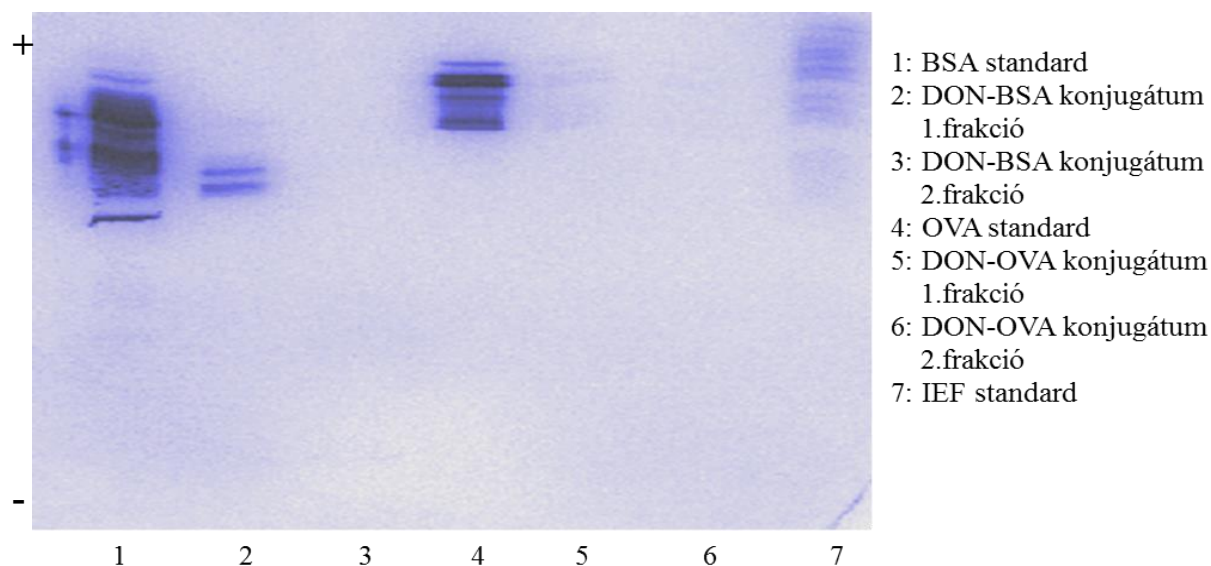
A fehérjék előkészítéséhez a fehérjéből 1-1 mg mennyiséget vettem, melyhez 0,24 ml desztillált vizet adtam és 0,06 ml nátrium-perjodátot (0,1 M, 10 mM nátriumfoszfátban) adagoltam a fehérjék aktiválásához. Az elegyet 20 percig rázattam, majd dialízis membránba töltöttem, és hűvös helyen 1 napig, 1mM nátrium-acetátban dializáltam, hogy a felesleges nátrium-perjodátot eltávolítsam.

A DON előkészítéséhez 3 mg DON-hoz 30 µl acetonitrilt és 30 µl ecetsavanhidridet (4%, acetonitrilben) adtam. Katalizátorként 4-dimetil-amino-piridint adagoltam, és az egészet 1 óráig kevertettem. Az egy óra elteltével 50 µl metanollal még egy pár percig kevertettem. Az előkészített fehérjékhez 36,6 µl a fentiek szerint előkészített DON-t adtam, és két óráig kevertettem. Két óra elteltével 20 µl 4%-os nátrium borohidridet adtam, hogy a reakciót leállítsam, és még két órát kevertettem. A két óra elteltével mindkét konjugátumot gélszűrőn tisztítottam.

A tisztított DON-BSA konjugátum 0,256 mg/ml fehérjét tartalmazott, míg a DON-OVA fehérjetartalma 5,31 mg/ml volt Bradford (1976) módszere alapján (ld. 4.2.5. fejezet).

5.2.1.2 Fehérjefrakciók ellenőrzése izoelektromos fókuszálással

Annak bizonyítására, hogy a kapott fehérjefrakciók a fehérje-DON konjugátumot tartalmazták, a fehérjéket izoelektromos pont alapján szeparáltam karbamidot tartalmazó poliakrilamid gélben a 4.2.7. fejezetben ismertetett módszer szerint. A futtatási képen látható (11. ábra), hogy a felvitt standard mintáktól jól elkülönül a BSA konjugátum 1. frakció és az OVA konjugátum 1. frakció, ami azt jelenti, hogy ezek a frakciók valóban tartalmazták a fehérje-DON konjugátumot.



11. ábra: DON-fehérje konjugátumok izoelektromos pont alapján történő szeparálása karbamidot tartalmazó poliakrilamid gélben

5.2.1.3 *DON* specifikus antitestek előállítása

A DON antigénre specifikus nyúlsérumot magyar vadás óriásnyúlban történő immunizálással, Harboe és Ingild (1973) módszerét adaptálva állítottam elő. Az immunizálás kis molekulatömegű antigén esetén az antigén konjugátumával történt. Az alapimmunizálás Freund-komplett adjuvánssal, míg az emlékeztető immunizálások Freund-inkomplett adjuvánssal történtek. A tisztított antigénkonjugátumot 1 mg/ml koncentrációban 0,01 mol/l foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) (pH 7,4) oldottam fel. A 0., 14., 28. és 42. napon a kb. 3,2 kg tömegű nyulakat 25 µg antigén/testtömeg kg koncentrációjú antigén (DON-ovalbumin konjugátum) oldattal (50 µl fiziológiás sóoldat és 50 µl komplett/inkomplett Freund adjuváns) immunizáltam lapocka közötti, többszöri injektálással. A kontrollsérumok immunizálás előtt, illetve az immunsérumok a marginális vénából, 8-10 nappal az emlékeztető oltások után lettek levéve.

5.2.1.4 *DON* antigénspecifikus tisztított IgG előállítása

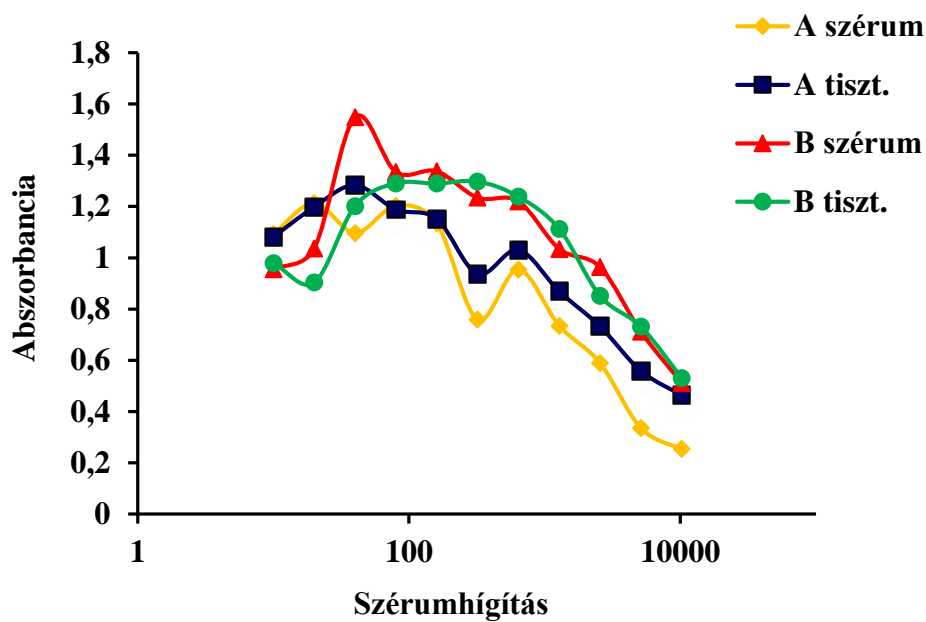
Az immunsérumokat IgG-re tisztítottam Harbo and Ingild (1973) leírata szerint. Első lépésként a nyúlsérumból kisózásos módszerrel tisztított IgG-frakciót állítottam elő. Tíz ml nyers immunsérumhoz lassú kevertetés mellett 10 ml 70%-os ammónium-szulfát oldatot adtam szobahőmérsékleten. A pH-t ammóniával (pH 7,0) állítottam be. A kevertetést két óráig folytattam, majd a szuszpenziót lecentrifugáltam (20 perc, 2500 rpm). A csapadékot 5 ml 0,01 M PBS-ben (pH 7,4) újraoldottam, és 5 ml 70%-os ammónium-szulfát-oldatot adtam hozzá. Ezután a szuszpenziót ismét 2 órán át kevertettem szobahőmérsékleten, centrifugáltam az előbbieket szerint,

és a felülúszót dekantáltam a csapadéktól, mivel a szupernatáns albuminokat, transferrint, γ -mobilitású fehérjéket (pl. haptoglobulin, szabad hemoglobin) is tartalmaz. A specifikus immunglobulinokat is tartalmazó nyúl IgG-frakcióból álló csapadékot 5 ml foszfát pufferben feloldottam és 10 mm×21 mm dializáló zsákba töltöttem. A dialízist 4 °C-on 2×12 óráig kb. 20 térfogatnyi foszfát pufferrel szemben végeztem. A tisztított szérumokat mélyhűtőben tároltam.

5.2.1.5 *DON* specifikus antitestek antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata

A kialakított nyúlserumok antigénnel szembeni aktivitását indirekt ELISA módszerrel vizsgáltam. A polisztirol alapú mikrotiterlemez mérőhelyeit 100 μ l/lyuk 5 μ g/ml DON-OVA tartalmú (0,1 M karbonát-bikarbonát, pH 9,6) oldattal, 4 °C-on egy éjszakán át történő inkubálással érzékenyítettem. A lemezeket háromszor átmostam 250 μ l/lyuk mosópufferrel (0,1 % Tween 20 tartalmú 0,01 M PBS, pH 7,4), majd a szabad kötőhelyeket 200 μ l/lyuk 5 % zselatin tartalmú PBS-ben blokkoltam (37 °C, 1 óra). Az ismételt mosást követően 100 μ l/lyuk DON-OVA ellen nyúlban termeltetett ellenanyagot hígítási sorban lekötöttem. Újabb mosást követően a kialakult immunkomplex detektálására a lemezeket 100 μ l/lyuk torna-peroxidázzal jelölt anti-nyúl kecske IgG konjugátummal inkubáltam (30000-szeres hígításában, 37 °C, 1 óra). Ismételt mosást követően a színekialakítást 100 μ l/lyuk szubsztrát és kromogén tartalmú (OPD/H₂O₂) oldattal történő inkubálással (20 perc, szobahőmérsékleten) végeztem. A reakciót 50 μ l/lyuk 3 M H₂SO₄ oldattal állítottam le. Az optikai denzitás abszorbancia értékeit 490 nm-en automata ELISA fotométerrel mértem.

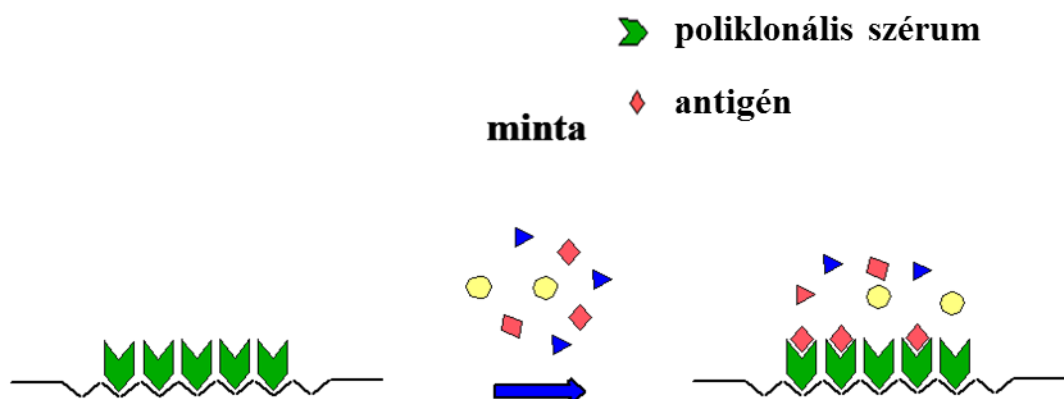
A két nyulból származó szérum fehérje tartalma (A, B) 127.0 mg/ml és 116.2 mg/ml volt, míg a tisztított szérumoké (A tiszt., B tiszt.) 31,8 mg/ml és 39,2 mg/ml volt. A szérumok és az IgG frakciók ELISA-val történő ellenőrzésének titrálási görbéit a 12. ábra mutatja be. Az ellenőrző ELISA mérés alapján a két szérum hasonló eredményt adott, mindkét szérum esetén még a nagy hígításoknál (640-szeres és 1280-szoros) is stabil jelet adott. Ugyanakkor a B szérum nagyobb érzékenységet mutatott, ezért az abból tisztított (B tiszt.) szérummal dolgoztam a továbbiakban.



12. ábra Az anti-DON szérum és az IgG frakciók ellenőrzése indirekt ELISA módszerrel

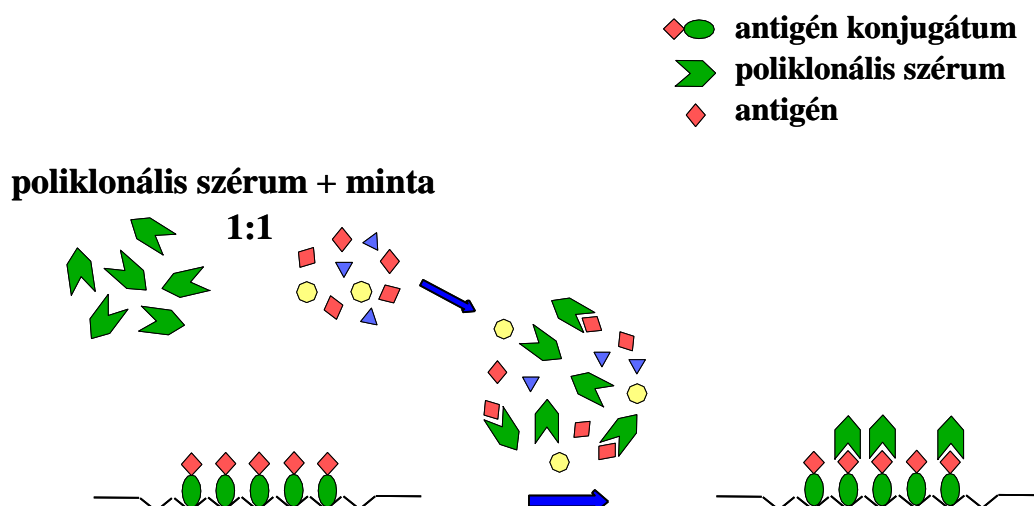
5.2.2 Immunszenzor fejlesztés DON kimutatására

Munkám következő részében az immunszenzorok fejlesztését kezdtem meg az elkészített antitestek segítségével. A szenzorfejlesztésnél két különböző, direkt (nem-kompetitív) illetve indirekt (kompetitív) immunszenzor kialakítását vizsgáltam. A nem-kompetitív vagy “direkt” szenzor (13. ábra) esetében a hullámvezető felületén a nyulakban termeltetett specifikus poliklonális szérum megfelelő hígítású oldatát rögzítettem kovalens kötésekkel, és közvetlenül mértem a kimutatandó vegyületeket tartalmazó standardokra, illetve mintákra adott szenzorválaszok nagyságát.



13. ábra Nem-kompetitív immunszenzor elve

A kompetitív („indirekt”) immunszenzor (14. ábra) kifejlesztése során a vizsgálandó antigén, illetve az antigén fehérjével képzett konjugátuma került rögzítésre. A mérések során a standard oldatokat, illetve mintákat ismert mennyiségű antitestet tartalmazó poliklonális szérummal kevertem össze, meghatározott ideig inkubáltam, majd injektáltam az áralmó rendszerbe. A mérésnél így indirekt úton az antigének által meg nem kötött, szabad antitestek mennyiségét határoztam meg, és ebből a jelből következtettem a minták antigén tartalmára.



14. ábra Kompetitív immunszenzor felépítése

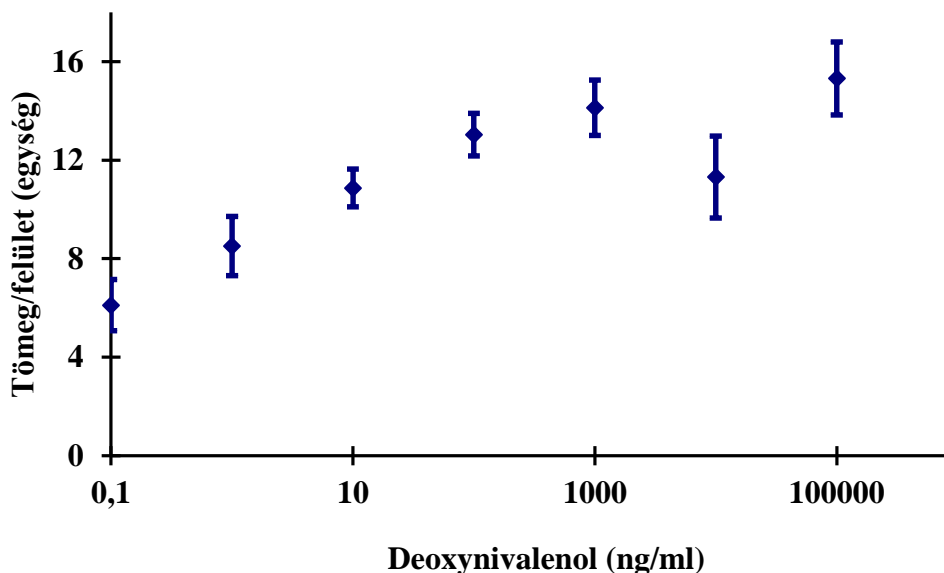
5.2.2.1 Szenzor felületének módosítása és fehérjék immobilizációja

A vizsgálathoz OW2400 típusú integrált optikai hullámvezető szenzort használtam, melynek felületét APTS-sel módosítottam a 4.2.2 fejezetben leírtak szerint. E szenzor felületére rögzítettem kovalensen a direkt immunszenzor kialakításánál a DON ellen termelt antitestet, míg a kompetitív immunszenzor fejlesztésénél a DON-BSA konjugátum került rögzítésre. A biomolekulák rögzítését glutáraldehiddel végeztem a 4.2.4 fejezet alapján.

5.2.2.2 Direkt immunszenzor DON kimutatására

Kísérleteimben DON direkt mérési módszerrel történő kimutatásának lehetőségét vizsgáltam, ahol a szenzor felületére DON specifikus poliklonális szérumot rögzítettem és az antigén (DON) antitesthez való kötődése által indukált válaszjeleket értékeltem. A direkt mérési módszernél az érzékenységet a szenzor felületére rögzített antitest mennyisége határozza meg. Annak érdekében, hogy meghatározzam az immobilizálandó szérum megfelelő mennyiségét, a szenzor felületén különböző koncentrációban rögzítettem a DON specifikus antitestet, és

vizsgáltam a különböző koncentrációjú standardra (0,1-100000 ng/ml) adott válaszjelek nagyságát. A legjobb eredményeket az antitest 8 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban történő rögzítésével értem el. A 15. ábra az így kialakított direkt immunszenzorral felvett kalibrációs görbét mutatja be.



