MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Immun- és bakteriális szenzorok fejlesztése optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiai detektálással, és alkalmazásuk az élelmiszerbiztonság valamint a környezetvédelem területén

Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra



Központ Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1 BEVEZETÉS	6
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1 Bioszenzorok	8
2.1.1. Immunszenzorok	8
2.1.2. Mikrobiális szenzorok	9
2.7.2. Wilkoolans szenzerek 2.2. Detektálási eljárások	10
2.2. Detektulasi eljulusek 2.2.1. Jelölésmentes detektálási módszerek	10
2.2.1. selotesinentes decentaris modszerek	11
2.2.2. Optikal huhanivezető tenymouds-spektroszköpta (OwES)	11
2.2.5. Feldicit plazificiti fezonalicia (SFR)	12
2.2.4. Empszonietha 2.2.5. Kyarokristály-mikromérleg (OCM)	12
2.2.5. Kvarokristary-mikromoneg (QCW) 2.3. Az ontikaj hullámvezető fénymódus-snektroszkónia elvi alanjaj	14
2.3. Az optikal huhanivezető fenymouus-spektroszkopia etvi alapjai 2.3.1. Elméleti háttér – elektromágneses hullám terjedése hullámvezetőben	16
2.3.2. Elektrokémiai-OWI S technika	18
2.3.2. Elektrokelmar-OWEB teelmika 2.3.3. Integrált ontikai hullámvezető szenzorok	18
2.5.5. Integrati optikal hunanivezető szenzor felszínén	20
2.4. Dioszenzorok Kialaktasa a humanivezető szenzor reiszmen 2.4.1 Δ hullámyezető felület tisztítása hidratálása	20
2.4.1. A huhanivezetőn alkalmazható felületmódosítási eljárások	$\frac{20}{20}$
2.4.2. Szilanizálás	20
2.4.9. Sznamzatas 2.4.4. Biomolekulák rögzítése szilanizált szenzorokon	$\frac{22}{22}$
 2.4.4. Diomotekuluk rogzitese sznamzati szenzorokon 5. Immunszenzorok az élelmiszer-hiztonság és a környezetanalitika területén 	$\frac{22}{24}$
2.5. Trifluralin szermaradvány környezeti- és élelmiszermintákban	$\frac{24}{24}$
2.5.1. Tithuranni szemiaradvany könyezeti- és elenniszerinnakoan 2.5.2. Mikotoxinok megielenése az élelmiszerlánchan	25
2.5.2. Hisztamin előfordulása élelmiszerekben, szelektív meghatározása	27
2.5.4. Vitellogenin koncentrációjának meghatározása	$\frac{2}{29}$
2.6 Mikrohiológiai vizsgálatok	30
2.6.1. Baktériumok kimutatására alkalmas eliárások	30
2.6.2 Mikrohiális szenzorok alkalmazása kémiai zavaró hatások gátlások kimutatására	31
2.6.3. Úji bioszilika alapú immobilizálás bioszenzorok feilesztésére	32
3 CÉLKITŰZÉS	34
4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
41 Anvagok	35
4 1 1 Trifluralin kimutatása	35
4.1.2. Zearalenon kimutatása	35
4.1.3. Aflatoxin B1 kimutatása	35
4.1.4. Ochratoxin A kimutatása	35
4.1.5. Deoxinivalenol kimutatása	36
4.1.6. Hisztamin kimutatása	36
4.1.7. Vitellogenin kimutatása	36
4.1.8. LAB-sejtek alkalmazása	36
4.1.9. <i>E. coli</i> alkalmazása	36
4.1.10. Módosított E. coli BL21AI-sejtek alkalmazása	36
4.2. Módszerek	36
4.2.1. OWLS mérőműszer	36
4.2.2. EC-OWLS mérőműszer	38
4.2.3. Immunizálás, antitestek előállítása	38
4.2.4. Antigénspecifikus, tisztított IgG előállítása	38
4.2.5. Referenciavizsgálatok ismertetése	39
4.2.5.1. ELISA eljárás referenciamérésekhez	39
4.2.5.2. GC/MS módszer trifluralin meghatározására	39
4.2.5.3. Biogén aminok vizsgálata HPLC módszerrel	39
4.2.5.4. Lactobacillus plantarum 2142-sejtek vizsgálata referencia eljárással	39
4.2.5.5. Referenciamérések az egyes gátló anyagok kimutatására E. coli BL21AI és E. coli B200	1 -
törzs összehasonlítására	40
4.3. Minták, minta-előkészítés	40
4.3.1. Trifluralin meghatározása telszíni vízmintában és gyümölcslevekben	40
4.3.1.1. Minta-előkészítés ELISA és OWLS mérésekhez	40

