

Válasz Prof. Dr. Vértessy G. Beáta, egyetemi tanár, tudományos tanácsadó bírálatára

Őszintén megköszönöm Prof. Dr. Vértessy G. Beáta, egyetemi tanár, tudományos tanácsadónak, hogy elvállalta dolgozatom bírálatát. A Bíráló megjegyzései és kérdései lehetőséget adtak arra, hogy az értekezésben bemutatott eredmények további elemzésére, az alkalmazott módszerek értékelésére. Köszönöm méltató szavait, ugyanakkor elfogadom és megszívlelem a jogos kritikai észrevételeket.

Sajnálom, hogy a jelölésmentes detektálási módszereket ismertető ábrák nem eredeti közleményekből, hanem hazai egyetemi anyagból származnak. Ezzel együtt a dolgozatban szereplő 317 hivatkozás megfelelően bizonyítja tájékozottságomat az adott, igen szerteágazó tudományterületen.

Elfogadom, hogy részletesebben kellett volna ismertetni a különböző mértékegységek használatánál az összefüggéseket, miszerint a kiindulási nyersanyagokban (pl. gabonák, fűszerpaprika) található szennyezés $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ban van megadva, míg a mintaelőkészítés és hígítás után a mérések során ng/ml koncentrációjú oldatokat használtunk. Ezen oldatokkal mért eredményekből a kalibrációs görbék segítségével számoltunk vissza a kiindulási anyagok koncentrációjára.

Egyetértek Bírálómmal abban, hogy a munka nem egy előre, tudatosan felépített kutató munka eredménye, hanem egy új mérés technika alkalmazási lehetőségeinek széleskörű feltárása, bemutatása. Munkám elsősorban alkalmazástechnikai fejlesztéseket foglal össze, amelyekre a különböző pályázatok keretében kerülhetett sor. Az alábbi táblázatban összefoglalom azokat a meghatározó pályázatokat, amelyek keretében a módszerfejlesztésekre sor kerülhetett:

Pályázat jele	Címe	Kutatás tárgya	Pályázat ideje
KOR-10/99 Koreai Tét	Immunszenzorok fejlesztése élelmiszerek szennyezésének kimutatására	E. Coli	1999-2001
OTKA T 033021	Allergének és élelmiszer- szennyezők vizsgálatára alkalmas immunszenzorok kutatása	trifluralin	2000-2002
OTKA F 32992	Optikai hullámvezető és szerves fázisú elektrokémiai bioszenzorok élelmiszeranalitikai alkalmazásának vizsgálata	szilanizálás	2000-2002
QLK1-CT-2002- 70829 EU 5 Craft	PESTISENS	trifluralin mérések gyümölcslemben	2002-2004
OMFB 00184/2002 (BIO- 00073/2001)	Növényvédő szermaradványok és mikotoxinok környezeti szennyezésének kimutatására alkalmas ökotesztek, bioszenzorok kifejlesztése	trifluralin, zearalenon szenzor fejlesztése	2002-2004
QLK1-CT-2001- 70556 EU 5 Craft	MYCOSENS	aflatoxin, ochratoxin vizsgálat gabonában	2004-2006
OTKA T 46402	OWLS detektáláson alapuló	aflatoxin,	2004-2007

	immunszenzorok fejlesztése penészgomba eredetű toxinok kimutatására	ochratoxin, E. Coli	
GVOP-3.1.1-2004-05-0429/3.0	Immuneszt és immunszenzor kidolgozása endokrin zavaró hatások biomarker fehérjéjének kimutatására	vitellogenin	2005-2007
NKTH	EGERFOOD Regionális Tudásközpont pályázat	deoxinivalenol	2006-2008
EUROSTARS EUREKA 4289, MikroVakuum Kft.	SILIBACT, Mikrobagátláson alapuló bioszenzor fejlesztése	bioszilika	2010-2012