15. ábra DON direkt mérés kalibrációs görbéje (8 $\mu\text{g/ml}$ antitest rögzítésével)

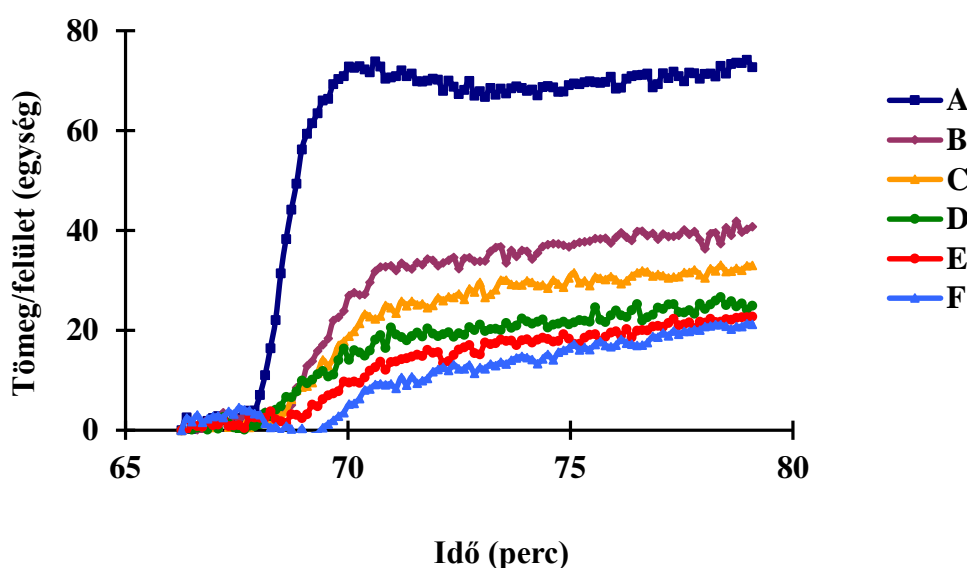
A kalibrációs görbe alapján a DON koncentrációjától függő jeleket csak a 0,1-100 ng/ml koncentrációtartományban kaptam. Nagyobb koncentrációjú DON standardok injektálásával nem kaptam szignifikáns jelnövekedést, mert a felület gyorsan telítődött. A szenzor kis érzékenysége azonban nem meglepő a direkt mérési módszernél, mert a felületre rögzített antitest molekula tömege jóval nagyobb (≈ 180000 Da), mint az analitikumé (DON $\approx 296,32$), így a DON kötődése relatíve kisebb tömegváltozást jelent a szenzor felületén, mint amit az antitest kötődése okozna. Ugyanakkor az evanescens térben egyre csökken az adott tömegre adott jel nagysága, ezért is ilyen kicsik a jelek. Az általam kifejlesztett direkt mérési mód érzékenysége DON kimutatására nem volt megfelelő, ezért az élelmiszerekből történő DON kimutatását nem teszi lehetővé.

5.2.2.3 Kompetitív immunszenzor fejlesztése DON meghatározásra

Aminoszilanizált szenzor felületen DON detektálására alkalmas indirekt immunszenzort fejlesztettem, feltételezve, hogy ezzel az eljárással nagyobb érzékenységet érhetek el, mint a direkt szenzorok esetében. A szenzorok kialakítása során a DON-BSA konjugátumot aminoszilanizált felületen 2,5%-os glutáraldehiddel két lépésben rögzítettem a szenzor felületén. A mintákat illetve standardokat 1:1 arányban kevertem a megfelelő koncentrációjú antitestekkel majd kontrollált körülmények közt inkubáltam és injektáltam a rendszerbe.

5.2.2.3.1 Poliklonális antitest mennyiségének meghatározása

A kompetitív szenzor fejlesztésekor a legfontosabb optimalizálendő paraméterek a szenzorfelületen rögzített DON-BSA konjugátum koncentrációja, valamint az alkalmazott poliklonális szérum hígításának mértéke volt. A kísérletek során, a szenzor felületén 512 ng/ml DON-BSA konjugátumot rögzítettem glutáraldehiddel és a különböző koncentrációban injektált szérumok (63,6 µg/ml, 15,9 µg/ml, 8 µg/ml, 6,4 µg/ml, 3,2 µg/ml, 2,5 µg/ml,) válaszjelét vizsgáltam. A mérés során az áramlási sebesség 120 µl/perc volt, míg a szenzortartó küvetta hőmérsékletét 24,5 °C-on tartosztáltam. Ahogy a 16. ábrán is látható, 3,2 µg/ml, 2,5 µg/ml, koncentrációjú antitest injektálásával a szenzorválaszok közel azonosak, a görbék lefutása bizonytalan. A mért szenzorválaszok $21,46 \pm 0,48$, $18,13 \pm 0,6$, $17,05 \pm 0,89$ egységek voltak. Kis szérumhígítás esetén (63,6 µg/ml) a szérum által adott válaszjel elvág a többi görbétől, túl nagy jelet ad, a szenzorválasz $68,4 \pm 0,8$ egység. Azt a szérumhígítást kell választani, ahol az antitestek éppen telítik a szenzor felületét, a szenzorválasznál már kismértékű lemosódás tapasztalható, a görbének van platója. A görbe alakját és nagyságát figyelembe véve a DON kompetitív méréséhez a továbbiakban 8 µg/ml koncentrációban alkalmaztam a poliklonális szérumot.

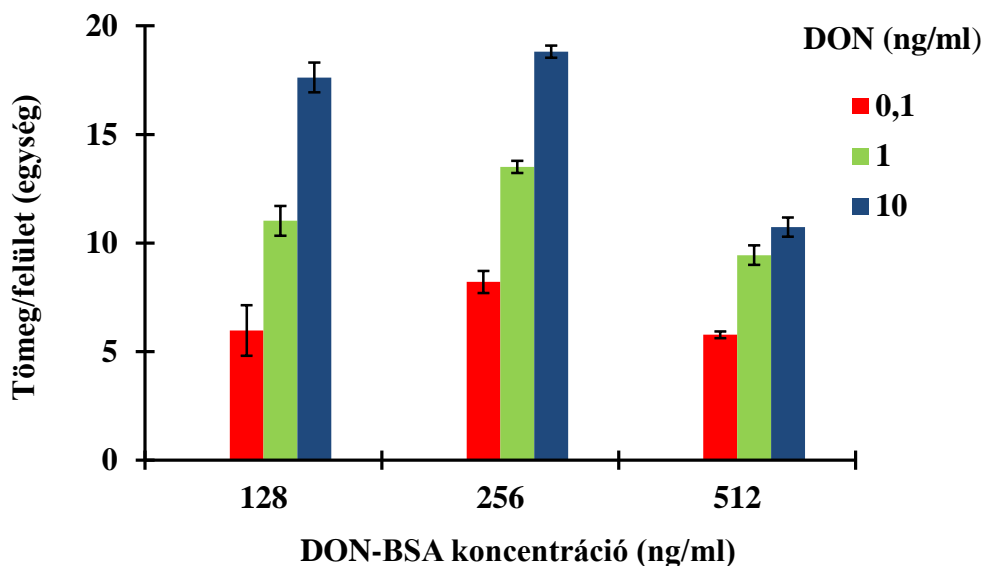


16. ábra Szenzorjelek az anti-DON szérum hígításának függvényében

(512 ng/ml DON-BSA; 120 µl/perc; 24,5 °C; anti-DON koncentráció: A: 63,6 µg/ml, B: 15,9 µg/ml, C: 8,0 µg/ml, D: 6,4 µg/ml, E: 3,2 µg/ml, F: 2,5 µg/ml)

5.2.2.3.2 A rögzített antigén optimális koncentrációjának meghatározása

A szenzor válaszjeleit és érzékenységet nem csak a szérum koncentrációja, de a felületre kovalensen kötött antigén mennyisége is befolyásolja. Annak érdekében, hogy meghatározzam a szenzort borító antigén mennyiségének hatását, az aminoszilanizált szenzor felületére különböző mennyiségben rögzítettem a DON-BSA konjugátumot (128, 256, 512 ng/ml). A vizsgálatban 120 μ l/perc áramlási sebességet alkalmaztam, míg a szenzortartó küvetta hőmérsékletét 24,5 °C-on termosztáltam. A 16 μ g/ml koncentrációjú poliklonális szérumot 1:1 arányban kevertem össze a különböző koncentrációjú DON standardokkal (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) és 3 perc inkubálás után injektáltam a rendszerbe. A szenzor felületén 128 ng/ml DON-BSA konjugátum rögzítésével a standardokra $21,7 \pm 1,2$; $16,7 \pm 1,2$ és $10,1 \pm 0,7$ egység jelet mértem. A 256 ng/ml koncentrációjú konjugátum rögzítése esetén, a jelek ugyan csak enyhén nőttek, de a stabilitásuk javult, szórásuk csökkent ($23,3 \pm 0,7$; $18,0 \pm 0,5$, $12,7 \pm 0,5$ egység). Ugyanakkor 512 ng/ml koncentrációjú konjugátumot rögzítve a jelek ugyan nagyobbak lettek ($29,4 \pm 0,3$; $25,8 \pm 0,2$ és $24,5 \pm 0,2$ egység), azonban a jelek közötti különbségek szignifikánsan csökkentek. A 17. ábra a vakoldathoz (csak antitestet tartalmazó oldat) képest mért jelcsökkenést mutatja be a különböző koncentrációban rögzített DON-BSA konjugátum esetében.



17. ábra DON válaszjelének csökkenése a vakoldathoz képest különböző koncentrációjú DON-BSA konjugátum rögzítése esetén

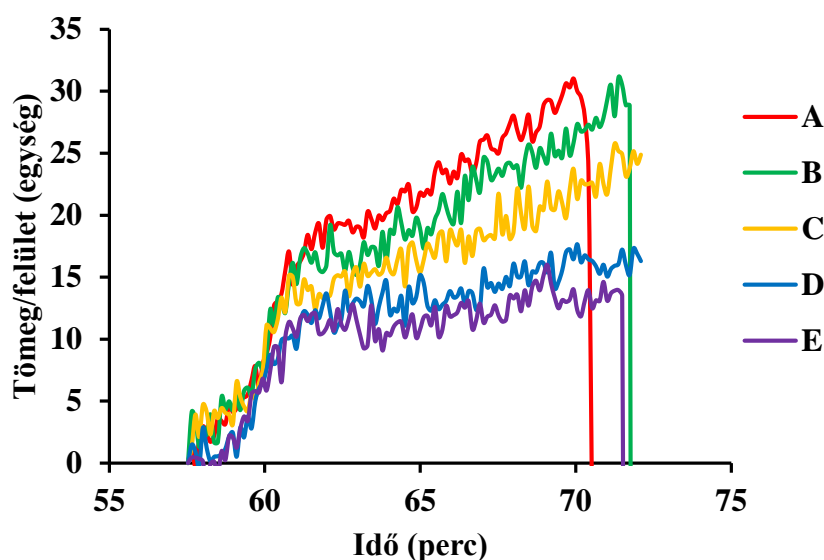
Az eredmények alapján a további mérésekhez 256 ng/ml koncentrációjú DON-BSA-konjugátumot rögzítettem a szenzor felületén.

5.2.2.3.3 Áramlási sebesség hatásának vizsgálata

Vizsgáltam a FIA rendszerben az áramlási sebesség hatását a mérési görbék nagyságára. A rendszerben folyamatosan áramló puffer (TRIS pH 7,4) sebességét egy Gilson Miniplus 3 típusú perisztaltikus pumpával szabályoztam. Az optimális áramlási sebesség meghatározásához a vizsgált áramlási sebességek 0,04 ml/perc, 0,08 ml/perc, 0,12 ml/perc voltak. A vizsgálatban a szenzor felületére 256 ng/ml DON-BSA konjugátumot rögzítettem glutáraldehiddel. Az antitestet 8 µg/ml koncentrációban alkalmaztam. A mérést 20 °C-on termosztálva 1 perc inkubációs idő elteltével végeztem. Mintaként 0; 1,0 és 10 ng/ml tartalmú DON standardot injektáltam, és vizsgáltam a standardok által adott válaszjelek nagyságát. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a 0,12 ml/perc áramlási sebességnél kapok a legnagyobb és leghatározottabb jeleket (az 1 ng/ml DON tartalmú standard $29,07 \pm 0,77$ egységnyi jelet adott). Ha csökkentem az áramlási sebességet a rendszerben, feltehetően a lamináris áramlás hatására a puffer egy álló réteget képez a chip felületén, így a mintában szabadon maradt antitestek nem tudnak megfelelően a chip felületén rögzített antigénhez kötődni, ami megmagyarázza a standardok által adott válaszjelek csökkenését. A 0,08 ml/perc és 0,04 ml/perc áramlási sebességnél az 1 ng/ml DON tartalmú standard válaszjele $22,87 \pm 0,18$ és $22,0 \pm 0,42$ egység volt. Nagyobb áramlási sebességnél pedig a rövidebb tartózkodási idő miatt kevesebb komplex alakulhat ki. A továbbiakban a méréseknél 0,12 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztam.

5.2.2.3.4 Inkubációs hőmérséklet hatásának vizsgálata

A vizsgálat során 256 ng/ml DON-BSA konjugátumot rögzítettem glutáraldehiddel a szenzor felületén, az antitestet 8 µg/ml koncentrációban alkalmaztam, a mérést 1 perc inkubációs idő elteltével végeztem 0,12 ml/perc áramlási sebesség mellett. Mintaként 0, 1 és 10 ng/ml tartalmú DON standardot injektáltam. Mérés során mind a mintát, mind a szenzort ugyanazon a hőmérsékleten termosztáltam. Vizsgáltam a 20, 22, 25, 28, 33, 38 °C –on történő inkubálás hatását (18. ábra). Az ábrán a 0 ng/ml DON standardot tartalmazó minta különböző hőmérsékleten történő inkubálását követően felvett válaszjelei láthatók. Megállapítottam, hogy a hőmérséklet emelésével az egyes standardok által adott válaszjelek nagysága csökken. Legnagyobb jeleket 20 °C-on történő inkubálással értem el.



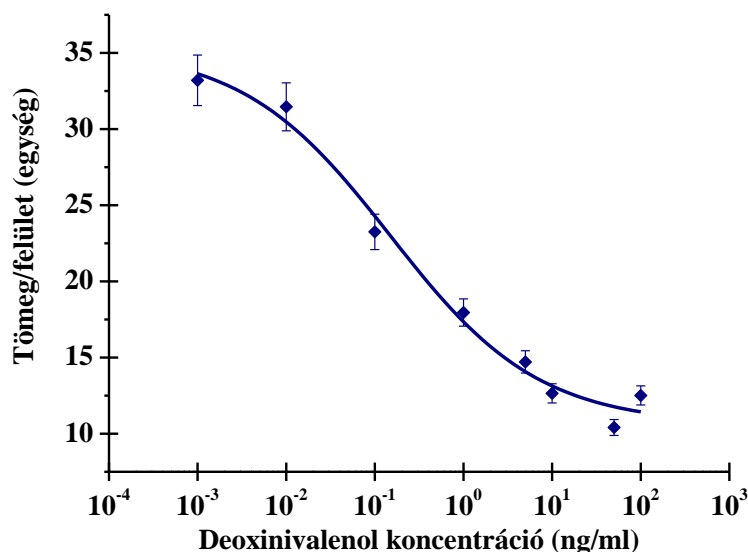
18. ábra Inkubációs hőmérséklet válaszijelre gyakorolt hatása. (512 ng/ml DON-BSA; 0,12 ml/perc; A: 20 °C, B: 22 °C, C: 25 °C, D: 28 °C, E: 38 °C)

5.2.2.3.5 Inkubációs idő hatásának vizsgálata

A vizsgálathoz 256 ng/ml DON-BSA konjugátumot rögzítettem glutáraldehiddel a szenzor felületén, az antitestet 8 μ g/ml koncentrációban alkalmaztam. A méréseket a minta 20 °C-on történő termosztálásával és 0,12 ml/perc áramlási sebesség alkalmazása mellett végeztem. Mintaként 0, 1, 10 ng/ml DON tartalmú standardot alkalmaztam. Vizsgáltam a 0, 1, 3 percig történő inkubálás mérésre gyakorolt hatását. Vizsgálataimból megállapítottam, hogy inkubálás nélkül a standardokra kapott jelek igen nagyok ($22,33 \pm 0,82$; $19,88 \pm 0,63$; $21,66 \pm 1,20$ egység), azonban a koncentrációval nem arányosak. Ez azért van, mert nincs idő arra, hogy a mintában lévő antitest az antigénnel kapcsolódjon, így sok nem kötött antitest marad a mintában, ami nagy jelet ad, de nem reprezentálja a mintában lévő antigén mennyiséget. Vizsgálatomban a standardokra 3 perces inkubálásnál már a koncentrációval arányos jeleket kaptam ($16,97 \pm 0,54$; $12,80 \pm 0,77$; $11,16 \pm 0,11$ egység). A további kísérleteim során ezért 3 percig történő inkubálást alkalmaztam.

5.2.2.3.6 DON meghatározására alkalmas immunszenzor statisztikai paraméterei

A DON vizsgálatára alkalmas immunszenzor működési paramétereinek meghatározása után kalibrációs görbét készítettem 0,001-100 ng/ml koncentráció tartományban. A szenzor felületén 256 ng/ml DON-BSA konjugátumot rögzítettem. A standard oldatokat, amelyek különböző koncentrációban tartalmazzák az antigént (0,001-100 ng/ml) 8 μ g/ml koncentrációjú antitest oldattal 1:1 arányban kevertem össze és 3 percig történő inkubálást követően injektáltam a rendszerbe. Meghatároztam a kalibrációs görbe dinamikus mérési tartományát (19. ábra).

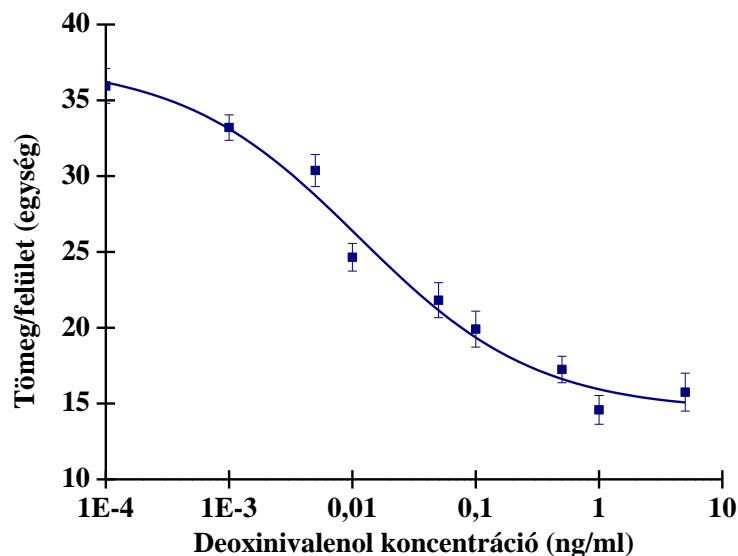


19. ábra DON indirekt mérésének kalibrációs görbéje (256 ng/ml DON-BSA, 8,0 µg/ml antitest, statisztikai paraméterek: χ^2 /szabadsági fok= 1,57; $r^2 = 0,99$; IC₅₀ értéke 0,15±0,08 ng/ml)

Az eredményeim alapján az indirekt mérési elven működő jelölésmentes immunszenzor dinamikus méréstartománya 0,01-50 ng/ml DON, a LOD 0,001 ng/ml, míg a gátlási középérték (IC₅₀) 0,15±0,08 ng/ml volt. Ez a méréstartomány két nagyságrenddel kisebb, mint a direkt szenzor esetében, és közel egy nagyságrenddel kisebb, mint ami a hasonló immunszenzorokkal elérhető SPR detektálással (Mak *et al.*, 2010; Actis *et al.*, 2010).

5.2.2.3.7 Valós minták mátrixhatása

GC-MS technikával igazoltan DON-mentes búzalisztet mesterségesen szennyeztem különböző koncentrációban (0,005; 0,001; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10 és 50 mg/kg) DON-nal a 4.3.1. fejezetben leírtak szerint. A szűrleteket 42 mM-os pH 7,4-es TRIS pufferrel hígítottam és 1000-szeres 10000-szeres és 100000-szeres végső hígításban vizsgáltam a minták által adott válaszjeleket. A FIA rendszerben áramló pufferként acetonitril:víz 6:4 arányú keverékét tartalmazó TRIS-t használtam, ahol a puffer az oldószert ugyan olyan koncentrációban tartalmazta, mint a hígított minta. Megállapítottam, hogy 1000-szeres hígítást alkalmazva a nagy mátrixhatás miatt kicsi volt az egyes minták közötti jelek különbsége. A 100000-szeresen hígított mintáknál bár alig van mátrixhatás, a jelek kicsik, a vizsgált méréstartományban már nem volt megfelelően érzékeny a szenzor. A 10000-szeres hígításnál a mátrixhatás nem zavarta a mérést, ugyanakkor a jelek megfelelően stabilak és reprodukálhatóak voltak. A továbbiakban tehát a valós mintákat 10000-szeres hígításban vizsgáltam. A DON-nal szennyezett mintákkal nyert kalibrációs görbét a 20. ábra mutatja be.