4.3.1.2. Minta-előkészítés GC/MS méréshez	40
4.3.2. Zearalenon meghatározása kukoricamintából	40
4.3.3. Aflatoxin meghatározása gabonákból és fűszerekből	41
4.3.4. Ochratoxin meghatározása gabonákból és borokból	41
4.3.5. DON meghatározása búzalisztből	41
4.3.6. Hisztamin meghatározása fermentált zöldséglevekből	41
4.3.7. Vitellogenin meghatározása ponty és vöröshasú unka fajokból származó mintákból	41
4.3.8. E. coli-sejtek kimutatása	42
4.3.9. LAB-sejtek alkalmazása	42
4.3.10. Rekombináns E. coli BL21AI -sejtek alkalmazása	42
4.4. Az alkalmazott matematikai statisztikai módszerek	42
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	43
5.1. OWLS készülék alkalmazása FIA rendszerben	43
5.1.1. Atfolyó küvetta kialakítása FIA rendszerhez	43
5.1.2. Inkubációs küvetta kialakítása biomolekulák immobilizálásához	44
5.2. Szenzor felületének módosítása laboratóriumi és kisüzemi körülmények között	44
5.2.1. Szenzor felületének tisztítása, előkészítése a szilanizáláshoz	44
5.2.2. Amino-csoportok kialakítása 7-amino-propil-trietoxi-szilánnal (APTS)	45
5.2.2.1. Szilanizálás vizes fázisban bemerítéssel	45
5.2.2.2. Szilanizálás gőzfázisban, vízben oldott szilánnal	46
5.2.2.3. Szilanizálás szerves fázisban bemerítéssel	46
5.2.2.4. Szilanizálás gőzfázisban, toluolban oldott szilánnal	46
5.2.2.5. Fehérje adszorpciójának vizsgálata a szilanizált szenzorok felületén	47
5.2.2.6. Aminocsoportokat hordozó szenzor készítése vákuumtechnikával	47
5.2.3. Epoxicsoportok kialakítása <i>y</i> -glicidoxi-propil-trimetoxiszilánnal	49
5.2.3.1. Szilanizálás szerves fázisban bemerítéssel	49
5.3. A szilanizált szenzorok vizsgálata, biomolekulák immobilizálása	50
5.3.1. Aminotunkcionalizalt szenzorok vizsgalata	50
5.3.2. Feluleti karboxilcsoportok kepzese, biomolekulak rogzitese EDC/NHS eljarassal	53
5.5.5. Epoxicsoportol nordozo szenzorok vizsgalata	33 57
5.4. Immunszenzorok lejlesztése trifluralin maghatáragására	50 57
5.4.1.1 Trifluralinhantának ás konjugátumak szintázia	57
5.4.1.2. Poliklonális ellenenyeg előállítása, szárumok jellemzása	57
5.4.1.2. I olikiolians enenanyag eloannasa, szerünlök jenemzese	58
5.4.1.5. Direkt inimuliszenzor trifluralin kinutatására	50
5.4.1.4.1 Immunszenzor kialakítása aminofunkcionalizált szenzorfelületen	59
5.4.1.4.1. Immunszenzor kialakítása karboxilált szenzorfelületen	60
5 4 1 4 3 Trifluralin meghatározására alkalmas szenzor statisztikai értékelése	61
5 4 1 4 4 Valós minták mérése a trifluralinra specifikus immunszenzorral	62
5 4 2. Immunszenzor feilesztése zearalenon meghatározására	65
5.4.2.1. Zearalenonhaptének és -konjugátumok szintézise	65
5.4.2.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése	66
5.4.2.3. Direkt immunszenzor zearalenon kimutatására	67
5.4.2.4. Versengő immunszenzor zearalenon kimutatására	67
5.4.2.4.1. Immunszenzor kialakítása aminofunkcionalizált szenzorfelületen	67
5.4.2.4.3. Zearalenonspecifikus szenzor szelektivitásának vizsgálata	69
5.4.2.4.4. A kifejlesztett zearalenon szenzor alkalmazása kukorica minták mérése	69
5.4.3. Immunszenzor fejlesztése aflatoxin meghatározására	71
5.4.3.1. Direkt és versengő immunszenzor működési paramétereinek meghatározására	71
5.4.3.2. Aflatoxin meghatározása gabonákból	72
5.4.3.3. Aflatoxin B1 meghatározása fűszerpaprikában	73
5.4.4. Immunszenzor fejlesztése ochratoxin meghatározására	74
5.4.4.1. Direkt és versengő immunszenzor működési paramétereinek meghatározása	75
5.4.4.2. Ochratoxin meghatározása gabonákból	75
5.4.4.3. Borminták ochratoxintartalma	77
5.4.5. Immunszenzor fejlesztése deoxinivalenol meghatározására	77
5.4.5.1. DON konjugátumok színtézise	77
5.4.5.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése	78