Az eredményekre számos tudományos cikk hivatkozott, az alábbiakban foglalom össze a nemzetközi elfogadottságot. A cikkekre való hivatkozások tükrözik, hogy az adott téma mennyire van az érdeklődés középpontjában. A szilanizálással, immobilizálással foglalkozó cikkek a szenzorfejlesztés szempontjából fontosak, a Park et al. (2004) cikk a QCM és OWLS technikák összehasonlítását is tárgyalja példákon keresztül, ezért kapott nagyobb nyilvánosságot. Napjainkban az élelmiszerbiztonság szempontjából igen fontos a gyors és nagyérzékenységű módszerek kifejlesztése, új eljárások összehasonlítása, különösen a leggyakoribb szennyezők, az aflatoxin és az ochratoxin vonatkozásában. Ugyanígy kiemelt szerepe van az *E. coli* vizsgálatoknak, részint a szennyezés vizsgálatában, részint pedig azért, mert a szenzorok fejlesztésénél a kutatók előszeretettel használják a módszerek tesztelésére.

Kutatási téma	Irodalmi adat	Hivatkozás
Szilanizálás, immobilizálás	Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2001) FRESENIUS J. Anal. Chem., 371 (1) 21-24.	13
	Park, IS; Kim, DK; Adanyi, N; et al.(2004) Biosens. Bioelectron Volume: 19 Issue: 7 Pages: 667-674	50
Trifluralin kimutatása	Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) Anal. Chim. Acta, 487, 31-42.	17
Zearalenon kimutatása	Székács, A., Adányi, N., Székács, I., Majer-Baranyi, K., Szendrő, I. (2009) Appl. Optics, 48 (4) 151-158.	11
Aflatoxin B1 Ochratoxin A kimutatása	Adányi, N., Levkovets, I.A., Rodrigucz, G.S., Ronald, A., Váradi, M., Szendrő, I. (2007) Biosens. Bioelectron., 22 (6) 797-802.	61
Deoxinivalenol kimutatása	Majer-Baranyi, K., Székács, A., Szendrő, I., Kiss, A., Adányi, N. (2011) Eur. Food Res. Technol., 233 (6) 1041-1047.	0
Hisztamin kimutatása	Adányi, N., Székács, I., Szendrő, I., Székács, A. (2012) Food and Agricultural Immunology, DOI10.1080/09540105.2012.731686	0

Vitellogenin kimutatása	Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Nagy, A., Németh, Gy., Szendrő, I., Székács A. (2013c) <i>Sens. Actuat. B-Chem.</i> , 176, 932-939.	0
<i>E. Coli</i> kimutatása	Adányi, N., Váradi, M., Kim, N., Szendrő, I. (2006) <i>Curr. Appl. Phys.</i> , 6 (2) 279-286.	42
	Szendrő, I., Erdélyi, K., Fábán, M., Puskás, Z., Adányi, N., Somogyi, K. (2008) <i>Thin Solid Films</i> , 516 (22) 8165-8169.	3
	Szendrő, I., Erdélyi, K., Puskás, Z., Fábán, M., Adányi, N., Somogyi, K. (2012) <i>Nanopages</i> , 7, (1) 17-24.	0
LAB sejtek	Adányi, N., Németh, E., Halász, A., Szendrő, I., Váradi, M. (2006) <i>Anal. Chim. Acta</i> , 573, 41-47.	5
	Németh, E., Adányi, N., Halász, A., Váradi, M., Szendrő, I. (2007) <i>Biomol. Eng.</i> , 24 (6) 631-637.	5
Silibact	Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013) <i>Sens. Actuat. B-Chem</i> , 177, 1-7.	0
	Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013) <i>New Biotechnology</i> 30(5), 493-499	0

1. Az OWLS technika gyakorlati immunszenzoros alkalmazásában élenjárónak tekinthető csoportunk. Az egyes módszerek kidolgozásakor elért, illetve az ahhoz hasonló eredményeket az alábbi táblázat mutatja be. Néhány esetben, pl. a szilikatein enzimet termelő módosított *E. coli* BL21AI sejtek alkalmazásában a biológiai folyamatot feltáró és annak alapkutatásában élenjáró német kutatócsoporttal dolgoztunk együtt.