20. ábra DON-nal mesterségesen szennyezett búzaminták kalibrációs görbéje (256 ng/ml DON-BSA; 8,0 µg/ml antitest, statisztikai paraméterek: χ^2 /szabadság fok= 1,90; $r^2 = 0,98$)

A lineáris méréstartomány a liszt mintára számolva 0,005-50 mg/kg volt, míg az IC_{50} értéke $0,13 \pm 0,04$ mg/kg értékűnek adódott, ami megfelel a követelményeknek (200 µg/kg csecsemőknek és kisgyermekeknek szánt gabona alapú feldolgozott élelmiszerek esetén, 1750 µg/kg feldolgozatlan durumliszt, kukorica, zab esetén és 1250 µg/kg más feldolgozatlan gabona esetén, 700 µg/kg tésztáknál, 500 µg/kg kenyér és cereália alapú élelmiszerek esetén (Commission Regulation (EC) No 1881/2006).

5.2.2.3.8 *Biológiai minták vizsgálata*

Biológiai minták vizsgálatát a kialakított kompetitív szenzorral végeztem. „Ismeretlen” mintaként GC-MS technikával igazoltan DON-mentes búzalisztet szennyeztem különböző koncentrációban DON-nal a 4.3.1. fejezetben leírtak szerint. A mintákat 10000-szeres hígításban vizsgáltam. A minták méréséhez a kalibrációt az 5.2.2.3.7. fejezetben leírtak szerint vettem fel, majd vizsgáltam az „ismeretlen minták” válaszjeleit és meghatároztam a visszanyerés %-át. A 3. táblázatban az „ismeretlen” minták mérési és visszanyerési eredményeit foglaltam össze.

3. táblázat: DON visszanyerés eredményei búzaliszt mintákból

Hozzáadott DON (mg/kg)	Mért DON (mg/kg)	Visszanyerés (%)
0,005	0,006±0,002	123,0
0,01	0,011±0,004	114,0
0,05	0,05±0,01	92,0
0,1	0,11±0,02	108,2
0,5	0,47±0,05	94,5
1,0	1,1±0,1	109,3
5,0	04,7±1,3	93,1
10,0	11,0±1,0	111,0
50,0	46,0±4,3	91,6

Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a búzalisztból a DON mikotoxint a minta-előkészítés során 91,6-123,0%-ban nyertem vissza, a minta-előkészítés és az immunszenzorral végzett meghatározás megfelelt a követelményeknek.

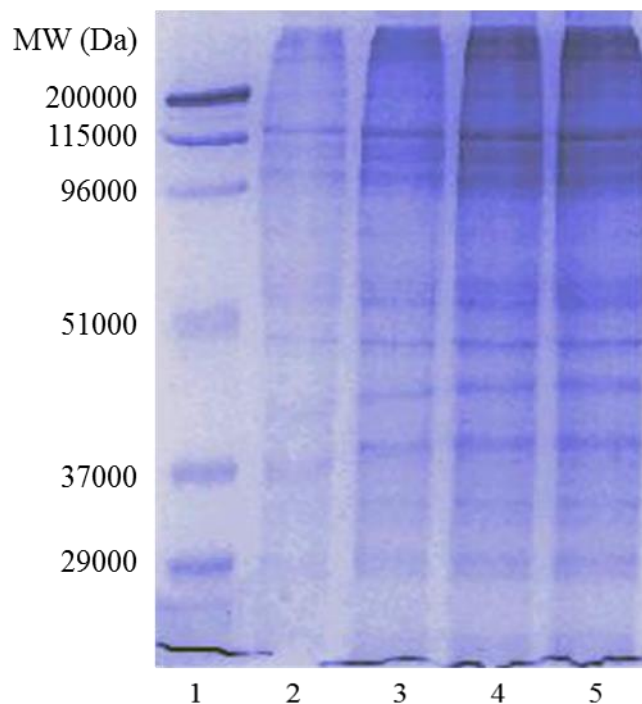
5.3 Immunszenzor fejlesztés vitellogenin meghatározásra

5.3.1 A szenzorfejlesztéshez szükséges immunanyagok előállítása

Irodalmi adatok alapján (Hara *et al.*, 2007; Vincent 2001; Volz and Chandler 2004; Holbech *et al.*, 2001) a vitellogenin (Vtg) és lipovitelin (Lpv) fehérje ugyanazon fajban 95%-os keresztreakciót mutat egymással. Mivel a Lpv izolálása lényegesen egyszerűbb, ezért ezt alkalmaztam immunogénként / antigénként a Vtg immunszenzorok fejlesztéséhez. A lipovitellinek tisztítása nőstény ponty illetve vöröshasú unkából a 4.2.6. fejezetben ismertett módszer szerint történt. A tisztított Lpv fehérjével magyar vadas óriásnyúlban történő immunizálással poliklonális antitestet állítottam elő.

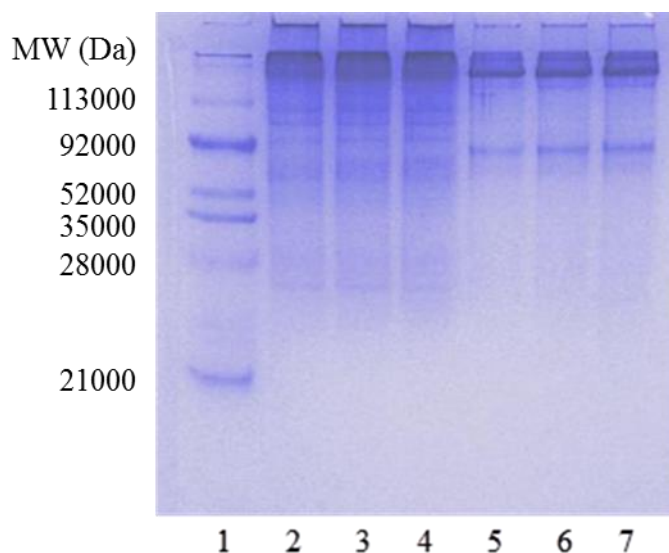
5.3.1.1 Lipovitellin fehérjefrakciók ellenőrzése SDS-PAGE vizsgálattal

A Lpv-preparátumok tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltam (21. ábra) a 4.2.8. fejezetben leírt módszer szerint. A gélképek alapján a ponty-Lpv vizsgálatakor 110000-120000, 96000 és 85000 Da fehérjefrakciókat különböztettem meg, míg a béka-Lpv-preparátum esetében 170000 és 98000 Da frakciókat kaptam. A ponty-Lpv fehérjefrakcióira kapott eredmények megegyeznek a Hara és mtsai (2007) által publikált adatokkal (113000 és 96000 Da).



21. ábra: Ponty eredetű Lpv fehérjefrakciók vizsgálata SDS-PAGE módszerrel (1: molekula standard, 2: 2,5 µl lipovitellin, 3: 5 µl lipovitellin, 4: 8 µl lipovitellin, 5: 10 µl lipovitellin)

Összehasonlítottam a ponty illetve béka Lpv futtatási mintázatát SDS-PAGE módszerrel, melyet a 22. ábra szemléltet.



22. ábra Ponty és béka lipovitellin összehasonlítása SDS PAGE-val (1: molekula standard, 2: 8 µl ponty lipovitellin, 3: 10 µl ponty lipovitellin, 4: 12 µl ponty lipovitellin, 5: 8 µl béka lipovitellin, 6: 10 µl béka lipovitellin, 7: 12 µl béka lipovitellin)

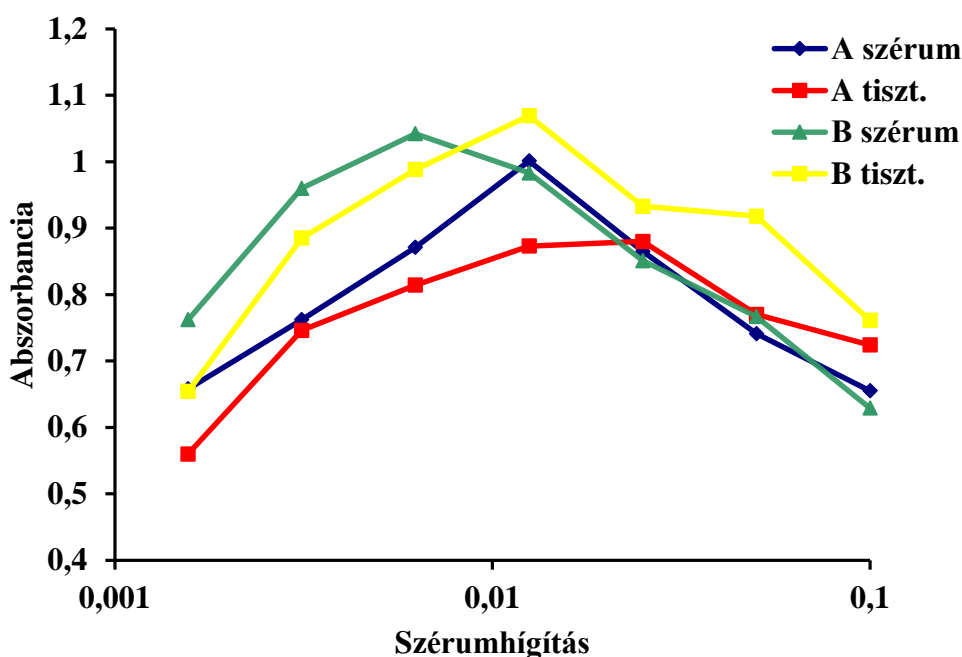
A gélek alapján megállapítható, hogy a pontyból és a békából tisztított lipovitellin különbözik egymástól, a lipovitellin fajspecifikus fehérje. A béka és ponty lipovitellin preparátumok alkalmasak az immunizálás elvégzésére.

5.3.1.2 Ponty és béka lipovitellin specifikus poliklonális antitest előállítása

Ponty és béka Lpv ellen specifikus poliklonális antitesteket termeltettem magyar vadas óriásnyúlban történő immunizálással Harboe és Inglid (1973) módszerét követve. Mindkét esetben az immunizáláshoz a tisztított Lpv frakciókat alkalmaztam. A homogenizált Lpv-preparátumoldatokból 1 ml térfogatnyit centrifugáltam, majd a fehérjét 0,2 mol/l NaCl-oldatban visszaoldottam, úgy hogy 1 mg/ml oldatot kapjak. Ezekkel az antigénoldatokkal immunizáltam nyulakat a 5.2.1.3. fejezetben ismertetett eljárással, majd IgG-re tisztítottam a szérumokat (lsd. 5.2.1.4. fejezet).

5.3.1.3 Ponty lipovitellin specifikus antitest antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata

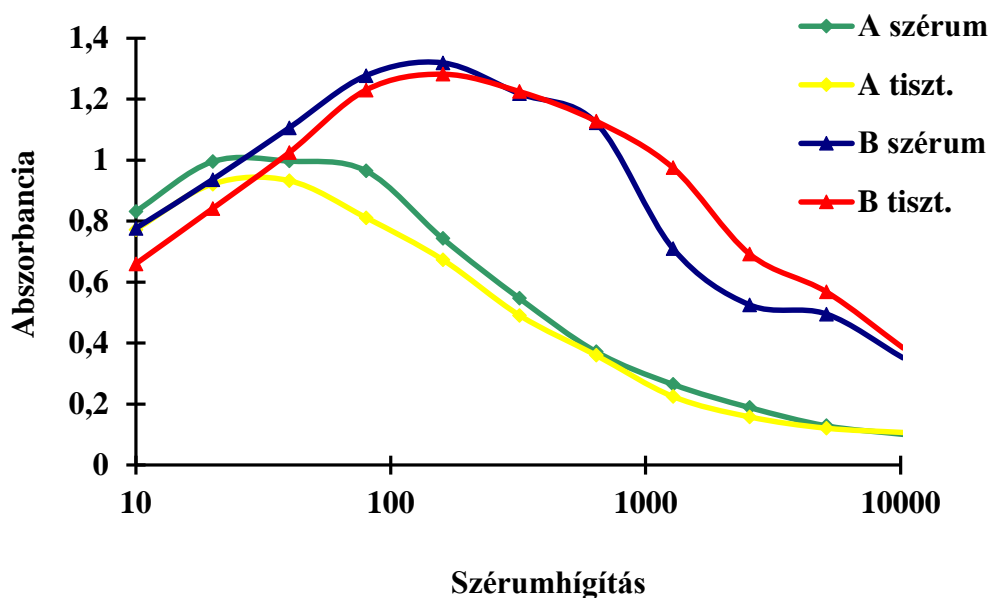
A nyulak immunizálásával nyert ponty Lpv specifikus antitestet tartalmazó szérumot ELISA rendszerrel vizsgáltam az 5.2.1.5. fejezetben leírtak alapján. Az eredmények alapján (23. ábra) megállapítottam, hogy a két nyúlból származó szérum aktivitása ugyan eltér egymástól, de mindkét nyúlból származó szérum és tisztított IgG is alkalmas a szenzorfejlesztésre. A legnagyobb aktivitást a B szérum és az abból előállított tisztított szérum mutatta, ezért a továbbiakban ezt használtam a szenzor kialakításához. A kiválasztott szérum összes fehérjetartalma 43 mg/ml értékűnek adódott.



23. ábra Ponty lipovitellin specifikus szérum és a tisztított IgG frakciók ellenőrzése direkt ELISA módszerrel

5.3.1.4 Béka lipovitellin specifikus antitest antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálata

A szérumok jellemzésére a nyers szérum mintát és a tisztított szérumot használtam fel. Az eredmények alapján (24. ábra) megállapítottam, hogy a B nyúlból származó szérum illetve abból előállított tisztított IgG aktivitása a nagyobb, azonban az A nyúlból származó szérum is alkalmas a vitellogenin meghatározására. A tisztított B szérum összes fehérjetartalma 17,6 mg/ml volt.

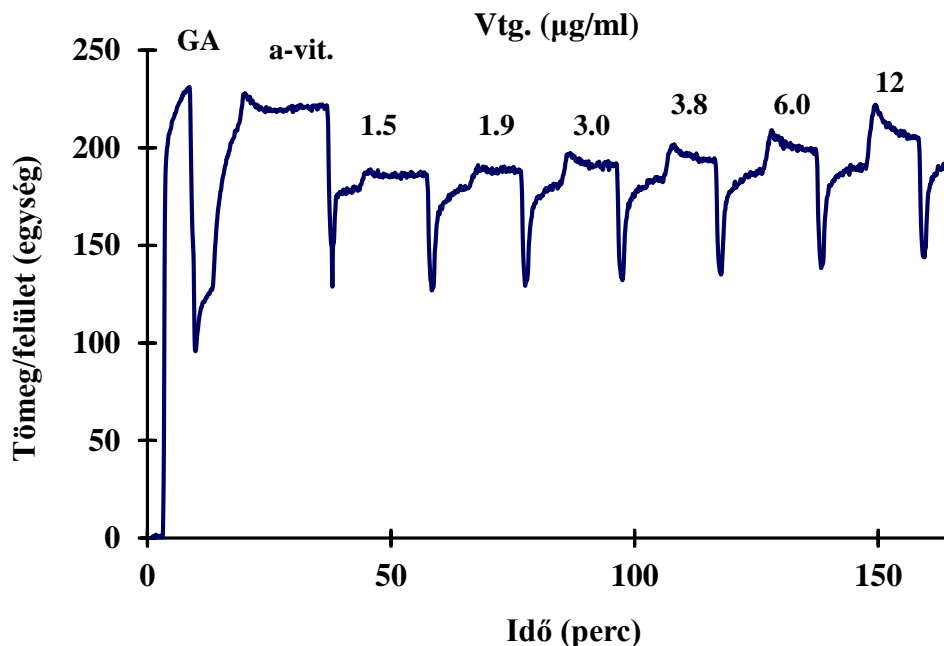


24. ábra: Béka lipovitellin specifikus szérum és a tisztított IgG frakciók ellenőrzése direkt ELISA módszerrel

5.3.2 Immunszenzor fejlesztése ponty vitellogenin kimutatásra

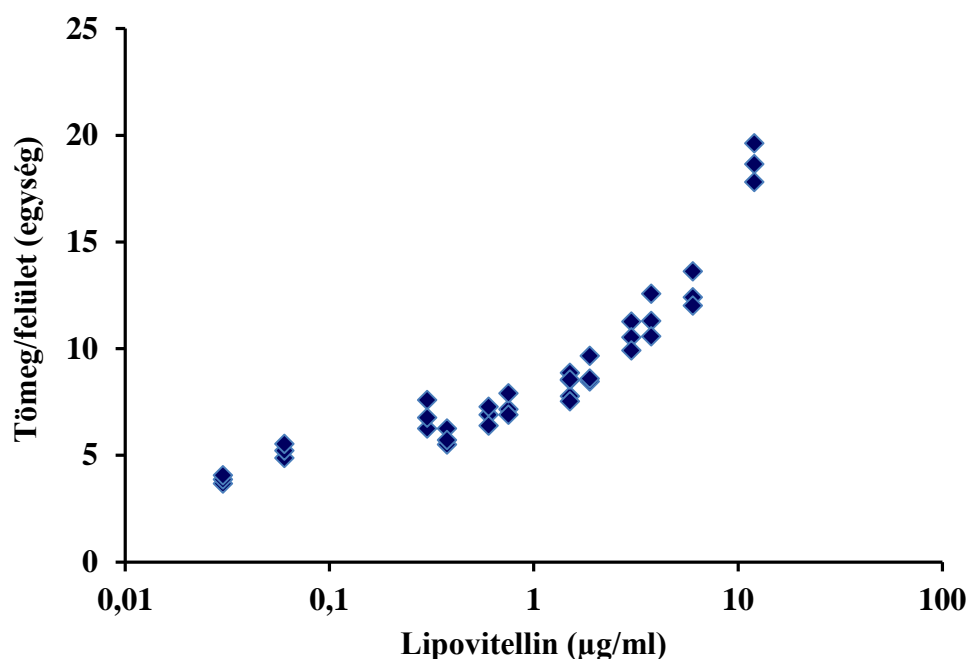
5.3.2.1 Direkt mérési módszer ponty vitellogenin mérésére

A kísérletekhez aminoszilanizált hullámvezető szenzort használtam, melynek felületére a direkt szenzor esetén ponty Lpv ellen termeltetett antitest került rögzítésre kovalens kötással. Az érzékenyítés során a felület aminocsoportjait 200 μ l, desztillált vízben hígított, 2,5 %-os glutáraldehid oldattal aktiváltam. Ezt követően a felületet desztillált vízzel mostam, majd az áramló közeget 42 mM-os pH 7,4-es TRIS pufferre cseréltem. Mosást követően a felületre 43 μ g/ml poliklonális szérumot adagoltam. A felületen meg nem kötött anyagok lemosásához, illetve az egyes minták mérése után a szenzor regenerálásához 200 μ l 10 mM-os sósavoldatot alkalmaztam. A 25. ábrán a glutáraldehiddel történő immobilizáció egyes lépéseire adott szenzorválasz, illetve a szenzor felületére különböző koncentrációban (1,5; 1,9; 3,0; 3,8; 6,0; 12 μ g/ml) adagolt Lpv antigén specifikus kötődéséből adódó szenzorjelek láthatók. A szenzorjel nagyságának növekedése egyenes arányban áll az alkalmazott Lpv koncentráció növekedésével.