5.4.5.3. DON meghatározása direkt módszerrel	78
5.4.5.4. DON meghatározása versengő módszerrel	78
5.4.5.5. A DON immunszenzor tesztelése, búzalisztminták mérése	80
5.4.6. Hisztamin meghatározására szolgáló immunszenzor fejlesztése	82
5.4.6.1. Hisztamin-BSA-konjugátum készítése	82
5.4.6.2. Direkt immunszenzor kifejlesztése hisztamin meghatározására	83
5.4.6.3. Versengő immunszenzor kifejlesztése hisztamin meghatározására	83
5.4.6.4. Az immunszenzor szubsztrátspecifitása, fermentált zöldséglevekben lévő hisztamin	
koncentrációjának meghatározása	83
5.4.7. Immunszenzor fejlesztése vitellogenin (Vtg) meghatározására	85
5.4.7.1. Ponty és béka lipovitellin (Lpv) tisztítása	85
5.4.7.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése	86
5.4.7.3. Direkt immunszenzor kifejlesztése vitellogenin meghatározására	86
5.4.7.4. Versengő immunszenzor kifejlesztése vitellogenin meghatározására	87
5.4.7.5. Az anti-vitellogenin szérum szubsztrátspecifitása	88
5.4.7.6. Valós minták mátrixhatása, Vtg meghatározása biológiai mintákból	89
5.5. Mikrobák vizsgálata és mikrobiális szenzorok fejlesztése OWLS és EC-OWLS technika	
alkalmazásával	91
5.5.1. Kémiai stresszfaktorok hatásának vizsgálata Lactobacillus plantarum 2142-sejteken	91
5.5.1.1. LAB-sejtek rögzítése a feszültség függvényében	92
5.5.1.2. Az OWLS jel és az elektródpotenciál közötti LAB-sejtek kalibrációs görbéje, élő és	
hőkezeléssel elpusztított LAB-sejtek adszorpciója	92
5.5.1.3. Hidrogén-peroxid hatása a LAB-sejtekre	93
5.5.1.4. Ecetsav hatása a LAB-sejtekre	95
5.5.1.5. Tejsav hatasa a LAB-sejtekre	96
5.5.1.6. Referenciavizsgalatok	97
5.5.2. Escherichia coli sejtek mennyisegenek meghatarozasa immunszenzorral	99
5.5.3. Bioszilika alapu immobilizalas valos ideju bioszenzorok fejlesztesere	100
5.5.5.1. Bioszilika kepződésenek tanulmanyozása	101
5.5.5.1.1. AZ STO-szenzor teluletmodositasanak natasa	101
5.5.5.1.2. DIOSZIIIKA-TELEG KIAIAKIIASa 5.5.2.1.2. A grangar falülatának roganarálása, a kialakított hiagrilika rátag stabilitása	102
5.5.5.1.5. A szelizőt felületelnek fegenetálásá, a kialakított olosztilka-feleg stadilítása	102
5.5.3.1.4. A SZIIIKatelli Koncentrációjának hatása a bioszilika kialakulására a szenzer felszínán	103
5.5.3.2. Szilikatein enzim látszólagos Michaelis konstansának meghatározása	104
5.5.3.3 Módosított <i>E. coli</i> -seitek rögzítése, bioszenzor feilesztése	105
5.6.3.3.1. Szilikatajn kimutatása a módosított sejtekben OWI S alanú immunszenzorral	100
5.5.3.3.2 Az előkezelés hatása a seitek rögzítésére	100
5 5 3 4 A módosított <i>E. coli</i> alkalmazásával kialakított gátlási szenzorok	107
5 5 3 4 1 A hidrogén-peroxid hatása	100
5 5 3 4 2 Klóramfenikol hatása	110
5 5 3 4 3 A penicillin G hatása	111
5.5.3.4.4. A karbofurán hatása	112
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	114
IRODALOMJEGYZÉK	120