Mérés	Kimutatási határ	Irodalmi adat	Hivatkozás
Szilanzálás (GA, EDC/NHS)			
Trifluralin kimutatása	0,0001-0,1 pg/ml	Elektrokémiai det. (MWNT), 0.75- 20 mg/l	J. Zhao, Y. Zhang, K. Wu, J.Chen, Y. Zhou (2011) <i>Food Chem.</i> , 128,2, 15 569-572
Zearalenon kimutatása	0,001-1,0 pg/ml	Ellipszomeria 0,1-100 ng/ml	A. Nabok, A. Tsargorodskaya, M.K. Mustafa et al. (2011) <i>Sens. Actuat. B: Chem</i> , 154, 2, 2011, 232-237
Aflatoxin B1 kimutatása	0,01-10 ng/ml	Electrokemilumineszcencia (luminol-AgNPs), 0.1 pg/ml-50 ng/ml	X. Lv, Y. Li, W. Cao, et al. (2014) <i>Sens. Actuat. B: Chem</i> , 202, 31, 53-59.

		Elektrokémiai det. (graphene/vezető polimer/AuNPs 3.2 fmol/l - 0.32 pmol/l	Z. Linting, L. Ruiyi, L. Zaijun, et al. (2012) Sens. Actuat. B: Chem. 174, 359-365.
Ochratoxin A kimutatása	0,1-10 ng/ml	Eldobható elektrokémiai immunszenzor, 0.1-10 µg/l Jelölés mentes fotoelektrokémiai szenzor (CdSe NPs), 10 pg/ml-50 ng/ml Fluoreszcens immunszenzor, 0,01-10 ng/ml	M. Heurich, M. Kamal A. Kadir, I. E. Tothill (2011) Sens. Actuat. B: Chem. 156, 1, 162-168. J. Yang, P. Gao, Y. Liu, et al. (2015) Biosens. Bioelectron. 64, 15, 13-18. B. Prieto-Simón, I. Karube, H. Saiki (2012) Food Chem. 135, 3, 1323-1329
Deoxinivalenol kimutatása	0.01 - 50 ng mL ⁻¹		
Hisztamin kimutatása	10 ⁻² -1 pg/ml	Graphene oxide (GO), molekuláris lenyomatú polimer (MIPs), 0,1-1000 mmol/ml Potentiometriás szenzor, MIPs, 10 ⁻⁶ -10 ⁻² mmol/ml	M. Peeters, S. Kobben, K.L. Jiménez-Monroy, et al. (2014) Sens. Actuat. B: Chem. 203, 527-535. I. Basozabal, A. Guerreiro, A. Gomez-Caballero, et al. (2014) Biosens. Bioelectron. 58, 138-144
Vitellogenin kimutatása	3-300 ng/ml		
E. coli	Élő 10 ⁵ -10 ⁹ TKE/ml Hőkezelt 10 ³ -10 ⁹ sejt/ml	Mágneses NPs, 6,6*10 ⁶ -3,2*10 ⁸ sejt/ml	F. Li, J. Kosel (2014) Biosens. Bioelectron., 59, 145-150.
SILIBACT			

2. A jelölésmentes detektálási módszerek (SPR, QCM, ellipszometria) közötti összehasonlítása során a hasonló kategóriájú berendezéseket kíséreltem meg az alábbi táblázatban összehasonlítani. Igen nagy különbség van az azonos mérés technikák (pl. QCM) egyes gyártók kínálta berendezéseinek technikai felépítése, kapacitása között, ennek megfelelően az árakban is.