25. ábra Anti-Lpv (43 $\mu\text{g/ml}$) immobilizációja és a különböző koncentrációjú Lpv standardok (1,5-12 $\mu\text{g/ml}$) által adott szenzorválaszok (42 mM-os pH 7,4 TRIS puffer, 0,08 ml/perc áramlási sebesség)

A direkt vagy nem-kompetitív immunszenzorok fejlesztésekor elsősorban a hullámvezető felületén rögzített poliklonális vitellogenin-specifikus szérum minősége és mennyisége (hígítása) az érzékenységet meghatározó tényező. Annak érdekében, hogy megtaláljam a rögzítendő antitest megfelelő koncentrációját különböző hígításban (215, 86, 43, 21,5 és 8,6 $\mu\text{g/ml}$) rögzítettem a szérumot az aminoszilanizált szenzor felületén és vizsgáltam a vitellogenin standardokra adott válaszjel nagyságát. Ha a szenzor felületén kis hígításban (215 $\mu\text{g/ml}$ és 86 $\mu\text{g/ml}$) rögzítettem a poliklonális szérumot, nagyon sok antitest rögzült a felszínen, vastag, feltehetően nem monomolekuláris réteget kaptam, és a Lpv standardra kapott válaszjelek viszonylag kicsik voltak (a 12 $\mu\text{g/ml}$ Lpv standard $11,45 \pm 0,38$ egységnyi jelet adott). Ha híg volt a rögzített antitest oldat (21,5 és 8,6 $\mu\text{g/ml}$), akkor ugyan érzékenyebb volt a szenzor, a korábbiakhoz képest nagyobb válaszjeleket kaptam, azonban a szenzorral csak néhány mérést lehetett elvégezni, gyorsan kimerült. A vizsgálataim során a 43 $\mu\text{g/ml}$ (1:1000 hígított) szérum glutáraldehiddel való rögzítése esetén kaptam a legjobb eredményeket. A 26. ábrán a direkt szenzor kalibrációs görbéje látható.



26. ábra Direkt immunszenzor kalibrációs görbéje 43 µg/ml szérum rögzítése esetén

A mérés dinamikus tartománya 0,6 és 12 µg/ml közt volt standard oldatok esetén. A standard oldatokra adott szenzorválasz $5,22 \pm 0,45$ -től $18,71 \pm 0,9$ egység közt változott a koncentrációnak megfelelően. A Lpv kimutatási határa 0,3 µg/ml volt. Ezen adatok alapján a direkt OWLS mérési módszer nem megfelelő pontyt Vtg tartalmának meghatározására, ezért vizsgáltam a kompetitív mérési rendszer kialakításának lehetőségét az érzékenység növelésének érdekében.

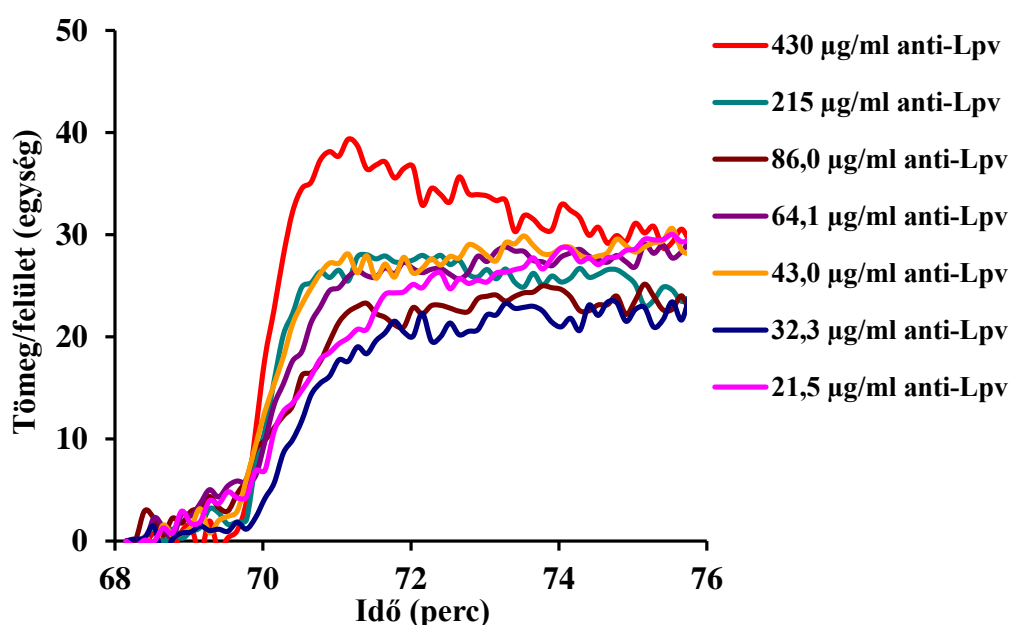
5.3.2.2 Kompetitív immunszenzor kifejlesztése ponty Vtg meghatározásra

Kompetitív mérési elrendezésben az aminoszilanizát szenzor felületére kovalens kötéssel (2,5%-os glutáraldehiddel) a tisztított Lpv megfelelő koncentrációban került rögzítésre. A standardokat, illetve a mintákat 1:1 arányban kevertem össze meghatározott koncentrációjú poliklonális szérummal, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltam majd injektáltam az áramló rendszerbe. A mérés során, az inkubáció alatt nem kötődött, szabadon maradt antitestek a szenzor felületére rögzített antigénhez kötődnek, így a szenzor felületére kötődött antitestek mennyisége fordítottan arányos a minta antigén tartalmával.

5.3.2.2.1 Alkalmazott poliklonális antitest koncentrációjának meghatározása

Kompetitív szenzor kialakítása esetén az alkalmazott poliklonális szérum mennyiségének meghatározása az egyik legfontosabb paraméter. A kísérletben az aminoszilanizált szenzor felületére 2,5%-os glutáraldehiddel 5 µg/ml ponty Lpv-t rögzítettem, és vizsgáltam a különböző koncentrációjú (430; 215; 86; 64,1; 43; 32,3; 21,5 µg/ml anti-Lpv) poliklonális szérumra adott válaszjel nagyságát. A szenzor kialakításához mindig azt az alkalmazott antitest koncentrációt kell

választani, ami éppen telíti a szenzor felületét. Abban az esetben, ha kis antitest koncentrációt (21,5 és 43,0 $\mu\text{g/ml}$ anti-Lpv) alkalmaztam, a szenzor érzékenysége megnőtt, ugyanakkor kicsi, nem stabil szenzorválaszokat ($9,82 \pm 0,35$ és $22,69 \pm 0,46$ egység) kaptam. Ha a méréseknél túl nagy koncentrációban használtam az antitestet (215 és 430 $\mu\text{g/ml}$ anti-Lpv) akkor a szenzorválasz nagysága megnőtt ($44,89 \pm 1,39$ és $46,96 \pm 0,44$ egység), de az érzékenység jelentősen lecsökkent, mivel sok antitest molekula maradt szabadon kis koncentrációjú standardok esetében. A mérési görbéket a 27. ábra mutatja be. Megfelelő eredményeket 64,1 és 86 $\mu\text{g/ml}$ szérumszám alkalmazásával értem el, ahol szenzorjelként $28,83 \pm 0,76$ és $27,34 \pm 0,83$ egységet kaptam. A további vizsgálatokhoz a 64,1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú szérumszámot alkalmaztam ponty Lpv meghatározásához.



27. ábra Optimális antitestkoncentráció meghatározása kompetitív OWLS méréshez
(immobilizált Lpv koncentráció $5 \mu\text{g/ml}$)

5.3.2.2.2 A rögzített antigén koncentráció meghatározása

A vizsgálatban a ponty Lpv antigént különböző mennyiségben (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$) rögzítettem a szenzor felszínére, és vizsgáltam a szérumszám hígított oldatára (64,1 $\mu\text{g/ml}$) adott válaszjel nagyságát. Abban az esetben, ha kis mennyiségben rögzítettem a felszínen az antigént (1 $\mu\text{g/ml}$) szűk mérési tartományt, kicsi ($12,87 \pm 0,54$ egység), nem stabil válaszjeleket kaptam, hisz csak nagyon kevés antitest molekula tud kötődni. Ugyanakkor, ha túl sok fehérjét rögzítettem (10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$), nem kaptam arányosan nagyobb jeleket ($18,57 \pm 0,63$ és $17,85 \pm 0,81$ egység) feltehetően a sztérikus gátlás miatt. A legjobb eredményeket 3 és 5 $\mu\text{g/ml}$ Lpv rögzítésével értem el. Ekkor a válaszjelek nagysága

28,83±0,76 egység, illetve 29,67±0,79 egység volt. Kísérleteim további részében 5 µg/ml koncentrációjú Lpv oldattal érzékenyítettem a szenzor felületét.

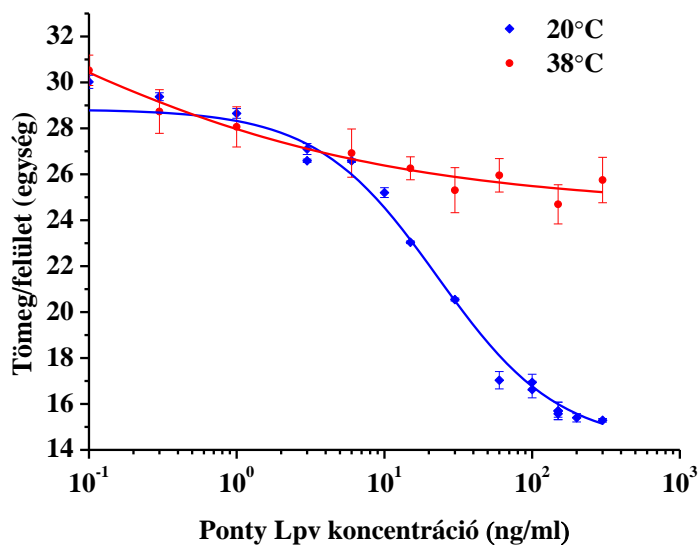
5.3.2.2.3 Az áramlási sebesség hatása

Vizsgáltam a FIA rendszerben az áramlási sebesség hatását a mérési görbék nagyságára. A rendszerben folyamatosan áramló puffer (TRIS pH 7,4) sebességét egy Gilson Miniplus 3 típusú perisztaltikus pumpával szabályoztam. A vizsgálat során a szenzor felületére 5 µg/ml Lpv oldatot rögzítettem glutáraldehiddel. Az antitestet 64,1 µg/ml koncentrációban alkalmaztam és vizsgáltam a standardok által adott válaszjelek nagyságát. Az optimális áramlási sebesség meghatározásához a vizsgált áramlási sebességek 0,04 ml/perc, 0,08 ml/perc, 0,12 ml/perc, 0,16 ml/perc, 0,20 ml/perc valamint 0,24 ml/perc voltak. Kísérleteim alapján megállapítottam, hogy kis áramlási sebesség mellett, a lassabb áramlás következtében, ugyan nő a minta tartózkodási ideje a mérőcellában, azonban a görbék elnyúltak, lassan áll be az egyensúlyi állapot az áramlási viszonyok miatt. Ha túl gyors az áramlás, akkor a tartózkodási idő kicsi, nincs megfelelő lehetőség a kötések kialakítására, nagyon kevés molekula kötődhet, ami kicsi jeleket eredményez. A továbbiakban a mérésekhez 0,08 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztam.

5.3.2.2.4 Az inkubáció hatása a mérésre

A kompetitív mérések során a megfelelően hígított szérum oldatot összekevertem a standard vagy a minta oldattal, megfelelő ideig inkubáltam és a cellába injektálva mértem a szabadon marad antitestek mennyiségét. A vizsgálatához a szenzor felületét 5 µg/ml ponty Lpv-el érzékenyítettem. Az áramlási sebesség 0,08 ml/ perc volt. Az antitestet 64,1 µg/ml koncentrációban alkalmaztam, míg a Lpv standardokat 0,1-200 ng/ml koncentráció tartományban vizsgáltam. A szérumot és standardot összekeverve, majd különböző ideig inkubálva (0-5 perc) vizsgáltam az inkubálási idő hatását a jelekre. Megállapítottam, hogy az inkubációs idő növelésével egészen a 3 percig a szenzorválaszok szignifikánsan növekedtek, három perc felett a hosszabb inkubálási idő már nem befolyásolta a jelek nagyságát.

Vizsgáltam az inkubáció hőmérsékletének hatását is a jelekre. A kísérletet 20, 24, 30, 35 és 38 °C-on végeztem. Az inkubálás körülményeit vizsgálva megállapítottam, hogy a hőmérséklet növelése nem segíti elő az immunkomplex képződését, inkább gátolja azt. A szobahőmérsékleten végzett mérés során nagyobb a mért jelek közötti különbség a 3-300 ng/ml Lpv méréstartományban, mint 38 °C-on termosztálva. A 28. ábrán a két szélsőértéken történő mérést mutatom be, a különbség kiemelése érdekében.

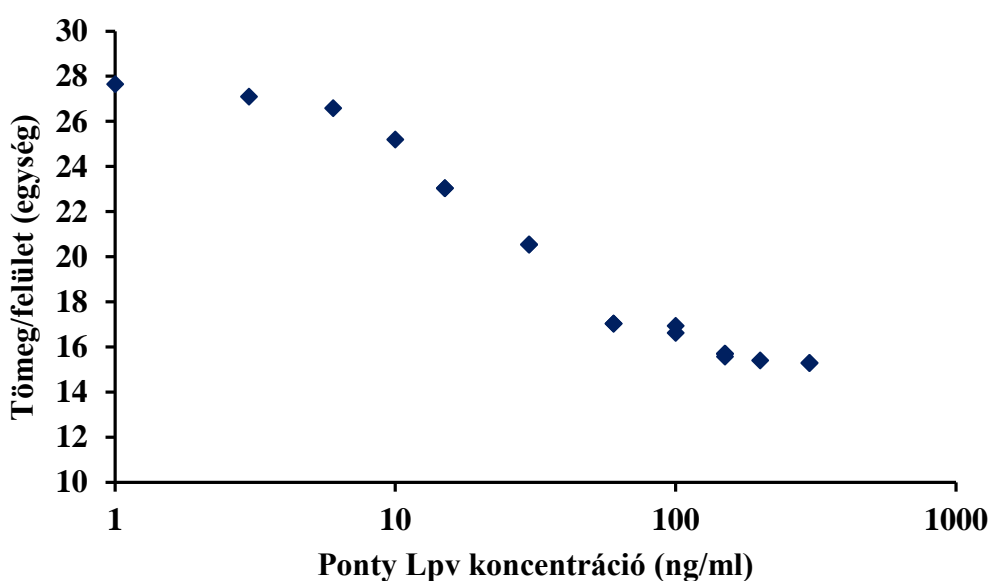


28. ábra Indirekt OWLS szenzorral készített kalibrációs görbék különböző hőmérsékleten

A 30, 60 és 150 ng/ml Lpv-standardokat 20 °C-on inkubálva, a referencia antitest jeléhez képest $7,33 \pm 0,06$, $10,84 \pm 0,03$ és $12,18 \pm 0,04$ egység csökkenést mértem, míg ezeket a mintákat 38 °C-on inkubálva a jelcsökkenésre $5,22 \pm 0,76$, $4,57 \pm 0,48$ valamint $5,84 \pm 0,85$ egységet kaptam. A továbbiakban 20 °C-on végeztem a minták inkubálását.

5.3.2.2.5 Dinamikus méréstartomány meghatározása

Az optimális mérési paraméterek alkalmazásával kalibrációs görbét készítettem ponty-Lpv fehérjére 0,3-300 ng/ml méréstartományban. A 29. ábra az így felvett kalibrációs görbét mutatja be.

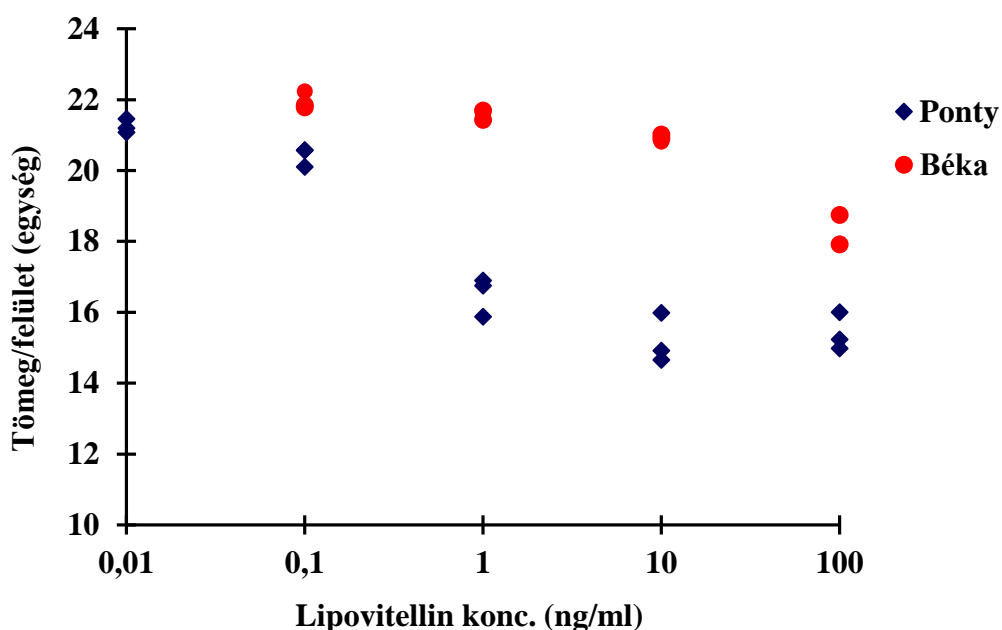


29. ábra Ponty Lpv kalibrációs görbéje indirekt OWLS szenzorral

Kompetitív mérési módszert alkalmazva a dinamikus méréstartomány 3 és 150 ng/ml Lpv között volt. A szigmoid görbe alapján a gátlási középérték (IC_{50}) értéke $21,18 \pm 2,86$ ng/ml, a görbe meredeksége $0,99 \pm 0,12$ értékűnek adódott, a kimutatás alsó határa pedig 0,7 ng/ml volt. A versengő mérés érzékenysége 2 nagyságrenddel kisebb volt, mint a direkt módszerrel mérve.

5.3.2.2.6 Ponty lipovitellin antitest szubsztrát-specifitása

Vizsgáltam a ponty lipovitellin ellen termeltetett antitestek szubsztrát-specifitását. A szenzor felületén ponty Lpv-t rögzítettem, az antitestet 64,1 μ g/ml koncentrációban alkalmaztam. A ponty-Lpv fehérjével érzékenyített immunszenzorral összehasonlítottam, hogy 0,1; 1,0; 10 és 100 ng/ml ponty- illetve béka-Lpv fehérjét tartalmazó oldatok mekkora jelcsökkenést okoznak. Ponty Lpv esetén a szenzor jel fordítottan arányos volt az antigénkoncentrációval, míg béka Lpv esetén a szenzorválasz közel azonos maradt egészen 10 ng/ml koncentrációig, és csak ez után kezdett csökkenni a jel, de még így sem érte el az 50%-os gátlást 100 ng/ml koncentrációnál (30. ábra). A vizsgálat során a pontyminták hatására $1,25 \pm 0,41$, $6,63 \pm 0,15$ és $9,69 \pm 0,28$ egység csökkenést mértem, addig a különböző koncentrációjú béka-Lpv fehérjét tartalmazó oldatok esetében lényegesen kisebb, $0,27 \pm 0,36$, $0,83 \pm 0,20$ és $1,84 \pm 0,15$ egység csökkenést észleltem. A mérés alapján megállapítható, hogy a ponty-Lpv szelektíven mérhető a kifejlesztett OWLS immunszenzorral.