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik irányították, a kezdetektől segítették kutatói fejlődésemet, kísérletes munkámat:

Dr. Váradi Mária egyetemi tanárnak, aki oly sok éven át bízott bennem és támogatta kutatásaimat,

a KÉKI korábbi főigazgatóinak, akik lehetővé tették a kutatási terület művelését,

Dr. Szendrő Istvánnak, a MikroVákuum Kft. ügyvezető igazgatójának, aki hosszú éveken keresztül biztosította és biztosítja a műszeres hátteret a kísérletekhez, partnerünk volt számos kutatási projektben,

Prof. Dr. Székács Andrásnak, akivel közös pályázatok keretében alakítottunk ki gyümölcsöző szakmai kapcsolatot, és mint a KÉKI főigazgatója bíztatott és támogatott a disszertáció elkészítésében,

a közvetlen kollégáimnak, **Trummer Nikolettá**nak, **Székács Inná**nak, **Majerné Baranyi Krisztiná**nak, **Bori Zsuzsanná**nak, akik lelkes közreműködése nélkül ez a sokirányú munka nem készülhetett volna el,

az Intézet munkatársainak, különösen a Biológiai Osztályon, a Mikrobiológiai Osztályon és nem utolsó sorban az Analitikai Osztályon dolgozó kollégáknak, hogy számos esetben szakmai segítséggel járultak hozzá az eredményekhez.

Köszönöm **férjemnek** és a **családomnak**, hogy elfogadták és támogatták szakmai érdeklődésemet, kutatói aktivitásomat.

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az érdeklődés középpontjába került az élelmiszer-minőség és -biztonság kérdése. Az orvostudomány, a biológia, a kémia és fizika új eredményei alapján lehetőség nyílik arra, hogy a táplálkozás során az emberi szervezetbe jutó anyagok pozitív és negatív hatásait mind jobban megismerjük. A globalizáció, az élelmiszerek szabad kereskedelme a világban szükségessé teszi az élelmiszer-biztonság feltételeinek megteremtését, a kockázatelemzés megvalósítását az emberi egészség védelme érdekében. Az élelmiszerekből származó egészségveszélyeztetés megítélése kockázatbecsléssel lehetséges. A kockázatbecslés nem nélkülözheti olyan analitikai módszerek alkalmazását, amelyek biztosítják a vizsgálandó anyagok/komponensek nagy érzékenységű (µg/kg vagy ng/kg), szelektív mérését, kimutatását, valamint a gyors eredményszolgáltatást.

A gyógyszer-, élelmiszer- és vegyipari-technológia és biotechnológia egyre szélesebb körben alkalmaz bioszenzorokat az ipari műveletekben (folyamatszabályozás, fermentáció nyomon követése, szubsztrátanalízis), valamint az élelmiszerek és gyógyszerek vizsgálatánál, környezetvédelmi monitorozásnál. Ezzel párhuzamosan növekszik a gyors, valós időben működő, kinetikai méréseket lehetővé tevő szenzorok iránti igény.

