



**IMMUNSZENZOR FEJLESZTÉSE  
ÉLELMISZER- ÉS KÖRNYEZETANALITIKAI FELHASZNÁLÁSRA**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**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

## 1. BEVEZETÉS

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 kiégése hatalmas gazdasági veszteséget okoz, és egyben a szennyezett gabonák takarmányként történő felhasználásával az állattenyésztési hozamban is jelentős visszaesést eredményez, míg a szennyezett gabonából készített élelmiszer közvetlen humán egészségkárosító hatású.

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 az endokrin zavaró hatású anyagok (EDC), melyek súlyos hormonháztartási zavarokat idézhetnek elő, elsősorban szaporodási problémákat okozva. Jelenlétükre különösen a vízi élőlények érzékenyek. Az esetek jelentős részében növényvédőszeret, műanyagokat és humángyógyszereket találtak felelősnek e hatás kialakulásáért.

Ezen szennyező anyagok jelenlétének és koncentrációjának gyors meghatározása kiemelkedően fontos élelmiszerbiztonsági és környezetvédelmi szempontból. Nagyszámú minta gyors meghatározása komoly kihívást jelent, hisz a hagyományos analitikai módszerek sok esetben nem alkalmazhatók, mert lassúak, drágák, jól képzett szakembereket és sok esetben bonyolult minta előkészítést igényelnek, ezért szükséges olyan technikák kidolgozása, amely lehetővé teszi a szennyező anyagok gyors kimutatását, ugyanakkor megfelelően szelektívek és szenzitívek. A bioszenzorok, azon belül is a jelölésmentes immunszenzorok alkalmazása megoldást jelenthet a fenti analitikai problémákra, ezért is kiemelkedően fontos és aktuális e technikák ilyen irányú kutatása.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Doktori munkám célja OWLS alapú immunszenzorok fejlesztése volt élelmiszer- és környezetanalitikai alkalmazásra. Kísérleteimben búza deoxynivalenol (DON) tartalmának vizsgálatára alkalmas immunszenzor, illetve EDC szennyezőanyagok jelenlétének kimutatására – biomakernek tekinthető vitellogenin (Vtg) fehérje meghatározására – alkalmas szenzor kialakítását tűztem ki célul, béka (vöröshasú unka, *Bombina orientalis*) 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 valós minták vizsgálatával. 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.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A DON meghatározáshoz GC-MS vizsgálattal igazoltan (LOD 0,01 mg/kg) DON mentes búzalisztet használtam, melyet mesterségesen szennyeztem különböző koncentrációjú DON-nal 0-100 mg/kg koncentráció tartományban.

Vitellogenin meghatározáshoz a hím és nőstény pontyok (*Cyprinus carpio*) az Aranyponty Zrt. (Rácegres, Rétimajor) ökológiai halgazdaságból származtak. A béka Vtg vizsgálatokhoz a természetből begyűjtött petecsomókból laboratóriumi tenyészetben nevelt vöröshasú unkat használtam, melyeket a Double Delta Kft. (Bretttyóújfalu) biztosított számunkra.

Vitellogenin meghatározásához immunogénként / antigénként lipovitelin (Lpv) fehérjét alkalmaztam, mert izolálása lényegesen egyszerűbb és ugyanazon fajban a vitellogenin (Vtg) és lipovitelin (Lpv) fehérje 95%-os keresztreakciót mutat egymással.

A mérésekhez OW 2400 típusú amino funkcionizált 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 injektációs 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 hullámvezető szenzor felületét szilanizálással módosítottam  $\gamma$ -amino-propil-trietoxiszilánt (APTS) alkalmazva, vizes fázisban, bemerítéses technikával.