Technika	Mért jel	Gyártó	Elméleti érzékenység	Ár	Szenzor ára
OWLS	TE, TM	MikroVákuum Kft	0,1ng/cm ²	60 eEuro	60-70 Euro/chip
QCM	frekvencia	Biolin	0,1 ng/cm ²	70 eEuro,	150

		Scientific			Euro/kristály
SPR	TM	Biacore	0,1 ng/cm ²	60-120 eEuro	Általában csak kész tesztsomagok kaphatók.
ellipszometria (M-2000V)	polarizált fény visszaverődése során fellépő fáziskülönbség	J. A. Woollam Company Inc., Lincoln, Neb., USA	0.1 ng/cm ²	~100 eEuro	

3. A műszer kezdeti felépítésében nem tartalmazott átfolyó küvetát és FIA rendszert. A korábbi FIA rendszerekkel szerzett tapasztalatom alapján a laboratóriumunkban kísérleti berendezést állítottuk össze, aminek alapján került kialakításra az átfolyó cella, a FIA rendszer valamint az inkubációs küvetta. Ezek az egységek már az új készülékek alap felszereléséhez tartoznak, az aktuális műszerleírásokban szerepelnek. (pl. OWLS 210, OWLS QCM 3000, <http://www.owls-sensors.com/OWLS-System>, <http://www.owls-sensors.com/qcm-quartz-crystal-microbalance-owls-electrochemical-sensor>, <http://www.owls-sensors.com/label-free-biosensor-accessories>)

A kidolgozott metodikák közül néhány a gyártó cég honlapján „Applications notes” formájában is megtalálható: <http://www.owls-sensors.com/label-free-biosensor-application-notes>

4. A szenzor szilanizált felszínét lehetőség szerint AFM mérésekkel ellenőriztük, a szenzor aktuális vastagságát valamint a félértékszélesség változását az OWLS műszerrel követtük nyomon. A leírásban említettem, hogy a vizes fázisban szilanizált szenzoron szigetek találhatóak. Az alábbi ábrák támasztják alá a fenti értékelést:

Az A ábra mutatja a vákuumszilanizált szenzorok felületi érdességét AFM módszerrel vizsgálva. A vákuumban történő szilanizálás egyenletes borítottságú bevonatot eredményezett a rácson.