A teljesítményre és az érzékenységre vonatkozó megnövekedett igények és a felmerülő hatalmas költségek miatt a hagyományos analitikai módszerek sok esetben nem alkalmazhatók a minőségbiztosítási rendszerek kiépítésénél. A modern élelmiszervizsgálati módszerek – mint a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), gázkromatográfia (GC), tömegspektrometria (MS), HPLC-MS, GC-MS, atom- és molekulaspektroszkópia, mágneses magrezonancia (NMR) – mellett egyre inkább előtérbe kerülnek a különböző biológiai és molekuláris biológiai módszerek. Az immunanalitikai módszerek közül említést érdemel az enzimjelzéses immunanalitika (ELISA, EIA), a molekuláris biológiai eljárások közül a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszerek, így a valós idejű PCR (RT-PCR) és a véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS PCR (RAPD PCR) módszer. Egyre gyakrabban alkalmazzák a típusú bioszenzorokat, közöttük az enzimalapú szenzorokat, különböző az immunszenzorokat, az affinitásszenzorokat. Ugyancsak az élelmiszer-biztonságot szolgálják az egyre több célra alkalmazható gyorstesztek, ezek azonban csak helyszíni ellenőrzésre alkalmasak. E módszerek érzékenysége és a detektálás alsó határa lehetővé teszi az ételek mikrobiológiai fertőzöttségének gyors kimutatását, a járványszerű megbetegedések kialakulásának megelőzését.

Az élelmiszerek és a környezeti minták szennyezésének forrása alapvetően kémiai és biológiai eredetű lehet. A kémiai szennyezők kimutatása során a legszerteágazóbb feladat a szermaradványok vizsgálata, itt a kutatók a gyors módszerek adta lehetőségekkel élve bizonyos vegyületcsoportok, például különböző típusú növényvédő szerek, állatgyógyszerek együttes meghatározására fejlesztettek ki eljárásokat. Szintén a kémiai szennyezők közé tartoznak a – gombák által termelt – mikotoxinok, melyeknek megjelenése biológiai szennyezésre, patogén gombák jelenlétére utal. A mikotoxinok közvetlenül a földimogyoró, dió, gabonafélék, babfélék, olajos magvak fogyasztásával jutnak az emberi szervezetbe, míg közvetve, a szennyezett takarmányt fogyasztó állatok révén, elsősorban a tej, tojás és belsőségek közvetítésével. Figyelembe véve a legfontosabb penészgombafajokat és toxinjaikat, a hazánkban termesztett gazdasági növények közül a gabonafélék, különösen a kukorica, valamint a fűszerpaprika, az egyes gyümölcsök (alma, szőlő), illetve az ezekből készült

termékek lehetnek fertőzöttek. Az importtermékek közül az EU tagországokban működő, az élelmiszerekre és a takarmányokra vonatkozó gyors riasztási rendszer (RASFF) szerint az egyes mogyorófélék (pisztácia, földimogyoró), illetve a kávé- és kakaóbab jelentik a mikotoxin-kitettség fő forrását.

Az élelmiszerek természetes toxikus vegyületei közül figyelmet kell fordítani a biogén aminok jelenlétére, amelyek az élelmiszerek egy részének természetes alkotóelemei, fontos szerepet játszanak az aroma- és ízanyagok kialakulásában. A biogén aminok mennyisége azonban húsok, halak frissességét, higiéniai állapotát, gyártási és tárolási körülményeit is jelezheti. Kiemelt szerepe van a hisztaminnak, amely az arra érzékeny népességben allergiás reakciókat okozhat.

Az élelmiszer-előállítás globalizációja, a higiéniai szabályok be nem tartása, a nem megfelelő hőkezelés vagy hűtés, illetve egyéb technológiai hibák miatt az megbetegedések hátterében élelmiszer-eredetű az esetek jelentős részében mikrobiológiai szennyeződés áll. Az élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős kórokozó baktériumok közül a Campylobacter-fajok által okozott megbetegedések száma igen jelentős. Az Escherichia coli törzseinek élelmiszer-higiéniai szempontból nagy a jelentőségük, mivel élelmiszerek esetén a fekáliás szennyezettség indikátorai. A kórokozók kimutatása és vizsgálata hagyományos módszerekkel idő- és munkaigényes, így számos olyan új eljárást fejlesztettek ki, amelyek rutinszerű vizsgálatok során alkalmazhatóak. A gyors vizsgálati módszerek közül ezen a területen is egyre nagyobb teret hódítanak a molekuláris biológiai módszerek (PCR, RAPD technikák), gyorstesztek, bioszenzorok.