A DON, illetve a ponty Vtg vizsgálatára alkalmas szenzor fejlesztések során a biomolekulákat glutáraldehid segítségével rögzítettük a szenzor felületére. A béka Vtg meghatározására alkalmas szenzor esetében az APTS reagenssel kezelt szenzorfelület aminocsoportjait borostyánkősavanhidrides kezeléssel karboxilcsoportokká alakítottuk, melyhez (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (EDC) és N-hidroxi-szukcinimid (NHS) technikával rögzítettük a biomolekulákat.

Az eredmények ábrázolásához, valamint statisztikai értékeléséhez az EXCEL (Microsoft Office professional Edition 2003) és az ORIGIN Scientific Graphing and Analysis Software (version7) statisztikai programot használtam.

#### 4. EREDMÉNYEK

- Modellkísérletekkel vizsgáltam a rögzítés során 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.

DON vizsgálatára alkalmas immunszenzor fejlesztés eredményei:

- Előállítottam a szenzorfejlesztéshez és immunizáláshoz szükséges DON ovalbuminhoz és marhaszérum albuminhoz kötött konjugátumait. A kapott fehérjefrakciók ellenőrzésére izoelektromos fókuszálást használtam.
- Nyúlban történő immunizálással DON antigénre specifikus szérumot fejlesztettem ki, melyből kisózasos módszerrel tisztított IgG-frakciókat állítottam elő. Az antitestek antigénnel szembeni aktivitásának vizsgálatára indirekt ELISA módszert alkalmaztam.
- Az OWLS szenzorral vizsgáltam a DON direkt mérési módszerrel történő kimutatásának lehetőségét.
- OWLS alapú kompetitív immunszenzort fejlesztettem ki DON meghatározására. A mérési rendszer optimalizálását követően mesterségesen szennyezett búzaliszt minták vizsgálatát végeztem el.

Vitellogenin vizsgálatára alkalmas szenzorfejlesztés eredményei:

- Vizsgáltam a direkt mérési módszer alkalmazásának lehetőségét ponty (*Cyprinus carpio*), illetve vöröshasú unka (*Bombina bombina*) eredetű vitellogenin mérésére.
- Ponty vitellogenin meghatározására kompetitív immunszenzort fejlesztettem ki. A szenzor működési paramétereinek optimalizálása után a szenzorral hím és nőstény pontyok vérszérumából, illetve májából vizsgáltam a Vtg mennyiségét.
- Kompetitív immunszenzort alakítottam ki vöröshasú unka vitellogenin meghatározására. A kialakított optimalizált szenzorral hím és nőstény egyedek máj-, szív-, vér- és ivarmirigy preparátumaiból vizsgáltuk a természetes Vtg szintet. Az OWLS immunszenzorral kapott eredményeket ELISA módszerrel mért koncentrációkkal hasonlítottam össze.

## 5. 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 búzaminákból. 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 orientalis*) 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.

## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

### Publikáció folyóiratban:

#### *IF-os folyóirat cikk:*

**MAJER-BARANYI, K.**, ADÁNYI, N., NAGY, A., BUKOVSKAYA, O., SZENDRŐ, I., SZÉKÁCS, A. (2015) Label-free immunosensor for monitoring vitellogenin as a biomarker for exogenous estrogen compounds in amphibian species. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95 (6) 481-493.p.

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, NAGY, A., NÉMETH, GY., SZENDRŐ, I., SZÉKÁCS, A. (2013) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensor for detection of carp vitellogenin. *Sensors and Actuators B: Chemical* 176, 932-939.p. (Impakt faktor: 3,898)

**MAJER-BARANYI, K.**, SZÉKÁCS, A., SZENDRŐ, I., KISS, A., ADÁNYI, N. (2011) Optical waveguide lightmode spectroscopy technique–based immunosensor development for deoxynivalenol determination in wheat samples. *European Food Research and Technology* 233 (6) 1041-1047.p. (Impakt faktor: 1,56, idézettség:1)

SZÉKÁCS, A., ADÁNYI, N., SZÉKÁCS, I., **MAJER-BARANYI, K.**, SZENDRŐ, I. (2009) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring. *Applied Optics* 48 (4) 151-158.p. (Impakt faktor: 1,41, idézettség:9)