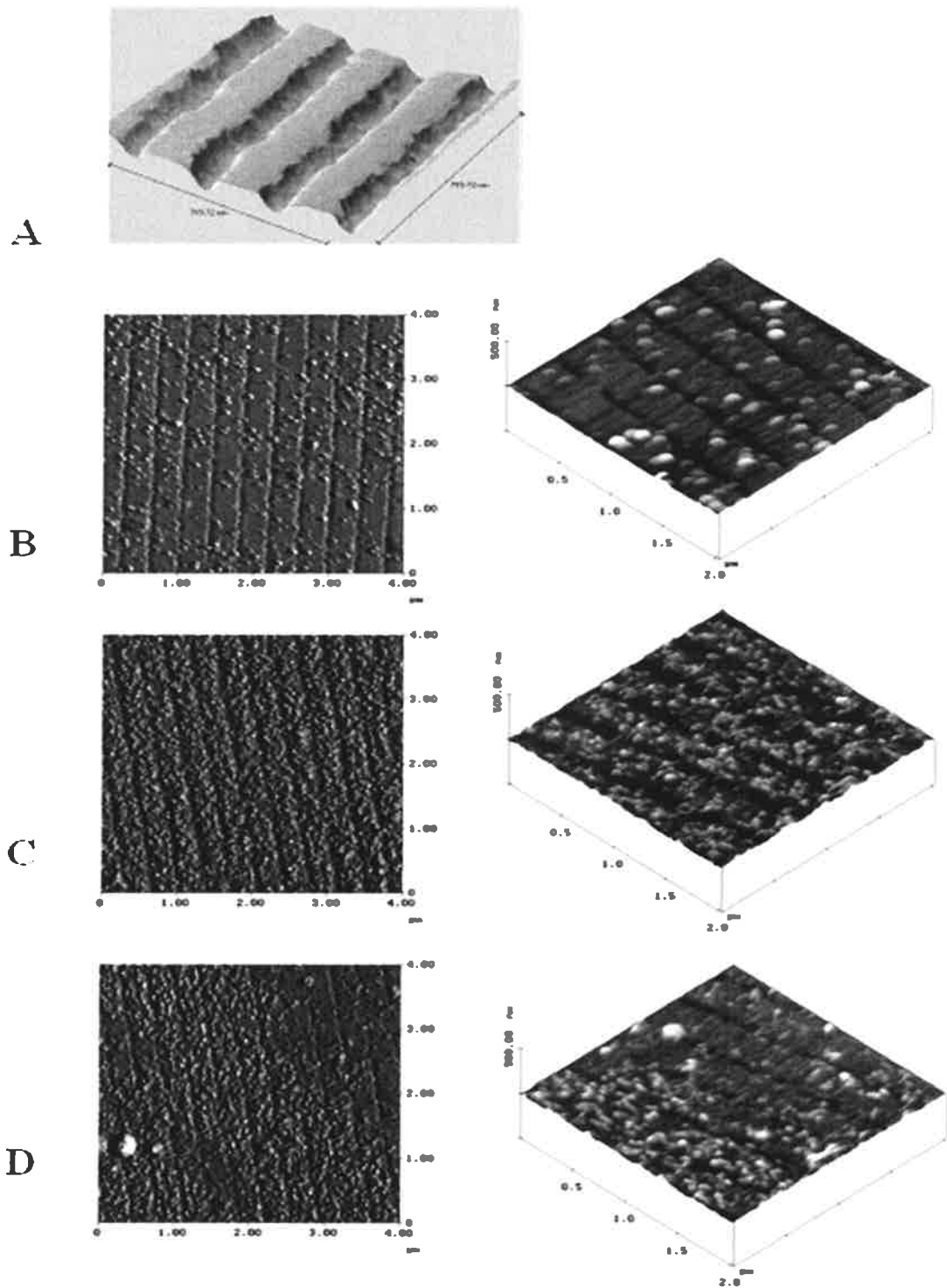
A B ábra az OWLS chip vizesfázisban szilanizált felületéről nyert AFM képet mutatja be két- és háromdimenziós ábrázolásban.

A C ábra a BSA-trifluralin konjugátum antigén rögzítése után készült.

A D ábra az antigén és a trifluralinspecifikus antitestek közötti immunkomplex kialakulását követően, kb 20 minta mérése után készült. Megfigyelhető az immunkomplex jelentős deszorpciója, a felszíni borítottság a korábbi 50 nm átmérőjű foltok által alkotott, egyenletesnek mondható szintről leromlott.