Az elmúlt három évtizedben előtérbe került a hagyományos mikrobiológiai és kémiai analitikai módszerek mellett a sorozatvizsgálatokra alkalmas, gyors, nagy érzékenységű automatizálható módszerek fejlesztése. Ezzel párhuzamosan, a '60-as években indultak meg a bioszenzor-kutatások, és dinamikusan fejlődnek világszerte mind a meghatározandó szubsztrátok körét, mind pedig a technikai eszköztárat tekintve. A KÉKI-ben a '90-es években kezdődtek meg a bioszenzor-kutatások, amit hazai és nemzetközi együttműködések, pályázatok keretében két fő irányban folytattunk. Az első lépésként enzim alapú amperometriás szenzorokat fejlesztettünk, amelyek vizes közegben működtek különböző szubsztrátok meghatározására (glükóz, maltóz, galaktóz, laktóz, L- és D-aminosavak stb.). Ezen munka eredményeként kaptam meg a BME dr. univ. címét a "Szelektív biokatalitikus érzékelők és analitikai reaktorok fejlesztése élelmiszeripari és biotechnológiai alkalmazásra" című disszertációra. Később az enzim vizsgáltuk alapú bioszenzorok alkalmazhatóságát szerves fázisú közegben (glükózoxidáz, kataláz és koleszterinoxidáz enzimek alkalmazásával), ami "Szerves fázisban működő enzim alapú bioszenzorok feilesztése és alkalmazása élelmiszerminták vizsgálatára" című PhD dolgozatom témája lett.

A bioszenzor-kutatások folytán kerültünk kapcsolatba a MikroVákuum Kft.-vel, majd közös projektek keretében megindítottuk szenzorkutatásaink másik irányát. E munkában az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia (OWLS) alkalmazásának lehetőségeit kívántuk kibővíteni, immunszenzorok és bakteriális szenzorok fejlesztését kezdtük meg. Együttműködésünk célja elsősorban alkalmazástechnikai fejlesztés volt, különös tekintettel az élelmiszer- és környezeti minták vizsgálatának előmozdítására. A kutatás-fejlesztési pályázatok keretében e területen kidolgozott szenzoros mérési eljárásokat, új alkalmazási irányokat, eredményeket foglaltam össze a jelen dolgozatban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Bioszenzorok

Az IUPAC (Thévenot *et al.* 1999) által ajánlott meghatározás szerint a bioszenzor olyan önálló integrált eszköz, amely kvantitatív vagy szemikvantitatív analitikai információkat szolgáltat egy biológiai felismerő rendszer segítségével, amely közvetlen térbeli érintkezésbe lép a jelátalakítóval. Felépítése alapján meg kell különböztetni az analitikai mérőműszerektől, és többszöri használata miatt elkülönítendő az egyszer használatos tesztektől, eszközöktől. A bioszenzorral történő mérés folyamatában először kapcsolatba hozzuk a mintát az érzékelő receptorfelülettel, a mérendő anyag és a receptor kölcsönhatásakor bekövetkező valamely fizikai vagy fizikai-kémiai változást regisztrálja az érzékelő, a kapott jelet átalakítjuk, és azt elektronikusan tároljuk és értékeljük (Scheller, 2001).

A szenzor működését és hatékonyságát két fő összetevő határozza meg, a specifikus felismerő rész, valamint a jelátalakító egység. E kettő együttesen felelős a szenzor minőségéért. Számtalan kombináció képzelhető el, amelyeknek különböző variációját tesztelték az utóbbi közel ötven évben. Nagy érzékenység, alacsony kimutatási határ, specifikusság, reprodukálhatóság, robusztusság – csak néhány a bioszenzoroktól elvárt tulajdonságok közül.