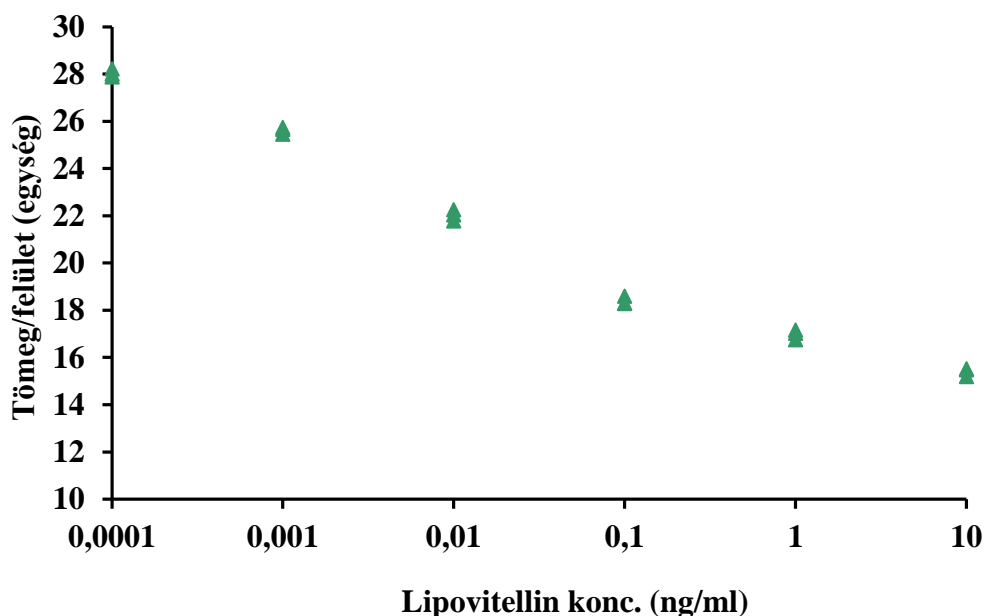


30. ábra Ponty-anti-Lpv szelektivitásának meghatározására készített kalibrációs görbe (5 μ g/ml Lpv rögzítve, 64,1 μ g/ml antitest)

5.3.2.2.7 A ponty minták mátrixhatása, Vtg meghatározása biológiai mintákból

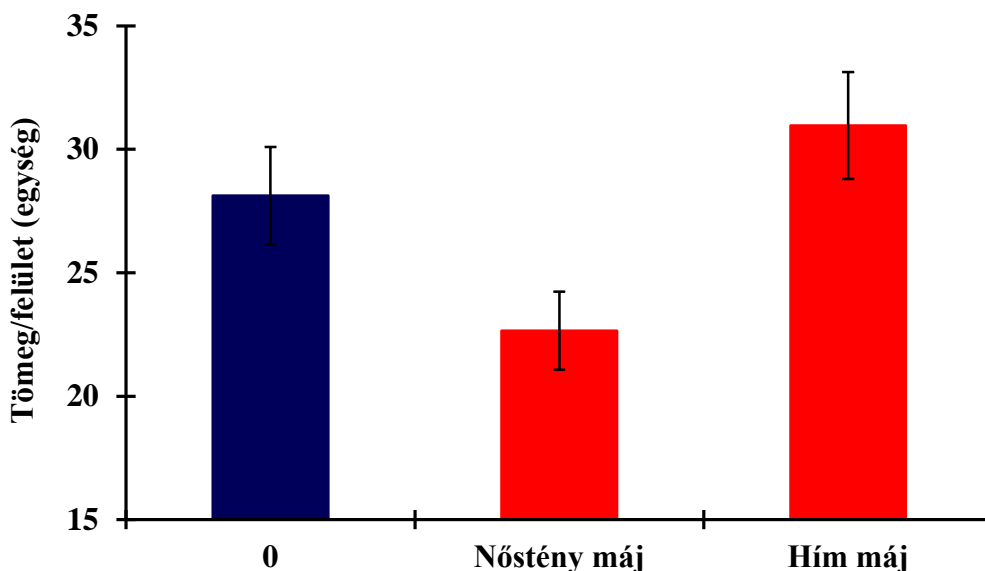
A kialakított kompetitív szenzor biológiai mintáknál történő alkalmazása során számítani kell a biológiai minta zavaró hatásaira. E mátrixhatások megjelenhetnek a háttérszint növekedésében melyet a nem specifikus kötések okoznak, a standard kalibrációs görbe felfelé történő eltolódásában. Hogy a mátrixhatást csökkentsem hím ponty vérért mesterségesen szennyeztem különböző mennyiségű (0,01-1000 ng/ml) lipovitellinnel és ezeket a mintákat használtam standardként. A különböző minták vitellogenin tartalmát e kalibrációs görbe alapján határoztam meg, és vizsgáltam a mesterségesen szennyezett Lpv mennyiségek visszanyerési arányát is. Az 1, 10 és 100 ng/ml Lpv fehérjét tartalmazó vérmintákból a visszamérést 140%, 89% és 84%-nak találtam. Vizsgáltam további hím és nőstény pontyok vérszérumában a Vtg mennyiségét a kialakított mérőrendszerrel. Minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztem. Eredményeim alapján a hím egyedek Vtg-szintje $0,5 \pm 0,3$, illetve $5,0 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$ és $6,2 \pm 0,8$ Vtg-nek adódott, addig a nőstény egyedekben $246,1 \pm 19,6$, $367,5 \pm 54,7$ és $465,4 \pm 46,9$ $\mu\text{g/ml}$ Vtg-t mértem az immunszenzorral.

A pontyok májában levő Vtg koncentrációját is mértem a 4.3.2. fejezetben leírt előkészítés után. Máj vizsgálatánál hasonlóan jártam el, mint a vér vizsgálatánál. A kalibrációhoz vitellogenin-mentes hím májat mesterségesen szennyeztem különböző koncentrációban ponty Lpv-nel. A 31. ábrán az így felvett kalibráció látható.



31. ábra Ponty Lpv kalibrációs görbéje indirekt szenzorral máj mintában

Vizsgáltam a vitellogenin-mentes hím máj mintákat, nőstény máj mintákat és a mátrix mentes, 0 ng/ml Vtg tartalmú mintát, ami csak az antitestet tartalmazta, megfelelő hígításban. Úgy találtam, hogy a minták mátrixhatása lényegesen nagyobb volt, mint a vérérumok esetében.



32. ábra Ponty minták mátrixhatása. (0: csak antitestet tartalmazó minta, nőstény máj: nőstény ponty máj + antitest, hím máj: ponty hím máj + antitest)

Látható (32. ábra), hogy a legnagyobb jelet a hím egyed mája adta, jóval nagyobbat mint a mátrix-mentes minta. Ennek alapján elmondható, hogy a kalibrációhoz mesterségesen szennyezett mintákra van szükség, és az ismeretlen minta meghatározásához mindig a minta mátrixának megfelelően kell a kalibrációt elkészíteni. Ugyanazon hím és nőstény pontyok májának Vtg tartalmát vizsgáltam, mint amelyeknek véréből korábban meghatároztam a vitellogenin mennyiségét. A hím pontyok májában $1,1 \pm 0,7$, $1,8 \pm 0,7$, $2,6 \pm 0,9$ $\mu\text{g/g}$ Vtg-t mértem, míg a nőstény egyedekben $28,6 \pm 6,3$, $29,7 \pm 5,4$ és $40,9 \pm 4,7$ $\mu\text{g/g}$ Vtg-t mutattam ki. Eredményeim alapján megállapítható, hogy a nőstény egyedek máj mintáinak vitellogenin tartalma kevesebb volt, mint a vérből történő meghatározás esetén, ezért a vér vizsgálata megfelelőbb lehetőséget biztosít a hím pontyok megemelkedett Vtg szintjének vizsgálatára, mely a felszíni vizek EDCs-vel való szennyezése miatt alakulhat ki. Annak ellenére, hogy a szennyező anyag eredetét a biológiai hatás alapú monitorozással nem tudom meghatározni, az általam kifejlesztett új kompetitív OWLS alapú immunszenzor alkalmas lehet a vizek esetleges szennyezettségének gyors és megbízható jelzésére.

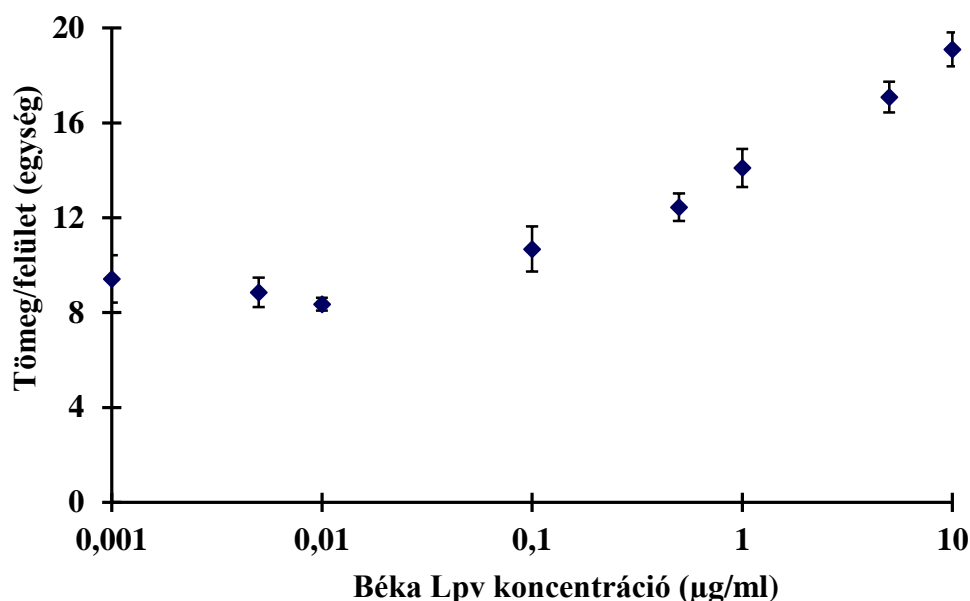
5.3.3 Immunszenzor fejlesztése béka vitellogenin kimutatásra

5.3.3.1 Szenzorfelület módosítása, fehérjék immobilizálása

Béka Vtg kimutatására alkalmas szenzor fejlesztésénél a glutáraldehides rögzítéstől eltérő felületmódosítási és immobilizációs technikát alkalmaztam. A vizsgálataimban az aminoszilanizált szenzor felületén lévő aminocsoportokat karboxil csoportokra módosítottam, majd a 4.2.3 fejezetben említett EDC/NHS-sel immobilizáltam a biológiailag aktív anyagokat. Mérésnél a biológiailag aktív anyaggal érzékenyített kész szenzort helyeztem be a készülékbe, 42 mM-os pH 7,4-es TRIS pufferrel mostam a felületét, majd a szabad reaktív szukcinimid észter csoportokat 0,1 M-os etanolamin injektálásával blokkoltam. Pufferes mosást követően 0,05 M-os sósavval eltávolítottam a lazán kötődő molekulákat és a szenzor készen állt a mérésre. Ez az eljárás jelentősen lerövidíti az előkészítést, hisz az előkészített szenzorfelületen a mérést azonnal meg lehet kezdeni.

5.3.3.2 Direkt mérési módszer béka vitellogenin mérésére

Direkt szenzor kialakításánál a karboxilcsoportokkal módosított szenzorokat használtam fel, mely felszínére EDC/NHS technikával rögzítettem a poliklonális antitestet különböző koncentrációban (17,6; 8,8; 3,52; 1,76; 0,88 $\mu\text{g/ml}$), és vizsgáltam a béka Lpv standardokra adott válaszjel nagyságát. Abban az esetben, amikor a szenzor felületén túl sok antitestet rögzítettem (8,8 és 17,6 $\mu\text{g/ml}$), a szenzor felületére rögzített réteg vastag lett, így a standardokra adott válaszjel nagyon kicsi volt (az 5 $\mu\text{g/ml}$ -es béka Lpv standard $12,45 \pm 0,78$ egységnyi jelet adott). A legérzékenyebb szenzort a 0,88 $\mu\text{g/ml}$ antitest rögzítésével értem el, de ebben az esetben az eredmények nem voltak reprodukálhatóak, mert a szenzor felületén túl kevés molekula került rögzítésre. A vizsgálataim során az 1,76 $\mu\text{g/ml}$ fehérjét tartalmazó szérumot alkalmazva jól értékelhető görbéket kaptam, így a direkt szenzor kialakításánál a továbbiakban 1,76 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban rögzítettem a poliklonális szérumot. A 33. ábra az így kialakított direkt szenzor kalibrációs görbáját mutatja be.



33. ábra A direkt szenzor kalibrációs görbéje 1,76 µg/ml szérum rögzítése esetén
(szigmoidillesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,95; $R^2=0,99$)

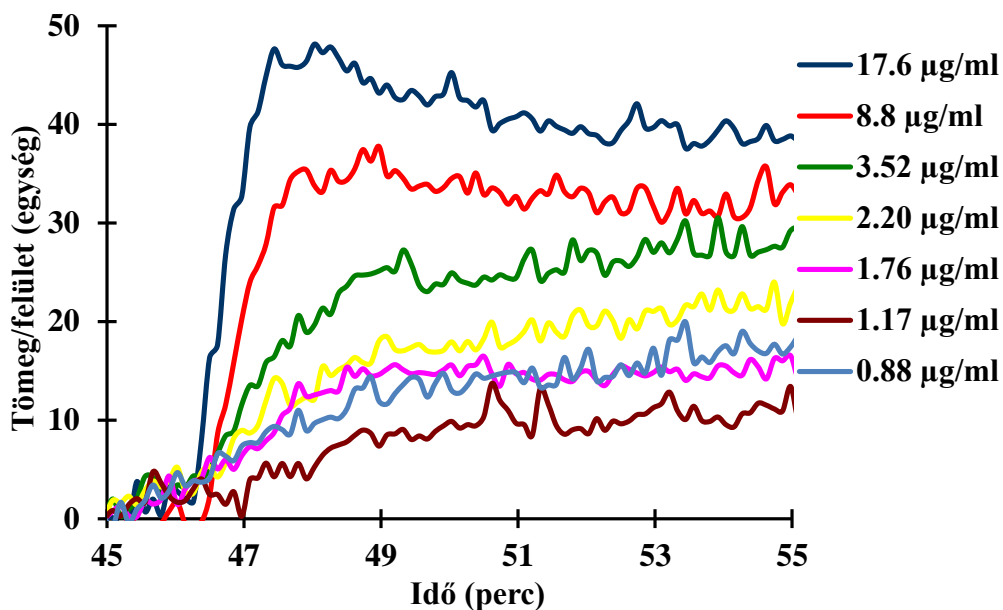
A direkt szenzor dinamikus méréstartománya 0,1-10 µg/ml vitellogenin volt, míg a szenzor jelek $10,67 \pm 0,95$ és $19,11 \pm 0,72$ egység tartományban változtak a standard koncentrációjának megfelelően. A béka Lpv kimutatási határa 50 ng/ml volt. Ez a méréstartomány igen magas, nem alkalmas a béka vitellogenin szint meghatározásra, ezért vizsgáltam a kompetitív mérési rendszer kialakításának lehetőségét az érzékenység növelése érdekében.

5.3.3.3 Kompetitív immunszenzor kifejlesztése béka vitellogenin meghatározáshoz

Karboxilcsoportokat tartalmazó szenzorok felhasználásával, EDC/NHS rögzítési módszert alkalmazva, béka vitellogenin meghatározására alkalmas kompetitív immunszenzort alakítottam ki.

5.3.3.3.1 Alkalmazott poliklonális antitest koncentrációjának meghatározása

Vizsgálatomban a szenzor felületére kovalens kötéssel 100 ng/ml tisztított béka-Lpv fehérjét rögzítettem, majd 50 mM-os sósavval történő regenerálás után a szérumot 0,88; 1,17; 1,76; 2,22; 3,52; 8,8 és 17,6 µg/ml koncentrációban injektáltam a rendszerbe. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy kis antitest koncentráció mellett (0,88 és 1,76 µg/ml) a szenzor érzékenysége nagy volt, de a szenzorjelek igen kicsik (9-14 egység), összerosódtak a válaszjelek. Nagyobb antitest koncentráció (3,52-17,6 µg/ml) alkalmazásával a szenzor válaszjel nagysága nőtt (26-39 egység), ugyanakkor a teszt érzékenysége csökkent. Az 34. ábra a béka anti-Lpv antitest titrálási görbéit mutatja be.



34. ábra Optimális antitestkoncentráció meghatározása kompetitív OWLS méréshez
(immobilizált béka-Lpv koncentráció 100 ng/ml)

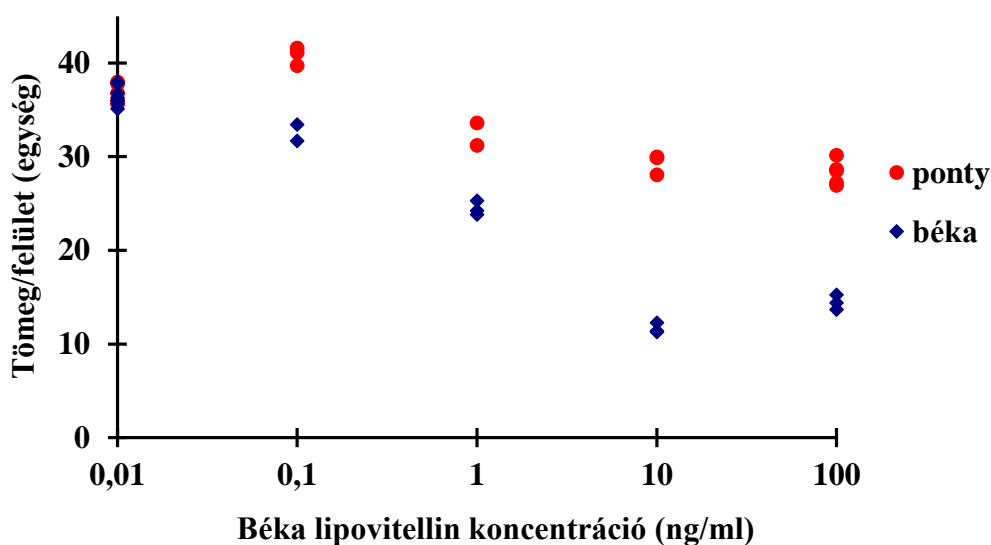
Fontos, hogy a további méréseket olyan antitest koncentráció alkalmazásával kell végezni, ahol a szenzor válasz jól értékelhető, ugyanakkor az érzékenység is megfelelő. Az eredmények alapján, a válaszjelek nagyságának és lefutásának figyelembevételével, béka Vtg kompetitív meghatározásához a poliklonális antitest oldatot a továbbiakban 2,22 µg/ml koncentrációban alkalmaztam, mely 21 egységnyi válaszjelet adott.

5.3.3.3.2 A rögzített antigén optimális koncentrációjának meghatározása

Különböző hígítású béka lipovitellint (1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) rögzítettem a karboxilcsoportokat tartalmazó szenzor felületén EDC/NHS eljárással és vizsgáltam a szérumban hígított oldatra és a standardokra adott válaszjel nagyságát. Ha nagyon kis mennyiségű fehérjét rögzítettem a felszínen (1-10 ng/ml), akkor nagyon kevés antitest molekula tudott kötődni, kis jeleket kaptam. Ugyanakkor, ha túl sok fehérjét rögzítettem (200 ng/ml), nem kaptam nagyobb jeleket, feltehetően a sztérikus gátlás miatt. Kísérleteim további részében 100 ng/ml koncentrációjú fehérje oldattal érzékenyítettem a szenzor felületét. Az így kialakított szenzorral béka-Lpv fehérjét vizsgálva 0,001-1000 ng/ml méréstartományban készítettem kalibrációs görbét. A dinamikus méréstartomány 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott, a Lpv kimutatásának alsó határa 0,1 ng/ml, míg a gátlási középértékre (IC_{50}) $1,04 \pm 0,14$ ng/ml értéket kaptam.

5.3.3.3.3 Béka lipovitellin antitest szubsztrátspecifitása

A vizsgálatban béka-Lpv fehérjével érzékenyített immunszenzorral összehasonlítottam, hogy 0,1; 1,0; 10 és 100 ng/ml ponty- illetve béka-Lpv fehérjét tartalmazó oldatok mekkora jelcsökkenést okoznak. A szenzor felületén 100 ng/ml béka Lpv-t rögzítettem kovalensen, és a béka anti-Lpv antitestet 2,22 µg/ml koncentrációban alkalmaztam. Megállapítottam, hogy a ponty-Lpv a béka-Lpv jeléhez képest $17,7 \pm 5,2\%$, $12,7 \pm 6,1\%$, $3,3 \pm 1,3\%$ és $4,9 \pm 1,0\%$ jelcsökkenést eredményezett, tehát a béka-Lpv ellen termeltetett antitest is szelektíven köti a fajspecifikus antigén fehérjét (35. ábra).