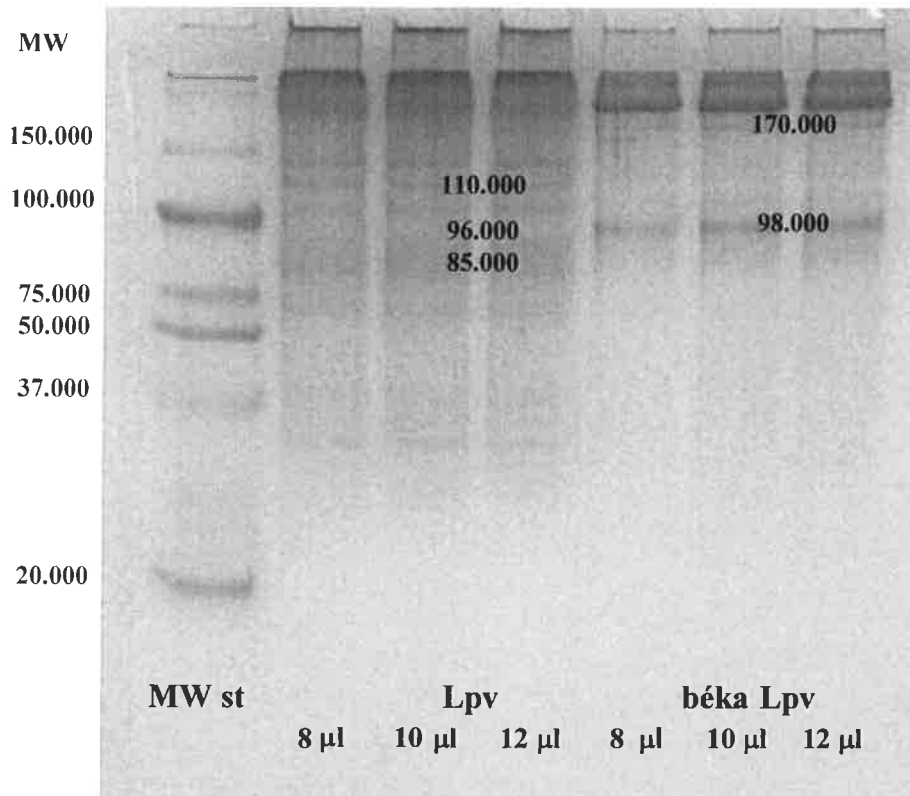
Az ábrák alapján megállapítható, hogy a vákuumszilanizált szenzorokkal tapasztalható egyenletes bevonathoz képest láthatóak a vizes szilanizálással készített szenzorokon a „szigetek”. Átmérőjük a hullámvezető rács szélességénél (1/2400 mm) lényegesen kisebb, a hullámvezető félérték szélessége nem változott számottevően, a szilanizált szenzorok vastagsága hasonló mértékben nőtt. A szenzorok további alkalmazását nem befolyásolta a szenzor felületének fent ismertetett egyenetlensége.

A szerves oldatba bemerítéssel szilanizált szenzorokon azonban már szemmel látható volt az egyenetlen réteg, a szenzorok vastagsága is lényegesen nőtt, ahogy azt a 5.1. táblázatban ismertettem.



1. ábra Különböző módon kezelt szenzorok vizsgálata AFM módszerrel
 A – vákuumszilanizált szenzor
 B – vizes oldatban szilanizált szenzor
 C – BSA-trifluralin konjugátum rögzítése
 D – méréssorozat végén

5. Irodalmi adatok alapján a Vtg és Lpv fehérje azonos fajban 95% keresztreakciót (CR) mutat, és mivel az Lpv izolálása lényegesen egyszerűbb, ezért ezt alkalmaztuk immunogénként/antigénként a Vtg immunszenzorok fejlesztéséhez. Az SDS-PAGE gélek alapján a pontyból és a békából tisztított Lpv különbözött egymástól, mivel az Lpv fajspecifikus fehérje. A ponty-Lpv vizsgálatokor 110-120, 96 és 85 kDa fehérjefrakciókat különböztettünk meg, míg a béka-Lpv-preparátum esetében 170 és 98 kDa frakciókat kaptunk. A ponty-Lpv fehérjefrakcióira kapott eredmények megegyeznek a Hara és mtsai (2007) által publikált adatokkal (113 és 96 kDa).



Lipovitellin SDS-PAGE gélképe

A vitellogenin tisztítására nem volt lehetőségünk, a fehérjeszekvenciát nem ismerjük. Kapható vitellogenin ELISA test, amelyben antitest is van, azonban csak antitest nem kapható. Tárgyalást folytattunk az Abraxis Corp. céggel az antitest gyártásáról, azonban nagyon drága lett volna az ajánlott termék.

6. A lipovitellin és a vitellogenin nem különböztethető meg egymástól a mérés során, azonban míg a lipovitellin a petefészekből izolálható, addig a vitellogenin vérből mérhető. A megfelelő mintavétellel kizárható a lipovitellin és a vitellogenin együttes mérése.