A detektálás alsó határa jelenleg néhány ng/ml nagyságrendnél tart biológiai markerekre (Tothill, 2009), és ez a határ még csökkenhet a megfelelő eljárások további fejlesztésével. Az első bioérzékelőt glükóz koncentrációjának meghatározására Clark és Lyons készítette 1962-ben glükózoxidázt immobilizálva, és az enzimes reakcióban az oxigén fogyását oxigénelektród segítségével detektálva. Míg kezdetben csak enzimeket használtak biológiailag érzékeny anyagként, később antitesteket, organellumokat és egész sejteket is alkalmaztak. Divies (1975) baktériumokat rögzített alkoholszenzorban, Guilbault (1976) pedig mitokondriumokat alkalmazott NADH-szenzorban. Napjainkban számos kutató számol be nukleinsavak, aptamerek és molekuláris lenyomatú polimerek (MIP) segítségével készített szenzorok működéséről. Az állatgyógyászatban használt oxitetraciklin antibiotikum meghatározására oxitetraciklin-kötő aptamereket rögzítettek bioszenzorban hús, tej vagy egyéb élelmiszeripari termékek ellenőrzésére (Niazi *et al.* 2008). Piacham *és mtsai* (2005) jól kontrollálható, reprodukálható eljárást dolgoztak ki vékony (50 nm) MIP-film kialakítására arannyal fedett kvarckristályszenzor felületén karboxilcsoportot tartalmazó alkántiol-vegyület fotopolimerizációjával.

2.1.1. Immunszenzorok

Az immunszenzorok a bioszenzorok olyan speciális csoportját képezik, amelyek kialakítása esetében az immobilizálásra kerülő biológiailag érzékeny anyag az adott vizsgálathoz szükséges antigén vagy antitest. Az immunválaszt kiváltó antigén (immunogén) lehet maga a kórokozó, annak toxinja, esetleg más testidegen makromolekula. Az immunreakció, az antigén–ellenanyag-kötődés nagyfokú szelektivitásának köszönhetően analitikai módszerek alapját képezheti, amely lehetővé teszi az antigén vagy az ellenanyag meghatározását. Az immunanalitikai vizsgálatokhoz a gerinces állatok vérszérumából kinyert szelektív antitesteket használják. Az ellenanyag (antitest) molekula sajátos felépítésű, multifunkcionális fehérje, amely specifikusan köti meg az antigént. Az immunrendszer azonban csak 5 kDa molekulatömegnél nagyobb immunogénekre ad immunválaszt. A kisebb molekulájú

vegyületek (haptének) önmagukban nem váltják ki az antitest termelését. Nagy molekulahordozóhoz kapcsolva azonban komplett antigénné (immunogénné) alakíthatók. Hordozó anyagként általában nagyméretű fehérjemolekulák használhatók, és az így kapott fehérjekonjugátumokkal végezhető el az immunizálás (Gergely, 1979).

Az immunszenzorokat az immunreakció során kialakult komplex detektálására alkalmazott módszer szerint csoportosíthatjuk (Patel, 2002). Mivel a komplex kialakulásának rendszerint nincs könnyen mérhető terméke, általában valamilyen mesterségesen bevitt jelölést, pl. radioaktív izotópot, enzimet, fluoreszcens vagy kemilumineszcens molekulát, az utóbbi időben pedig mágneses nanorészecskéket alkalmaznak a meghatározáshoz. A jelölés jellegétől függően nagy érzékenységű és szelektivitású vizsgálatok – egyebek között – a fluoreszcens immunassav (FIA), a radioimmunassay (RIA) és az enzimjelzéses immunassay (EIA) terjedtek el. A mérési módszertől függően jelölhetik az antitestet (immobilizált antigén alapú versengő módszerek és az ún. szendvics eljárás) vagy az antigént (immobilizált antitest alapú versengő módszerek). Az enzimjelöléses eljárásokban elsősorban torma peroxidáz vagy alkalikus foszfatáz jelzőenzimet alkalmaznak. A jelölő enzim reakciója során képződött termék vagy a csökkenő koncentrációjú szubsztrát számos eljárással detektálható (pl. fotometria, elektrokémia). Silva és mtsai (2007) poliklórozott bifenilek (PCB) meghatározására alkalmas versengő immunszenzort feilesztettek ki szénpasztaelektródon rögzített antitesttel borított mágneses mikrorészecskékkel. A tejmintában lévő szermaradvány alkalikus foszfatázzal jelölt antigénnel versenyez az antitesten való kapcsolódáshoz.