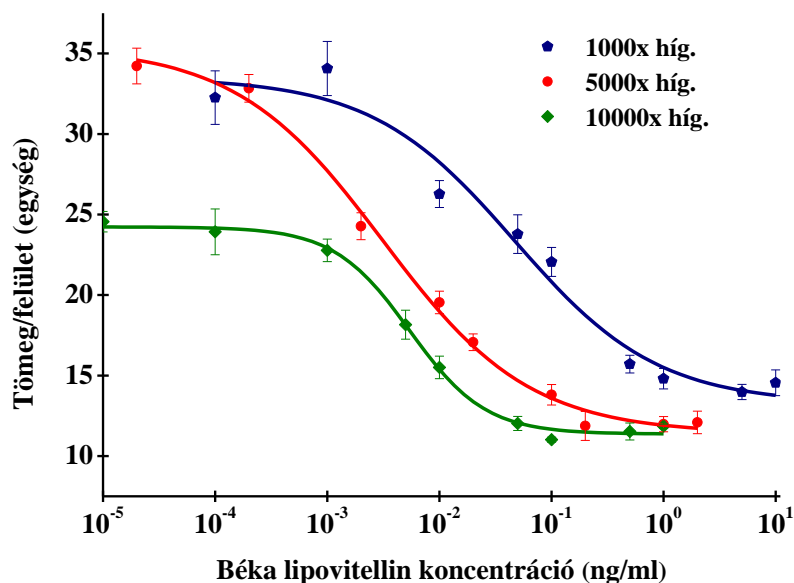


35. ábra Béka-anti-Lpv szelektivitásának meghatározására készített kalibrációs görbe (0,1 µg/ml Lpv rögzítve, 2,22 µg/ml antitest)

5.3.3.3.4 Biológiai minták mátrixhatása

A kompetitív szenzor kialakítását követően a 4.3.3 fejezetben leírtak szerint előkészített biológiai mintákat vizsgáltam. A metodika kialakításának meghatározó eleme a vitellogenint nem tartalmazó mátrix kiválasztása volt. Erre a célra hím vöröshasú unka májextraktumát használtam, mely nem tartalmaz vitellogenint. Alternatívaként használható hím pontyból származó májextraktum is, még akkor is, ha enyhe Vtg szint emelkedés tapasztalható az egyednél, hisz a béka lipovitellin ellen termeltetett szérum igen kicsi keresztreakciót mutatott a ponty lipovitellinnel, így a vizsgálat során interferencia nem valószínű (ld. 5.3.3.3.3. fejezet). A kalibrációs standardok elkészítéséhez hím májextraktumot mesterségesen szennyeztem vöröshasú unkából tisztított lipovitellinnel. A kialakított mintákat különböző hígításban (1000-szeres, 5000-

szeres, 10000-szeres) vizsgáltam annak érdekében, hogy az optimális méréstartományt meghatározzam (36. ábra). A minták hígításához 42 mM-os pH 7,4-es TRIS puffert alkalmaztam.



36. ábra A békamáj extraktumba mesterségesen szennyezett Lpv mérésének kalibrációs görbéje (a minták hígítása: 1000, 5000 és 10000-szeres; IC₅₀ 0,46; 0,031; 0,055 ng/ml)

Az 1000-szeresen hígított mesterségesen szennyezett májminták alkalmazásakor a szenzor igen nagy válaszjeleket adott, ami a mátrixhatásnak tudható be, ugyanakkor a szenzor élettartama drasztikusan lecsökkent és a méréstartomány is beszűkült. Az 5000-szeresen hígított minták mérésekor megfelelő jeleket kaptam 0,001-1 ng/ml koncentrációtartományban, míg a 10000-szeresen hígított minták már túlságosan hígnak bizonyultak. A továbbiakban a biológiai mintákat 5000-szeres hígításban vizsgáltam a kialakított kompetitív OWLS szenzorral.

5.3.3.3.5 Biológiai minták vizsgálata

A vitellogenin monitorozását elsősorban vérből történő Vtg tartalom meghatározásával végzik. A béka minták vizsgálatánál tekintettel kellett lenni arra, hogy a vizsgált keleti unka (*Bombina orientalis*) és európai vöröshasú unka (*Bombina bombina*) fiatal egyedei igen kicsik, ezért nem lehetett csak vérmintából dolgozni, hanem a szív és vér együtt került feldolgozásra a minta készítése során a 4.3.3. fejezetben leírtak szerint. Ismeretlen mintaként nőstény és hím egyedek máj-, szív- és vér- illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltam a természetes Vtg-szintet. A vizsgálathoz a kialakított kompetitív OWLS immunszenzort alkalmaztam, ahol a szenzor felületén 100 ng/ml béka lipovitellint rögzítettem, a poliklonális szérumot 2,22 µg/ml koncentrációban alkalmaztam. Az alkalmazott áramlási sebesség 0,08 ml/perc volt. A mintákat 20

°C-on 1 percig inkubáltam és injektáltam a rendszerbe. A szenzor mintatartó küvetájának hőmérsékletét szintén 20 °C-ra állítottam be. E paraméterek mellett végeztem el a minták vizsgálatát melynek eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. A kísérletben az OWLS immunszenzorral kapott eredményeket ELISA módszerrel mért koncentrációkkal hasonlítottam össze.

4. táblázat: Vöröshasú unka (*Bombina bombina*) szerveiben kimutatható Vtg koncentrációja immunszenzorral és ELISA módszerrel mérve

Szövet		OWLS ^a	Minta Vtg-koncentrációja	ELISA ^b	Minta Vtg-koncentrációja
		ng/ml	µg/g	ng/ml	µg/g
máj	nőstény	27,0 ± 1,2	135,0±6,0	87,1 ± 7,9	130,7 ± 7,9
	hím	12,5 ± 3,6	62,5±18,0	n.d. ^c	n.d. ^c
szív / vér	nőstény	37,3 ± 2,8	186,5±14,0	132,3 ± 11,2	198,5 ± 11,2
	hím	26,4 ± 5,6	132,0±28,0	86,2 ± 10,1	129,3 ± 10,1
ivarmirigy	nőstény (petefészek)	150,9 ± 14,7	754,5±73,5	338,7 ± 65,5	508,1 ± 98,3
	hím (here)	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
pete		206,1 ± 59,7	1030,0±298,5	616,7 ± 91,0	925,0 ± 136,5

a 1:5000 hígításban mérve

b 1:1500 hígításban mérve

c mátrixhatás

Vizsgálataimban ELISA módszerrel csak 100 ng/ml körüli vitellogenin koncentrációt tudtam kimutatni 1:1500 arányú mintahígítást alkalmazva, míg a kompetitív OWLS módszerrel 10 ng/ml fölötti vitellogenin szintet sikerült kimutatni 1:5000 arányú mintahígításnál. A vizsgált minták közül a legmagasabb értékeket a várakozásnak megfelelően a petefészekből és a petéből mértem (754,5±73,5 és 1030,0±298,5 µg/g). A here minták a nagy mátrixhatás miatt nem vizsgálhatók. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az általam kifejlesztett kompetitív immunszenzor alkalmas béka Vtg fehérjéjének kimutatására.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Modellkísérletekkel bebizonyítottam, hogy a felületmódosítási és rögzítési lépések a mérések során reprodukálhatóak. Vizsgáltam a rögzítés során a szenzorválasz nagyságát az analitikum molekulatömege és koncentrációja függvényében, mely során megállapítottam, hogy a szenzor válaszjel nagysága arányos a molekulatömeggel, illetve a szenzorválasz nagysága lineárisan nő az adott analitikum koncentrációjának növelésével.
- Kompetitív, jelölésmentes immunszenzort fejlesztettem ki DON meghatározására búzamintákból. A kialakított szenzorral a méréstartomány két nagyságrenddel kisebb, mint az általam létrehozott OWLS direkt szenzor esetében, és közel egy nagyságrenddel kisebb, mint ami a hasonló immunszenzorokkal SPR detektálással elérhető. A mesterségesen szennyezett búzalisztból a DON mikotoxint a minta-előkészítés során 91,6-123,0%-ban nyertem vissza, mely eredmények alapján az általam kifejlesztett kompetitív jelölésmentes immunszenzor sikeresen alkalmazható DON búzából történő kimutatására.
- Sikeresen dolgoztam ki versengő immunszenzort OWLS detektálással hal (ponty, *Cyprinus carpio*) vitellogenin fehérje kimutatására. A szenzor kialakításához a Vtg fehérjénél könnyebben izolálható és a Vtg fehérjével az azonos fajban 95% keresztreakciót mutató Lpv fehérjét alkalmaztam. A kialakított szenzorral hím és nőstény pontyok vérmintáinak vitellogenin tartalmát vizsgáltam. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a felszíni vizek EDC-vel történő szennyezése miatt a hím egyedek vérében megemelkedett Vtg szint monitorozására az általam kialakított szenzor eredményesen használható.
- Elsőként dolgoztam ki szelektív, kompetitív OWLS immunszenzoros mérési eljárást vöröshasú unka (*Bombina bombina*) Vtg fehérjéjének meghatározására. Nőstény és hím békaegyedek máj-, szív-, vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltam a természetes Vtg-szintet, majd eredményeimet ELISA referencia-módszerrel hasonlítottam össze. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az általam kialakított szenzor érzékenysége egy nagyságrenddel nagyobb az ELISA módszer érzékenységéhez képest, így a kifejlesztett immunszenzor alkalmas vizes élőhelyek endokrin zavaró hatású anyagokkal való szennyezettségének monitorozására.

7. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Munkám során OWLS alapú immunszenzorokat fejlesztettem ki élelmiszer- és környezetanalitikai felhasználásra. A kísérletek során megállapítottam, hogy a DON kimutatására alkalmas szenzor fejlesztése esetén a direkt vizsgálati módszer alkalmazása nem volt megfelelő, hiszen a vizsgálandó analitikumok molekulatömege jóval kisebb volt az antitesténél, így a direkt mérés esetén kis koncentrációban a felületre kötött analitikum által létrehozott tömegváltozás elenyésző, az elérhető érzékenység messze elmaradt a követelményektől. A Vtg kimutatására kialakított direkt szenzorok dinamikus méréstartománya igen magas volt, így ezekben az esetekben is kompetitív szenzor kialakítására volt szükség.

Versengő immunszezort fejlesztettem ki OWLS detektálással DON, illetve hal és béka eredetű vitellogenin fehérjék kimutatására. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a DON vizsgálatára kialakított immunszenzor érzékenysége megfelelő volt, így alkalmas az Európai Unióban előírt követelmények szerint DON gabonából történő kimutatására. Megállapítottam, hogy a kifejlesztett kompetitív immunszenzoros mérési eljárás alkalmas hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) vitellogenin fehérjéinek kimutatására. A hím egyedekben mérhető Vtg-szint alapján feltehetően monitorozni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek hormonális működésre ható anyagokkal való szennyezettségét.

Az optimalizált mérőrendszerekkel valós minták vizsgálatát végeztem el. DON kimutatására alkalmas immunszenzorral mesterségesen szennyezett búzaminták DON tartalmát határoztam meg. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a búzalisztból a DON mikotoxint a minta-előkészítés során 91,6-123,0%-ban nyertem vissza, a minta-előkészítés és az immunszenzorral végzett meghatározás alkalmas DON búzából történő kimutatására. Vitellogenin kimutatására alkalmas immunszenzorral hím és nőtény ponty egyedek vérmintáiból, valamint nőtény és hím békaegyedek máj-, szív- és vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltam a természetes vitellogenin-szintet. A kompetitív OWLS immunszenzorral mért Vtg eredményeket ELISA módszerrel hasonlítottam össze. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy szelektivitás tekintetében eredményeim megfelelnek a versengő ELISA módszerek szelektivitásának, a kimutatási határ azonban több nagyságrenddel kisebb, mint a hasonló biológiai, biokémiai rendszert alkalmazó eljárásé.

A továbbiakban a következő feladatok elvégzését javasolnám:

Munkám során DON meghatározására alkalmas OWLS alapú indirekt immunszenzort fejlesztettem ki. A kutatás folytatásaként különböző helyről pl.: gabonaátvételi helyszínekről

származó ismeretlen búzaminták, valamint DON-nal szennyezett élelmiszerminták (pl.: tészták, kenyerek stb.) vizsgálatát kellene elvégezni a kialakított szenzorral és az eredményeket HPLC-MS referenciamódszerrel hasonlítani össze. Érdekes volna a kialakított szenzorral más mátrixokból (pl.: kukoricából, árpából) történő DON meghatározást végezni.

A biomarkerként használt Vtg kimutatására alkalmas szenzorfejlesztéseinknél további vizsgálatként érdemes lenne az OWLS szenzor eredményeit más immunszenzor technikákkal összehasonlítani, mint pl. QCM, vagy SPR alkalmazásával.

A szenzorokat különböző ismert EDCs-vel (biszfenol-A, dibutil-ftalát, butil-benzil-ftalát, di(2-etilhexil)-ftaláttal) szennyezett vízben nevelt halak illetve békák vizsgálatára alkalmaznám, a környezeti szennyezések hatásának modellezése érdekében.

A szenzorfejlesztési munkák folytatásaként az OWLS immunszenzor további alkalmazási lehetőségeit vizsgálnám egyéb kis molekulás analitikumok, illetve fehérjék kimutatására.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám célja OWLS alapú immunszenzorok kifejlesztése volt élelmiszer és környezetanalitikai alkalmazásra. Egyrészt DON kimutatására alkalmas immunszenzort fejlesztettem ki, és a kialakított szenzorral búzaminták DON tartalmát határoztam meg. Másrészt felszíni vizek EDCs-vel történő szennyezésének kimutatására biomarkerként használható, vitellogenin kimutatására alkalmas szenzorokat alakítottam ki vöröshasú unka (*Bombina bombina*) és ponty (*Cyprinus carpio*) mintákból történő kimutatásra.

A szenzorok kialakításához először modellkísérletekben vizsgáltam az OWLS szenzorjelek változását annak érdekében, hogy bebizonyítsam, a felületmódosítási és rögzítési lépések reprodukálhatóak. Kísérleteimben vizsgáltam a szenzor felületének módosítása, valamint a rögzítés során bekövetkezett rétegvastagságbeli változásokat. Megállapítottam, hogy a kezeletlen hullámvezető rétegvastagsága 170-200 nm közt van, ezt az APTS-sel történő módosítás $0,44 \pm 0,07$ nm-rel, a 2,5 %-os glutáraldehid $0,27 \pm 0,07$ nm-rel változtatja meg. Vizsgáltam a szenzorválasz nagyságát az analitikum molekulatömege és koncentrációja függvényében, mely során megállapítottam, hogy a szenzor válaszjel nagysága arányos a molekulatömeggel, illetve a szenzorválasz nagysága lineárisan nő az adott analitikum koncentrációjának növelésével. Vizsgáltam a szenzorválasz reakcióidejét és az érzékelés pontosságát a chip T_E és T_M becsatolási szögeinek variabilitását vizsgálva. Eredményeim alapján átlagosan az $\alpha_{TM} = 0,724627 \pm 0,0000824$ (relatív hiba 0,011%), míg a $\alpha_{TE} = 3,197883 \pm 0,000157$ (relatív hiba 0,005%) volt, mely igen pontos érzékelést tesz lehetővé. Megállapítottam, hogy a beállítási protokolltól függően percenként 4-10 mérési pont felvétele lehetséges, mely adatszolgáltatási sebesség alkalmas a reakciók valós idejű monitorozására.

Munkám során indirekt immunszenzort fejlesztettem ki deoxynivalenol (DON) mikotoxin meghatározására búzamintákból. A DON mikotoxinból nátrium-perjodátos kezelés után konjugátumot készítettem OVA és BSA felhasználásával. A DON-OVA konjugátum segítségével poliklonális antitestet állítottam elő. A biomolekulák alkalmazásával versengő immunszenzort fejlesztettem ki. Az optimalizált működési paraméterek mellett a DON-standardokat vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,01-50 ng/ml, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,15 \pm 0,08$ ng/ml (χ^2 /szabadsági fok=1,57; $r^2=0,99$), a kimutatás alsó határa 0,001 ng/ml értékűnek adódott. A deoxynivalenollal szennyezett búzalisztmintákkal nyert kalibrációs görbe alapján a dinamikus méréstartomány a lisztmintára számolva 0,005-50 mg/kg volt, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,13 \pm 0,04$ mg/kg értékűnek adódott, a visszanyerés pedig 90% feletti volt, így a szenzor megfelel az Európai Unióban érvényes határérték követelmények szerint DON búzából történő

kimutatására. (Az Európai Bizottság a DON maximális szintjét 1750 µg/kg-on szabályozta feldolgozatlan durumliszt, kukorica, zab esetén (EC reg. No.1881/2006).)

Versengő immunszenzort fejlesztettem ki OWLS detektálással hal (ponty, *Cyprinus carpio*), és béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) eredetű Vtg fehérje kimutatásra. A vizsgálathoz a Vtg fehérjénél könnyebben izolálható és a Vtg fehérjével az azonos fajban 95% keresztreakciót mutató Lpv fehérjét alkalmaztam. A Lpv tisztítása nőstény ponty és keleti unka petefészkéből történt. A tisztított Lpv fehérjékkel nyulakat immunizálva antitestet termeltem. A tisztított Lpv fehérjék és az antitestek alkalmazásával alakítottam ki az immunszenzorokat. Ponty Vtg vizsgálatához kompetitív mérési módszert alkalmaztam, ahol a szenzor felületét 5 µg/ml koncentrációjú Lpv oldattal érzékenyítettem, a mérésekhez 64,1 µg/ml koncentrációjú poliklonális antitestet használtam. A működési paraméterek optimalizálását követően a méréseket 20 °C-on 3 perc inkubációval 0,08 ml/perc áramlási sebesség alkalmazása mellett végeztem. A ponty-Lpv fehérjét vizsgálva kalibrációs görbét készítettem, melynek dinamikus méréstartománya 3 és 150 ng/ml Lpv közé esett, a gátlási középérték (IC_{50}) $21,18 \pm 2,86$ ng/ml, a kimutatás alsó határa 0,7 ng/ml értékűnek adódott. Ökológiai tenyésztésből származó hím és nőstény pontyok vérében vizsgáltam a Vtg-szintet, valamint vizsgáltam a mesterségesen szennyezett Lpv mennyiségek visszanyerési arányát is. Eredményeim alapján a hím egyedek Vtg-szintje $0,5 \pm 0,3$, $5,0 \pm 1,8$ illetve $6,2 \pm 0,8$ µg/ml volt, míg a nőstény egyedekben $246,1 \pm 19,6$, $367,5 \pm 54,7$ és $465,4 \pm 46,9$ µg/ml Vtg fehérjét mértem az immunszenzorral. A pontyok májában levő Vtg koncentrációját is mértem. Úgy találtam, hogy a minták mátrixhatása lényegesen nagyobb volt, mint a vérében. A hím pontyok májában $1,1 \pm 0,7$; $1,8 \pm 0,7$ és $2,6 \pm 0,9$ µg/g Vtg-t mértem, míg a nőstény egyedekben $28,6 \pm 6,3$; $29,7 \pm 5,4$ és $40,9 \pm 4,7$ µg/g Vtg-t mutattam ki. Az 1, 10 és 100 ng/ml Lpv fehérjét tartalmazó vérmintákból a visszamérést 140%, 89% és 84%-nak találtam. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a kifejlesztett immunszenzor alkalmas a Vtg-koncentráció hím pontyok vérében történő mérésére.

Béka Vtg kimutatására alkalmas kompetitív immunszenzor fejlesztésénél a karboxil csoportot tartalmazó szenzor felületén 100 ng/ml koncentrációjú béka Lpv fehérjét EDC/NHS eljárással rögzítettem. A poliklonális antitestet 2,22 µg/ml hígításban alkalmaztam. A béka-Lpv fehérjét vizsgálva a szenzor dinamikus méréstartománya 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott. Az Lpv kimutatásának alsó határa 0,1 ng/ml, míg a gátlási középértékre (IC_{50}) $1,04 \pm 0,14$ ng/ml értéket kaptam. Nőstény és hím békaegyedek máj-, szív-, vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltam a természetes Vtg-szintet. A minták közül a legnagyobb koncentrációt a petefészekben és a petében találtam ($754,5 \pm 73,5$ és $1030,0 \pm 298,5$ µg/g).

Eredményeim alapján megállapítható, hogy az immunszenzoros mérési eljárás alkalmas hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) Vtg fehérjéjének

kimutatására. A hím egyedekben mérhető Vtg-szint alapján feltehetően monitorozni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek hormonrendszert zavaró hatású szermaradványokkal való szennyezettségét.

Kísérleteim során minden esetben a szenzorfejlesztés volt a fő cél. Megállapítható, hogy az általam kialakított OWLS alapú immunszenzorok szelektivitás tekintetében megfelelnek a versengő ELISA módszerek szelektivitásának, a kimutatási határ azonban két nagyságrenddel kisebb, mint a hasonló biológiai, biokémiai rendszert alkalmazó eljárásé, így egyszerű mintaelőkészítési eljárásokat alkalmazva gyors mérési / monitorozási lehetőséget biztosíthat az OWLS technika.