### Publikáció konferencia kiadványban:

#### *Magyar nyelvű (összefoglaló):*

**MAJER-BARANYI, K.**, ADÁNYI, N., CSUTORÁS, CS., KISS, A. (2007) Fűszerek aflatoxin B<sub>1</sub> tartalmának vizsgálata immunszenzorral. *Magyar Kémikusok Egyesülete Centenáriumú vegyészkonferencia – Sopron, 2007. május 29-junius.1. poszter A-P24.*

**MAJER-BARANYI, K.**, CSUTORÁS, CS., KISS, A., ADÁNYI, N. (2007) Élelmiszerek aflatoxin szennyezettségének kimutatása OWLS immunszenzorral. *Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak – Budapest, 2007 november 7-8. poszter E/407*

**MAJER-BARANYI, K.**, ADÁNYI, N. (2008) Gabonák deoxinivalenol tartalmának meghatározására alkalmas Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia (OWLS) alapú immunszenzor fejlesztése. *Magyar Tudomány Ünnepe "Fiatal kutatók az élhető Földért" FVM központi rendezvény, 2008. november 24.*

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, SZÉKÁCS, A., SZENDRŐ, I. (2010) Immunszenzor fejlesztése xenoösztrógen hatás kimutatására vitellogenin biomarkerrel. *Magyar Kémikusok Egyesülete Analitikai Napok (Elektroanalitikai szakcsoport)– Budapest, 2010. január 28.*

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.** (2010) Mikotoxin meghatározása OWLS alapú jelölésmentes immunszenzorral. *338. Tudományos Kollokvium (MTA, MÉTE, KÉKI) 2010. február 26.*

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.** (2010) DON kimutatására alkalmas OWLS alapú immunszenzor fejlesztése. *Kémiai szenzorok workshop III. – Pécs, 2010. október 28-29.*

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.** (2011) Vitellogenin alapú immunszenzor fejlesztése környezeti endokrin zavaró hatások kimutatására. *Magyar Kémikusok Egyesülete 1. Nemzeti konferencia - Sopron, 2011. május 22-25.* Program és előadás összefoglalók 126.p.

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, SZENDRŐ, I., SZÉKÁCS, A. (2013) Mikotoxinok és vitellogenin meghatározására alkalmas jelölésmentes immunszenzorok fejlesztése. *XI. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia - Hajdúszoboszló, 2013. október 2-4.* Program és előadás-összefoglalók 53.p.

SZÉKÁCS, A., ADÁNYI, N., NÉMETH, GY., **MAJER-BARANYI, K.** (2013) A vitellogenin, mint endokrin zavaró hatású környezetszennyezők kimutatására alkalmas biomarker immunanalitikai meghatározása. 352. *TUDOMÁNYOS KOLLOKVIUM – Budapest, 2013. szeptember 27.*

***Nemzetközi konferencia (összefoglaló):***

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, SZÉKÁCS, A NAGY, A., SZENDRŐ, I., VÁRADI, M. (2007) Development of immunosensors based on optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) technique for determining mycotoxins in food. *3rd International symposium on Recent advances in food analysis - Prague, Czech Republic, 7-9. November, 2007.* L39., 80.p.

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, BUKOVSKAYA, O., SZÉKÁCS, A., SZENDRŐ, I., VÁRADI, M. (2008) Label-free (OWLS) based immunosensor for the monitoring of exogenous estrogenic effect. *Biosensor 2008 10th World Congress on Biosensors - Sanghai, China, 14-16 May, 2008.* abstract book P1.86

ADÁNYI, N., **MAJER-BARANYI, K.**, SZÉKÁCS, I., SZÉKÁCS, A., SZENDRŐ, I. (2011) Label-free immunosensors with OWLS detection for food safety. *EUROanalysis 2011 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry - Belgrad, Serbia, 11-15 September, 2011.* S4.