Két hím hal állt a rendelkezésünkre, ezért ezt a két mintát mértük meg többszörös ismétlésben. A mért értékek között egy nagyságrend volt a különbség, a nőstények vitellogenin szintjéhez képest ($246,1 \pm 19,6$, $367,5 \pm 54,7$ és $465,4 \pm 46,9$ $\mu\text{g/ml}$) azonban igen alacsonyak ezek az értékek. További széleskörű vizsgálatot kellene végezni, hogy megállapítsuk a hím egyedek kritikus vitellogenin szintjét, amikor már az esetleges szennyezés hatásáról beszélhetünk.

7. A vizsgálatok során valóban nehezen követhető, hogy mikor milyen mintákat alkalmaztunk. A minták eredetét és milyenségét több esetben a pályázatok határozták meg, többször ezeket saját elképzelésünk alapján egészítettük ki. A Bíráló kérésének megfelelően az immunszenzorok fejlesztéséhez alkalmazott mintákat az alábbi táblázatban foglalom össze:

Mérési eljárás	Mesterséges szennyezés	Eredeti minták
Trifluralin kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> talajvíz 5.3. tábl almalé 5.19. ábra, kivilé 5.4. tábl. 	talajvíz Keleti Főcsatornából 5.3. tábl
Zearalenon kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> kukoricaminták (külön sorozat a kalibráláshoz és külön sorozat a visszaméréshez) 5.6. ábra 	
Aflatoxin B1 kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> búza- és árpaminták (külön sorozat a kalibráláshoz és külön sorozat a visszaméréshez) 5.7 és 5.8. tábl.; a minták a projekten belüli laboratóriumokban kerültek vizsgálatra. fűszerpaprika a kalibráláshoz 5.26. ábra 	fűszerpaprika minták 5.27 ábra
Ochratoxin A kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> búza- és árpaminták (külön sorozat a kalibráláshoz és külön sorozat a visszaméréshez) 5.9 és 5.10. tábl.; a minták a projekten belüli laboratóriumokban kerültek vizsgálatra. vörösborminták kalibráláshoz 5.29. ábra 	
Deoxinivalenol kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> búzaliszt minták (külön sorozat a kalibráláshoz és külön sorozat a visszaméréshez) 5.33. ábra és 5.11. tábl. 	
Hisztamin kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> 	zöldséglé minták 5.36. ábra
Vitellogenin kimutatása	<ul style="list-style-type: none"> ponty minták kalibráláshoz 89. oldal vöröshasú unka kalibráláshoz 5.41. ábra 	<p>ponty minták 89. oldal</p> <p>vöröshasú unka 5.12. tábl.</p>

8. Egyetértek Bírálommal, hogy a túlságosan hosszú ideig fenntartott rekombináns *E. coli* baktériumban csökkenne a fehérje termelése. Ennek elkerülése érdekében az eredeti sejteket mélyhűtve (-80 °C) tároltuk, és megfelelő időnként ahhoz visszanyúlva az eredeti sejtszuszpenzióból készült tenyészetekkel dolgoztunk. Ezzel az eljárással biztosítottuk, hogy ne változzon meg a sejtek fehérje termelő tulajdonsága. Mi a fehérje termelést nem vizsgáltuk.

Esetünkben indukálható expresszióról beszélhetünk, a fehérjetermelés indukálásához a BHI tápkeverék L-arabinózt tartalmazott 0.2% koncentrációban.

Ismét megköszönöm Prof. Dr. Vértessy G. Beáta, egyetemi tanár, tudományos tanácsadó részletes bírálatát, segítő szándékú megjegyzéseit, valamint azt, hogy a hibák és hiányosságok ellenére támogatja az értekezés elfogadását és nyilvános vitára bocsátását.

Budapest, 2014. szeptember 6.



Adányiné Kisbocskói Nóra