9. SUMMARY

The aim of my work was to develop immunosensors for food and environmental analytical applications. In the course of this I developed an immunosensor suitable for DON detection, and with the established sensor I determined the DON content of wheat flour samples. After that a sensor suitable for detection of Vtg from carp (*Cyprinus carpio*) and frog (*Bombina bombina*) samples were developed, used as a biomarker to detect surface water contamination with EDCs.

In the first steps of the sensor development changes of the OWLS signal were investigated in modelling studies in order to prove that the surface modification and immobilization steps are reproducible. In my experiments I investigated the changes in the thickness of the added layer during the surface modification and immobilization. It has been found out that the thickness of the native waveguide layer is about 170-200 nm, the surface modification with APTS resulted a 0.44 ± 0.07 nm, the applied 2.5% glutaraldehyde 0.27 ± 0.07 nm changes in the thickness. The dependence of sensor response on analyte molecular mass and concentration was also investigated, where it was concluded that the sensor response is proportional to the molecular mass, and it increased linearly with the increasing concentration of the analyte applied. Sensor response time and accuracy were also investigated by monitoring the variability of the chip's T_M and T_E incoupling angles. According to my results the average α_{TM} and α_{TE} were $\alpha_{TM} = 0.724627 \pm 0.0000824$ (0.011% relative error), $\alpha_{TE} = 3.197883 \pm 0.000157$ (0.005% relative error) which enables a very accurate sensing. It could be stated that depending on the conditions set in the protocols, 4-10 detection points could be determined per minutes, which data acquisition speed is suitable for monitoring reactions in real-time.

In my work a competitive immunosensor was developed for deoxynivalenol mycotoxin determination in wheat samples. From the DON mycotoxin, after a pre-treatment with sodium-periodate conjugates were prepared using OVA and BSA. Polyclonal antibodies were made with the help of the DON-OVA conjugate. Competitive immunosensor was developed by using the biomolecules. Investigating the DON standards by the optimized functional parameters the dynamic range was 0.01-50 ng/ml, the IC_{50} value was 0.15 ± 0.08 ng/ml (χ^2 degree of freedom=1.57, $r^2=0.99$), and the LOD was 0.001 ng/ml. According to the calibration curve obtained with the spiked wheat samples, the dynamic measuring range for the wheat samples was between 0.01-10 mg/kg, the IC_{50} value was 0.13 ± 0.04 mg/kg, and the recoveries were over 90%, therefore the sensor fulfils the requirements for the maximum levels according to the EU regulation to detect DON from wheat. (The European Commission regulated the max. level for 1750 $\mu\text{g/kg}$ in unprocessed durum wheat flour, corn and oat (EC reg. No. 1881/2006).)

Competitive immunosensor was developed with OWLS detection for determination of fish (carp, *Cyprinus Carpio*) and frog (firebellied toad, *Bombina bombina*) derived vitellogenin. For the investigation Lpv protein was applied, which is easier to isolate and gives 95% cross-reactivity with the Vtg from the same species. Purification of Lpv was performed from the ovary of carp and oriental fire bellied toad (*Bombina orientalis*). Antibodies were produced in rabbits immunised with purified Lpv proteins. Immunosensors were established using the purified Lpv proteins and the produced antibodies. For the investigation of carp Vtg competitive measuring method was applied, where the sensor surface was sensitized with 5 µg/ml Lpv solution and for the measurement polyclonal antibody was applied at concentration of 64.1 µg/ml. After optimization of the operational parameters the measurements were carried out by applying 0.08 ml/min flowrate after 3 minutes incubation at 20 °C. Analysing the carp-Lpv the calibration curve's dynamic measuring range was between 3-150 ng/ml, the IC₅₀ value was 21.18±2.86 ng/ml and the LOD was 0.7 ng/ml. Vitellogenin content was determined in blood from male and female carp raised under ecological conditions, and I also investigated the recovery ratio of the spiked Lpv content. According to my results, Vtg levels in blood from male carps were found to be 0.5±0.3, 5.0±1.8 and 6.2±0.8 µg/ml, while from female carps 246.1±19.6, 367.5±54.7, 465.4±46.9 Vtg proteins were detected by the immunosensor. Concentration of Vtg was also measured in liver samples from carp. According to my findings the matrix effects of the samples were substantially bigger than those in the blood serum. In the liver tissues of male carp 1.1 ± 0.7, 1.8 ± 1.1 and 2.6 ± 0.9 µg/ml Vtg were measured, while those from female animals we measured to contain 28.6 ± 6.3, 29.7 ± 5.4 and 40.9 ± 4.7 µg/ml Vtg. The recovery ratio was 140%, 89%, 84% from the blood samples with 1, 10, 100 ng/ml Lpv protein content, respectively. Results indicate that the developed immunosensor is suitable for determination of Vtg in the blood of male carp.

100 ng/ml carp Lpv was immobilised by EDC/NHS method on the surface of the sensor containing carboxyl groups for the development of the competitive immunosensor suitable for Vtg determination in frog. The polyclonal antibody was applied at dilution of 2.22 µg/ml. The dynamic measuring range was between 0.5-10 ng/ml for the frog Lpv. The LOD was 0.1 ng/ml, while the IC₅₀ value was 1.04±0.14 ng/ml. Vitellogenin content was investigated in liver, heart, blood and gonad tissue samples from male and female toads. Among the samples the highest concentration was found in the ovarium and ovum (754±73.5 and 1030.0±298.5 µg/g).

According to my results it can be stated that the developed immunosensor method is suitable for fish (carp, *Cyprinus carpio*) and frog (fire bellied toad, *Bombina bombina*) Vtg protein determination. On the basis of the Vtg level measured in male individuals, the contamination of the freshwater and aqueous habitat with endocrine disruptors could be monitored.

In the course of investigation my main goal was sensor development. It could be concluded, that the selectivity of the developed immunosensors was similar as compared to that of the competitive ELISA, but the LOD was a two orders of magnitude lower than that detected by similar biological, biochemical methods, thus the OWLS technique could offer a rapid measuring / monitoring method by using simple sample preparation.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- ACTIS, P., JEJELOWO, O.A., POURMAND, N. (2010) Ultrasensitive mycotoxin detection by STING sensors. *Biosensor and Bioelectronics* 26, 333-337.p. DOI: [10.1016/j.bios.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.016)
- ADÁNYI, N. (2014) Immun- és bakteriális szenzorok fejlesztése optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiai detektálással, és alkalmazásuk az élelmiszerbiztonság valamint a környezetvédelem területén. MTA doktori értekezés URI: <http://real-d.mtak.hu/id/eprint/674>
- ADÁNYI, N., LEVKOVETS, I.A., RODRIGUEZ, G.S., RONALD, A., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I. (2007) Development of immunosensor based on owls technique for determining aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Biosensor and Bioelectronics*. 22 (6) 797-802.p.
- ALBERT, A.L., CHAMPOUX, P.D., DAVIS, A.H. (2013) QuickTox™ Kit for QuickScan DON (Vomitoxin). *Journal of AOAC International* 96 (5) 1006-1016.p. DOI: [10.5740/jaoacint.12-472](https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-472)
- AMARAL-MENDES, J.J. (2002) The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology* 40, 781–788.p. DOI: [10.1016/S0278-6915\(02\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00018-2)
- AN, L., HU, J., ZHANG, Z., YANG, M. (2006) Quantitative real-time RT-PCR for determination of vitellogenin mRNA in so-iuy mullet (*Mugil soiuy*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386 (7-8) 1995-2001.p. DOI: [10.1007/s00216-006-0846-y](https://doi.org/10.1007/s00216-006-0846-y)
- APSIMON, J.W., BLACKWELL, B.A., BLAIS, L., FIELDER, D.A., GREENHALGH, R., KASITU, G., MILLER, J.D., SAVARD, M. (1990): Mycotoxins from *Fusarium* species: detection, determination and variety. *Pure Applied Chemistry* 62, 339-346.p. DOI: [10.1351/pac199062071339](https://doi.org/10.1351/pac199062071339)
- ARCAND-HOY, L., BENSON, W.H. (1998) Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (1) 49-57.p. DOI: [10.1002/etc.5620170108](https://doi.org/10.1002/etc.5620170108)
- BADEA, M., MICHELI, L., MESSIA, M.C, CANDIGLIOTA, T., MARCONI, E., MOTTRAM, T., VELASCO-GARCIA, M., MOSCONE, D., PALLESCHI, G. (2004): Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow injection immunoassay system. *Analytica Chimica Acta*, 520, 141 – 148.p. DOI: [10.1016/j.aca.2004.05.068](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.068)
- BANGE, A., HALSALL, H.B., HEINEMAN, W.R. (2005): Microfluidic immunosensor systems. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2488-2503.p. DOI: [10.1016/j.bios.2004.10.016](https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.016)

- BARUCCA, M., CANAPA, A., OLMO, E., REGOLI, F. (2006) Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research* 101, 68–73.p. DOI: [10.1016/j.envres.2005.07.002](https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.07.002)
- BARZEN, C., BRECHT, A., GAUGLITZ, G. (2002) Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosensors and Bioelectronics* 17 (4) 289 – 295.p. DOI: [10.1016/S0956-5663\(01\)00297-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00297-4)
- BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., SCHUHMACHER, R., LEMMENS, M., ADAM, G., KRŠKA, R. (2005) Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (9) DOI: 3421-3425.p. 10.1021/jf047798g
- BIER, F.F., SCHMID, R.D. (1994) Real time analysis of competitive binding using grating coupler immunosensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics* 9, 125-130.p.
- BOROS, T. (2004) Endokrin hatású anyagok a szennyvíztisztítókbán. *Műszaki információ: Környezetvédelem*, 1-2., 74-81 p.
- BÖHM, C., CICHNA-MARKL, M., BRENN-STRUCKHOFOVA, Z., RAZZAZI-FAZELI, E. (2008) Development of a selective sample clean-up method based on immunoultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize. *Journal of Chromatography A* 1202, 111-117.p. DOI: [10.1016/j.chroma.2008.06.021](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.021)
- BRADFORD, M.M. (1986) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.p. DOI: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRION, F., NILSEN, B.M., EIDEM, J.K., GOKSOYR, A., PORCHER, J.M. (2002) Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1699–1708.p. DOI: 10.1002/etc.5620210823
- BRULS, D.M., EVERS, T.H., KAHLMAN, J.A.H., VAN LANKVELT, P.J.W., OVSYANKO, M., PELSSERS, E.G.M., SCHLEIPEN, J.J.H.B., DE THEIJE, F.K., VERSCHUREN, C.A., VAN DER WIJK, T., VAN ZON, J.B.A., DITTMER, W.U., IMMINK, A.H.J., NIEUWENHUISA, J.H., PRINS, M.W.J. (2009) Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles. *Lab on a Chip* 9 3504-3510.p. DOI: 10.1039/B913960E

- BULUKIN, E., MEUCCI, V., MINUNNI, M., PRETTI, C., INTORRE, L., SOLDANI, G., MASCINI, M. (2007) An optical immunosensor for rapid vitellogenin detection in plasma from carp (*Cyprinus carpio*). *Talanta* 72, 785–790.p. DOI: [10.1016/j.talanta.2006.12.007](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.007)
- CAMPAGNOLI, A., CHELI, F., POLIDORI, C., ZANINELLI, M., ZECCA, O., SAVOINI, G., PINOTTI, L., DELL'ORTO, V. (2011) Use of the Electronic Nose as a Screening Tool for the Recognition of Durum Wheat Naturally Contaminated by Deoxynivalenol: A Preliminary Approach. *Sensors* 11, 4899-4916.p. DOI: [10.3390/s110504899](https://doi.org/10.3390/s110504899)
- CAMPBELL, G.A., MEDINA, M.B., MUTHARASAN, R. (2007) Detection of Staphylococcus enterotoxin B at picogram levels using piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 126 (2) 354-360.p. DOI: [10.1016/j.snb.2007.03.021](https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.03.021)
- CANADY, R.A, COKER, R.D., EGAN, S.K., KRSKA, R., KUIPER-GOODMAN, T., OLSEN, M., PESTKA, J., RESNIK, S., SCHLATTER, J. (2001) Evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series* No. 47/FAO Food and Nutrition Paper 74
- CHOI, S.W., CHANG, H.J., LEE, N., CHUN, H.S. (2011) A Surface Plasmon Resonance Sensor for the Detection of Deoxynivalenol Using a Molecularly Imprinted Polymer. *Sensors* 11 (9) 8654-8664.p. DOI: [10.3390/s110908654](https://doi.org/10.3390/s110908654)
- CLERC, D., LUKOSZ, W. (1997) Direct immunosensing with an integrated-optical output grating coupler. *Sensors and Actuators B: Chemical* 40, 53-58.p. DOI: [10.1016/S0925-4005\(97\)80199-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80199-2)
- COHEN, A.M., MANSOUR, A.A., BANOUB, J.H. (2006) Absolute quantification of Atlantic salmon and rainbow trout vitellogenin by the 'signature peptide' approach using electrospray ionization QqToF tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41 (5) 646-658.p. DOI: 10.1002/jms.1023
- COMMISSION REGULATION (EC) (2006) No 1881/2006 of 19 December Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364/5
- CRAS, J.J., ROWEE-TAITT, C.A., NIVENS, D.A., LIGLER, F.S. (1999) Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosensors and Bioelectronics* 14, 683-688.p. DOI: [10.1016/S0956-5663\(99\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00043-3)
- CUNHA, S.C., FERNANDES, J.O. (2010) Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GCeMS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of Separation Science* 33 (4-5) 600-609.p. DOI: 10.1002/jssc.200900695.

- DARAIN, F., PARK, D.S., PARK, J.S., CHANG, S.C., SHIM, Y.B. (2005) A separation-free amperometric immunosensor for vitellogenin based on screen-printed carbon arrays modified with a conductive polymer. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1780–1787.p. DOI: [10.1016/j.bios.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.07.006)
- DARAIN, F., PARK, D.S., PARK, J.S., SHIM, Y.B. (2004) Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 19, 1245-1252.p. DOI: 10.1016/j.bios.2003.11.014
- DE FEIJTER, J.A., BENJAMINS, J., VEER, F.A. (1978) Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water Interface. *Biopolymers* 17, 1759-1773.p. DOI: 10.1002/bip.1978.360170711
- DOS SANTOS, J.S., TAKABAYASHI, C.R., ONO, E.Y., ITANO, E.N., MALLMANN, C.A., KAWAMURA, O., HIROOKA, E.Y. (2011) Immunoassay based on monoclonal antibodies versus LC-MS: deoxynivalenol in wheat and flour in Southern Brazil. *Food Additives and Contaminants* 28 (8) 1083-90.p. DOI: 10.1080/19440049.2011.576442
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA journal* 11 (10) 3379.p.
- ENGSTRÖM, H.A., ANDERSSON, P.O., OHLSON, S. (2006) A label-free continuous total-internal-reflection-fluorescence-based immunosensor. *Analytical Biochemistry* 357 (2) 159-166.p. DOI: [10.1016/j.ab.2006.03.058](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.058)
- FUKADA, H., FUJIWARA, Y., TAKAHASHI, T., HIRAMATSU, N., SULLIVAN, C.V., HARA, A. (2003) Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134, 615–623.p. DOI: [10.1016/S1095-6433\(02\)00348-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00348-3)
- GARIPCAN, B., CAGLAYAN, M., DEMIREL, G. (2011) New generation biosensors based on ellipsometry, new perspectives in biosensors technology and applications, Prof. Pier Andrea Serra (Ed.). *InTech* ISBN: 978-953-307-448-1, DOI: 10.5772/16256.
- GYURCSÁNYI, E.R. (2005) Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában. *Magyar Kémiai Folyóirat* 111 (3) 133-141.p.
- HAJÓS, GY., IDEI, M. (2001) Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. *Magyar Kémikusok Lapja* 56 (10) 364-368.p.

HARA, A., HIRANO, K., SHIMIZU, M., FUKADA, H., FUJITA, T., ITO, F., TAKADA, H., NAKAMURA, M., IGUCHI, T. (2007) Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin characterization of yolk proteins, development of immunoassays and use as biomarker of exposure to environmental estrogens. *Environmental Science and Technology* 14 (2) 95-108.p.

HARBOE, N., INGLID, A. (1973) Immunization, isolation of immunoglobulin, estimation of antibody titer. *Scandinavian Journal of Immunology* Suppl. 1., 161-169.p. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1973.tb03798.x

HEGEDŰS, GY., BÉLAI, I., SZÉKÁCS, A. (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Analytical Chimica Acta* 421, 121-133.p. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)01045-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01045-X)

HEGYI, GY. et al. (2013): Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. ELTE-TTK. 195.p.

HEIDEMAN, R.G., KOOYMAN, R.P.H., GREVE, J., (1993) Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 10 209-217.p. DOI: [10.1016/0925-4005\(93\)87008-D](https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)87008-D)

HOLBECH, H., ANDERSEN, L., PETERSEN, G.I., KORSGAARD, B., PEDERSEN, K.L., BJERREGAARD, P. (2001) Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130 (1) 119-131.p. DOI: [10.1016/S1532-0456\(01\)00229-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00229-0)

HUNT, H.K., SOTEROPULOS, C., ARMANI, A.M. (2010) Bioconjugation Strategies for Microtoroidal Optical Resonators. *Sensors* 10, 9317-9336.p. DOI: [10.3390/s101009317](https://doi.org/10.3390/s101009317)

HUTCHINSON, T.H., ANKLEY G.T., SEGNER, H., TYLER, C.R. (2006) Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish- Biomarkers as „Signposts” not „Traffic Lights” in Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 114, 106-114.p. DOI: [10.1289/ehp.8062](https://doi.org/10.1289/ehp.8062)

IBÁÑEZ-VEA, M., LIZARRAGA, E., GONZÁLES-PEÑAS, E. (2011) Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. *Food Control* 22 (8) 1428-1434.p. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.03.004

JAKOVAC-STRAJN, B., TAVČAR-KALCHER, G. (2012) A Method Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Detection of Mycotoxins from Trichothecene Groups A and B in Grains. In Salih, B., Çelikbıçak, Ö. : Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. *InTech* 225-244.p. DOI: 10.5772/31788

- JI, F., LI, H., XU, J., SHI, J. (2011) Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay for Deoxynivalenol (DON). *Toxins* 3 (8) 968-978.p. DOI: [10.3390/toxins3080968](https://doi.org/10.3390/toxins3080968)
- JIMENEZ M., MATEO, R. (1997) Determination of mycotoxins produced by Fusarium isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778, 363–372.p. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00328-2
- KADOTA, T., TAKEZAWA, Y., HIRANO, S., TAJIMA, O., MARAGOS, C.M., NAKAJIMA, T., TANAKA, T., KAMATA, Y., SUGITA-KONISHI, Y. (2010) Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay. *Analytica Chimica Acta* 673 (2) 173-178.p. DOI: [10.1016/j.aca.2010.05.028](https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.028)
- KERA, Y., KATO, T., KOSHIBA, K., YAMADA, R. (2000) Koi carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification, N-terminal and internal amino acid sequences and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese Journal of Environmental Toxicology* 3, 47–62.p.
- KLINGLMAYR, C., NOBAUER, K., RAZZAZI-FAZELI, E., CICHNA-MARKL, M. (2009) Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (2) 187-193.p. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.08.016
- KOLOSOVA, A.Y., SIBANDA, L., DUMOULIN, F., LEWIS, J., DUVEILLER, E., VAN PETEGHEM, C., DE SAEGER, S. (2008) Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges. *Analytica Chimica Acta* 616 (2) 235-244.p. DOI: 10.1016/j.aca.2008.04.029
- KRSKA, R., WELZIG, E., BERTHILLER, F., MOLINELLI, A., MIZAIKOFF, B. (2005) Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants* 22 (4) 345-353.p. DOI: 10.1080/02652030500070192
- LANGSETH, W., RUNDBERGET, T. (1998) Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuff and cultures. *Journal of Chromatography A* 815, 103-121.p. DOI: [10.1016/S0021-9673\(98\)00388-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00388-4)

- LATTANZIO, V.M.Z., SOLFRIZZO, M., POWERS, S., VISCONTI, A. (2007) Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Mass Spectrometry* 21 (20) 3253–3261.p. DOI: 10.1002/rcm.3210
- LECA-BOUVIER, B., BLUM, L.J. (2005): Biosensors for protein detection: a review. *Analytical Letters* 38 (10) 1491-1517.p. DOI: 10.1081/AL-200065780
- LECHUGA, L.M., LENFERINK, A.T.M., KOOYMAN, R.P.H., GREVE, J. (1995) Feasibility of evanescent wave interferometer immunosensors for pesticide detection: chemical aspects. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 25 (1-3) 762-765.p. DOI: [10.1016/0925-4005\(95\)85169-0](https://doi.org/10.1016/0925-4005(95)85169-0)
- LEVKOVETS, I., ADÁNYI, N., TRUMMER, N., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I., STARODUB, N.F., SZÉKÁCS, A. (2004) Development of optical (OWLS) immunosensors for macromolecules. *Biokémia XXVIII*, 7-15.p.
- LI, C.R., JUNG K.S., LEE, S.H., KIM, A., PARK, J.S. (2006) Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbant assay for the quantification of vitellogenin in Bullfrog (*Rana catesbeiana*) *Chemosphere* 63 (9) 1485-1490.p. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2005.09.041](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.041)
- LI, D., WANG, J., WANG, R., LI L., ABI-GHANEM, D., BERGHMAN, L., HARGIS, B., LU, H. (2011) A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosensors and Bioelectronics* 26 (10) 4146-4154.p. DOI: 10.1016/j.bios.2011.04.010.
- LIAO, T., JIN, S., YANG, F.X., HUI, Y., XU, Y. (2006) An enzyme-linked immunosorbent assay for rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vitellogenin and comparison of vitellogenin responses in rare minnow and zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment* 364 (1-3) 284-294.p. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2006.02.028](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.02.028)
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., LUNDSTROM, I. (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4, 299-304.p. DOI: [10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., LUNDSTROM, I. (1995) Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosensors and Bioelectronics* 10 (8) i-ix.p. DOI: 10.1016/0956-5663(95)96965-2

- LIPPOLIS, V., PASCALE, M., VISCONTI, A. (2006) Optimization of a fluorescence polarization immunoassay for rapid quantification of deoxynivalenol in Durum wheat-based products. *Journal of Food Protection* 11, 2712–2719.p.
- LIU, J., ZANARDI, S., POWERS, S., SUMAN, M. (2012) Development and practical application in the cereal food industry of a rapid and quantitative lateral flow immunoassay for deoxynivalenol. *Food Control* 26 (1) 88-91.p. DOI: [10.1016/j.foodcont.2012.01.005](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.005)
- LIU, Y., QIN, Z., WU, X., JIANG, H. (2006): Immune-biosensor for aflatoxin B₁ based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 211-217. p. DOI: [10.1016/j.bej.2006.10.003](https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.003)
- MAK, A.C., OSTERFELD, S.J., YU H., WANG, S.H., DAVIS, R.W., JEJELOWO, O.A., POURMAND, N. (2010) Sensitive giant magnetoresistive-based immunoassay for multiplex mycotoxin detection. *Biosensor and Bioelectronics* 25, 1635-1639.p. DOI: 10.1016/j.bios.2009.11.028
- MALLAT, E., BARZEN, C., ABUKNESHA, R., GAUGLITZ, G., BARCELÓ, D. (2001) Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor *Analytica Chimica Acta* 426 (2) 209-216.p. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)00841-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00841-2)
- MARAGOS, C.M. (2011) Detection of deoxynivalenol using biolayer interferometry. *Mycotoxin Research* 27 (3) 157-65.p. DOI: 10.1007/s12550-011-0090-y
- MARAGOS, C.M. (2012) Signal amplification using colloidal gold in a biolayer interferometry-based immunosensor for the mycotoxin deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants Part A* 29 (7) 1108-17.p. DOI: 10.1080/19440049.2012.671
- MARAGOS, C.M., BUSMAN, M., SUGITA-KONISHI, Y. (2006) Production and characterization of a monoclonal antibody cross-reactive with the mycotoxins nivalenol and 4-deoxynivalenol. *Food Additives and Contaminants* 23 (8) 816-825.p. DOI: 10.1080/02652030600699072
- MARAGOS, C.M., PLATTNER, R.D. (2002) Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1827–1832.p. DOI: 10.1021/jf011487d

- MARAGOS, C.M., THOMPSON, V.S. (1999) Fiber-optic immunosensor for mycotoxins. *Natural Toxins* 7 (6) 371-376.p. DOI: 10.1002/1522-7189(199911/12)7:6<371::AID-NT86>3.0.CO;2-8
- MENDES, J.J.A (2002) The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology* 40, 781-788.p. DOI: [10.1016/S0278-6915\(02\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00018-2)
- MENEELY, J., FODEY, T., ARMSTRONG, L., SULYOK, M., KRSKA, R., ELLIOT, C. (2010) Rapid surface plasmon resonance immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat, wheat products, and maize-based baby food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (16) 8936-41.p. DOI: 10.1021/jf101517s
- MICHELI, L., GRECCO, R., BADEA, M., MOSCONE, D., PALLESCHI, G. (2005): An electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (4) 588-96. p. DOI: [10.1016/j.bios.2004.12.017](https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.017)
- MULLETT, W., LAI, E.P., YEUNG, J.M. (1998) Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Biochemistry* 258 (2) 161-167.p. DOI: [10.1006/abio.1998.2616](https://doi.org/10.1006/abio.1998.2616)
- MUSCARELLA, M., IAMMARINO, M., NARDIELLO, D., PALERMO, C., CENTONZE, D. (2012) Determination of deoxynivalenol and nivalenol by liquid chromatography and fluorimetric detection with on-line chemical post-column derivatization. *Talanta* 97, 145-149.p. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.04.009
- NABOK, A.V., MUSTAFA, M.K., TSARGORODSKAYA, A., STARODUB, N.F. (2011) Detection of aflatoxin B1 with a label-free ellipsometry immunosensor. *BioNanoScience*, 1 (1-2) 38-45.p. DOI: [10.1007/s12668-011-0006-5](https://doi.org/10.1007/s12668-011-0006-5)
- NABOK, A.V., TSARGORODSKAYA, A., HASSAN, A.K., STARODUB, N.F. (2005) Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins. *Applied Surface Science*, 246 (4) 381-386.p. DOI: [10.1016/j.apsusc.2004.11.084](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.11.084)
- NABOK, A.V., TSARGORODSKAYA, A., HOLLOWAY, A., STARODUB, N.F., GOJSTER, O. (2007) Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods. *Biochemical and Biomolecular Sensing*, 22 (6) 885-890.p. DOI: [10.1016/j.bios.2006.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.03.010)
- NAKAMURA, M., IGUCHI T. (1998) Abnormal fish in Tagawa river. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-nippon Shokuin Kagaku Kogaku Kaishi* 68, 534-517.p.

- OLSSON, J., BÖRJESSON, T., LUNDSTEDT, T., SCHNÜRER, J. (2002) Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology* 72 (3) 203-214.p. DOI: [10.1016/S0168-1605\(01\)00685-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00685-7)
- ONJI, Y., AOKI, Y., TANI, N., UMEBAYASHI, K., KIDATA, Y., DOHI, Y. (1998) Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 815, 59-65.p. DOI: [10.1016/S0021-9673\(98\)00357-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00357-4)
- OSBORNE, L.E, STEIN, J.M. (2007) Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2) 103-108.p. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032)
- PARKS, L.G., CHEEK, A.O., DENSLOW, N.D., HEPPELL, S.A., MCLACHLAN, J.A., LEBLANC, G.A., SULLIVAN, C.V. (1999) Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology* 123, 113–125.p.
- PATEL, P.D. (2002): (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry* 21, 96-115.p. DOI: [10.1016/S0165-9936\(01\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00136-4)
- PERKOWSKI, J., JELEN, H., KIECANA, I., GOLINSKI, P. (1997) Natural contamination of sprig barley with group A trichotecene mycotoxins in southeastern Poland. *Food Additives and Contaminants* 14, 321-325.p. DOI: 10.1080/02652039709374533
- PESTKA J.J. (2010) Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 84 (9) 663-679.p. DOI: 10.1007/s00204-010-0579-8
- PIETRO-SIMÓN, B., NOGUER, T., CAMPAS, M. (2007) Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (7) 689-702.p. DOI: 10.1016/j.trac.2007.05.012
- PLACINTA, C.M., MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.p. DOI: [10.1016/S0377-8401\(98\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00278-8)
- POKOL, GY. (Szerk.) (2011) Analitikai kémia. Typotex Kiadó. 410 p.

- PRÖLL, F., MOEHRLE, B., KUMPF, M., GAUGLITZ, G. (2005): Label-free characterization of oligonucleotide hybridization using reflectometric interference spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (8) 1889-1894.p. DOI: 10.1007/s00216-005-3301-6
- PURDOM, C.E., HARDIMAN, P.A., BYE, V.J., ENO, N.C., TYLER, C.R., SUMPTER, J.P. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8, 275–285.p. DOI: 10.1080/02757549408038554
- RAHMANI, A., JINAP, S., SOLEIMANY, F (2009) Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (3) 202-251.p. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x
- RAN, R., WANG, C., HAN, Z., WU, A., ZHANG, D., SHI, J. (2013) Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control* 34 (1) 138–148.p. DOI: [10.1016/j.foodcont.2013.04.026](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.026)
- RICCIARDI, C., CASTAGNA, R., FERRANTE, I., FRASCELLA, F., MARASSO, S.L., RICCI, A., CANAVESE, G., LORÈ, A., PRELLE, A., GULLINO, M.L., SPADARO, D. (2013) Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics* 40 (1) 233-239.p. DOI: 10.1016/j.bios.2012.07.029
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., REDER, S., DE ALDA, M.L, GAUGLITZ, G., BARCELÓ, D.(2004) Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the RIver ANALyser (RIANA), an optical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (7) 633-640.p. DOI: [10.1016/S0956-5663\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00255-0)
- ROTTER, B.A., PRELUSKY, D.B., PESTKA, J.J. (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (1) 1-34.p. DOI: 10.1080/009841096161447
- RUAN, C., YANG, L., LI, Y. (2002): Immunobiosensor chips for detection of Escherichia coli O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy. *Analytical Chemistry* 74 (18) 4814-20.p. DOI: 10.1021/ac025647b
- SAUERBREY, G.Z. (1959) The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Zeitschrift für Physik* 155, 206-222.p.

SCHIPPER, E.F., BRUGMAN, A.M., LECHUGA, L.M., KOOYMAN, R.P.H., GREVE, J., DOMINGUEZ, C. (1997) The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology. *Sensors and Actuators B: Chemical* 40 147-153.p. DOI: [10.1016/S0925-4005\(97\)80254-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80254-7)

SCHMITT, H.-M., BRECHT, A., PIEHLER, J., GAUGLITZ, G. (1997): An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 12 (8) 809-816.p. DOI: [10.1016/S0956-5663\(97\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00046-8)

SCHOBEL, U., BARZEN, C., GAUGLITZ, G. (2000) Immunoanalytical techniques for pesticide monitoring based on fluorescence detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 366 (6-7) 0646 – 0658.p. DOI: 10.1007/s002160051559

SCOTT, P.M. (1989) The natural occurrence of trichotecenes. Beasley, V.R. (ed): Trichotecene mycotoxicosis: Pathophysiologic effects. *CRC Press Inc. Boca Raton* 1, 1-26.p.

SCOTT, P.M., KANHERE, S.R., TARTER, E.J. (1986) Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron capture gas chromatography. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 69, 889.p.

SENYUVA, H.Z., GILBERT, J. (2010) Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B* 878 (2) 115-132.p. DOI: [10.1016/j.jchromb.2009.05.042](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.042)

SEPÚLVEDA, B., SÁNCHEZ DEL RIO, J., MORENO, M., BLANCO, F.J., MAYORA, K., DOMINGUEZ, C., LECHUGA, L.M. (2006) Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach–Zehnder interferometer devices. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 8 (7) 561-566.p. DOI: 10.1088/1464-4258/8/7/S41

SIFUENTES-ROMERO, I., VAZQUEZ-BOUCARD, C., SIERRA-BELTRAN, A.P., GARDNER, S.C. (2006) Vitellogenin in black turtle (*Chelonia mydas agassizii*): Purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for its detection. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (2) 477-485.p. DOI: 10.1897/05-063R2.1

SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., BEKLOVA, M., ZEMAN, L., KIZEK, R. (2010) Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*; 3 (3) 94–99.p. DOI: [10.2478/v10102-010-0019-x](https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x),

SOH, N., NISHIYAMA, H., MISHIMA, K., IMATO, T., MASADOME, T., ASANO, Y., KUROKAWA, Y., TABEL, H. (2002) Spectrophotometric determination of carp vitellogenin using a sequential injection analysis technique equipped with a jet ring cell. *Talanta* 58, 1123-1130.p. DOI: 10.1016/S0039-9140(02)00437-X

SOLEIMANY, F., JINAP, S., ABAS, F. (2012) Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 130 (4) 1055-1060.p. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.07.131](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.131)

SPINKE, J., ORANTH, N., FATTINGER, CH., KOLLER, H., MANGOLD, C., VOEGELIN, D. (1997) The bidiffractive grating coupler application to immunosensing. *Sensors and Actuators B:Chemical* 38-39, 256-260.p. DOI: [10.1016/S0925-4005\(97\)80214-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80214-6)

STARODUB, N.F., DZANTIEV, B.B., STARODUB, V.M., ZHERDEV, A.V. (2000): Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor. *Analytica Chimica Acta* 424, 37-43.p. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)01143-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01143-0)

SUMPTER, J.P., JOBLING, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103, 173-178.p.

SZÉKÁCS, A., TRUMMER, N., ADÁNYI, N., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I. (2003) Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via OWLS detection. *Anal. Chim. Acta* 487, 31-42.p. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00302-7

THIEFENTHALER, K., LUKOSZ, W. (1989) Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensor. *Journal of Optical. Society of America B* 6 (2) 209-220.p. DOI: 10.1364/JOSAB.6.000209

TRUMMER, N., ADÁNYI, N., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I. (2001) Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications. *FRESENIUS Journal of Analytical Chemistry* 371 (1) 21-24.p. DOI: 10.1007/s002160100929

TSCHEMELAK, J., KÄPPEL, N., GAUGLITZ, G. (2005) TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in milk based on ultra-sensitive progesterone detection in water. *Analytical and bioanalytical chemistry* 382 (8) 1895-903.p. DOI: 10.1007/s00216-005-3261-x

- TSCHMELAK, J., KUMPF, M., KÄPPEL, N., PROLL, G., GAUGLITZ, G. (2006) Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: antibody characterization, assay development and real sample measurements. *Talanta* 69 (2) 343-50.p. DOI: [10.1016/j.talanta.2005.09.048](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.048)
- TUANTRANONT, A., WISITSORA-AT, A., SRITONGKHAM, P., JARUWONGRUNGSEE, K. (2011) A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review. *Analytica Chimica Acta* 687 114-128.p. DOI: [10.1016/j.aca.2010.12.022](https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.12.022)
- TÜDÖS, A.J., LUCAS-VAN DEN BOS, E.R., STIGTER, E.C.A. (2003) Rapid surface plasmon resonance based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5843-5848.p. DOI: 10.1021/jf030244d
- TYLER, C.R., SUMPTER, J.P., KAWAUCHI, H., SWANSON, P. (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 84 (2) 291-299.p. DOI: [10.1016/0016-6480\(91\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90052-8)
- UENO, Y. (1977) Trichothecenes: Overview address. In: Mycotoxins in human and animal health. (Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlmann, M.A.) *Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois* 189-228.p.
- VAN DER GAAG, B., SPATH, S., DIETRICH, H., STIGTER, E., BOONZAAIJER, G., VAN OSENBRUGGEN, T., KOOPAL, K. (2003) Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control* 14, 251-254.p. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00008-2
- VAN VELD, P.A., RUTAN, P.B., SULLIVAN, C.A., JOHNSTON, L.D., RICE, C.D., FISHER, D.F., YONKOS, L.T. (2005) A universal assay for vitellogenin in fish mucus and plasma. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3048–3052.p. DOI: 10.1897/05-363R.1
- VINCENT, S.G.P., KELLER, R., SUBRAMONIAM, T. (2001) Development of Vitellogenin – ELISA: an in vivo bioassay and identification of two vitellogenesis inhibiting hormones of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology* 3, 561-571.p. DOI: 10.1007/s1012601-0066-6
- VOLZ, D.C., CHANDLER, G.T. (2004) An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: A screening tool for endocrine toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (2) 298-305.p.

- VÖRÖS, J., RAMSDEN, J.J., CSÚCS, G., SZENDRŐ, I., DE PAUL, S.M., TEXTOR, M., SPENCER, N.D. (2002) Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials* 23, 3699-3710.p. DOI: [10.1016/S0142-9612\(02\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00103-5)
- WANG, J-H., RUDDOCK, L.W., CASS, A.E.G. (1994) Microscopic investigations of the interaction of proteins with surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 9, 647-655.p. DOI: [10.1016/0956-5663\(94\)80061-8](https://doi.org/10.1016/0956-5663(94)80061-8)
- WANG, L., GAN, X.X. (2009) Biomolecule-functionalized magnetic nanoparticles for flow-through quartz crystal microbalance immunoassay of aflatoxin B1. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (1) 109-116.p. DOI: 10.1007/s00449-008-0228-2
- WEETALL, H.H. (1993) Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 41, 157-188.p. DOI: 10.1007/BF02916421
- WEETALL, H.H., FILBERT, A.M. (1974) Porous glass for affinity chromatography applications. *Methodods in Enzymology* 34, 59-72.p. DOI: [10.1016/S0076-6879\(74\)34007-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(74)34007-4)
- WEISS, R., FREUDENSCHUSS, M., KRSKA, R., MIZAIKOFF, B. (2003) Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 20 (4) 386-395.p. DOI: 10.1080/0265203031000065827
- WHEELER, J.R., GIMENO, S., CRANE, M., LOPEZ-JUEZ, E., MORRITT, D. (2005) Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15, 293-306.p. DOI: 10.1080/15376520590968789
- WHO/FAO (2000): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Aditive Series: 47, *FAO Food and Nutrition Paper* 74, 680.p.
- WILLIAMS, R.A., BLANCH, H.W. (1994) Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* 9, 159-167.p. DOI: [10.1016/0956-5663\(94\)80108-8](https://doi.org/10.1016/0956-5663(94)80108-8)
- WILLIAMSON, M.L., ATHA, D.H., REEDER, D.J., SUNDARAM, P.V. (1989) Anti-T2 monoclonal antibody immobilization on quartz fibers: Stability and recognition of T2 mycotoxin. *Analytical Letters* 22 (4) 803-816.p. DOI: 10.1080/00032718908051368

YANG, X., ZHI-BING H., QING-HUA, H., SHUN-ZHOU, D., LAI-SHENG, L., YAN-PING, L. (2010) Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize. *Food Chemistry* 119 (2) 834-839.p. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.08.049](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.049)

ZHANG, X., JU, H., WANG, J. (Szerk.) (2008) Electrochemical sensors, Biosensors and their Biomedical applications. Elsevier Inc. 246-253.p.

ZHI-BING, H., YANG, X., LAI-SHENG, L., YAN-PING, L., HONG, Z., QING-HUA, H. (2012) Development of an immunochromatographic strip test for the rapid simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone in wheat and maize. *Food Control* 28, 7-12.p. DOI: [10.1016/j.foodcont.2012.04.035](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.035)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Adányiné Dr. Kisbocskói Nórának a disszertáció elkészítéséhez nyújtott szakmai segítségért, támogatásért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Székács Andrásnak és a projektben résztvevőknek – NAIK-AKK GVOP-3.1.1-2004-05-0429/3.0 „Immuneszt és immunszenzor kidolgozása endokrin zavaró hatások biomarker fehérjéjének kimutatására” a vitellogenin kimutatására alkalmas szenzor fejlesztésben való segítséget.

Dr. Habil. Kiss Attilának, hogy a tudományos pályán való elinduláshoz lehetőséget biztosított.

Köszönöm a Biológiai osztály munkatársainak az immunanyagok előállításában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, akik mindvégig hittek bennem és támogattak.