A technika fejlődése és az immunszenzorok fejlesztése során előtérbe kerültek azok a detektálási lehetőségek, ahol az immunreakciót nem további kémiai, biokémiai reakciók segítségével detektáljuk, hanem a folyamat során bekövetkező fizikai változásokat jelölésmentesen mérjük igen érzékeny mérési technikák alkalmazásával (Hock, 1997). Baktériumok szelektív felismerésére és mennyiségi meghatározására is számos immunszenzort fejlesztettek ki különböző kutatócsoportok (Serra *et al.* 2008, Yang *et al.* 2008) felszíni antigének alkalmazásával. Ezt a sokszínűséget, szerteágazó fejlesztési irányt számos összefoglaló cikkben ismertették (Bange *et al.* 2005; Holford *et al.* 2012).

2.1.2. Mikrobiális szenzorok

A mikrobák biofilmképző tulajdonsága és a biofilmben kialakuló fiziológiai tulajdonságaik (pl. fertőtlenítőszerekkel szembeni rezisztencia, jobb túlélési stratégia) az utóbbi évtizedben a kutatások középpontjába kerültek. Az E. coli igen alkalmas modell organizmus biofilmképződési tulajdonságának vizsgálatára (Corona-Izquierdo and Membrillo-Hernández 2002). Kimutatták, hogy a mikrobiális közösségek stabilabbak, ha felülethez kapcsolódnak vagy aggregátumokat képeznek (Peitzsch et al. 2008). A biofilmek képződését akadályozó vegyületek kiválasztására, a felszín kezelésének, és a különböző fizikai-kémiai paraméterek hatásának valós idejű tanulmányozására a különböző szenzorok jó lehetőséget biztosítanak. Az OWLS rendszert Ramsden és mtsai (1995) alkalmazták osztódó sejtek számának és méretének meghatározására. Megállapították, hogy a rövid időn belül mért jelváltozást a sejtek morfológiai változása okozza, nem pedig a sejtosztódás. Telegdi és mtsai (1998) kvarckristály-mikromérleget alkalmaztak a biofilmképződés mechanizmusának megismerésére és a biocidok gátló hatásának kimutatására. A növekedést gátló bakteriális tesztek igen alkalmasak a vízoldható szerek, pl. antibiotikumok gyors kimutatására (Spiller et al. 2006). Kim és Gu (2003) biolumineszcenciás szenzort fejlesztettek E. coli törzsek rögzítésével

hidrogén-peroxid, fenol és mitimicin C kimutatására. Jelölésmentes szenzor fejlesztése során szintetikus oligopeptiddel immobilizálták az *E. coli* O157:H7 törzset aranyszenzor felszínén. Choi *és mtsai* (2005) felületi plazmon rezonancia (SPR) szenzorral fenolszennyezést mutattak ki, del Busto-Ramos *és mtsai* (2008) fertőtlenítőszerek hatását tanulmányozták, míg más kutatócsoportok különböző xenobiotikumok élelmiszerekből és környezeti mintákból való kimutatására (Pellegrini *et al.* 2004; Melamed *et al.* 2012) dolgoztak ki eljárást.

2.2. Detektálási eljárások

A biológiai, biokémiai vagy kémiai reakció során keletkező jelek nagyságát detektorokkal mérik. А detektorok széles köre különböző használatos а bioszenzorokban és az immunszenzorokban, amelyek ismertetésével. összehasonlításával számos összefoglaló tudományos cikk foglalkozik. A detektorok között a legelterjedtebbek az optikai (Yakovleva et al. 2002; Jie et al. 2008; Tibazarwa et al. 2001, Rasmussen et al. 2000; Tom-Petersen et al. 2001), elektrokémiai, azon belül potenciometriás (Saurina et al. 1999; Yulaev et al. 2001; Pellegrini et al. 2004; Ercole et al. 2003; Rotariu et al. 2002; Rotariu et al. 2004), voltammetriás (Liu et al. 2004 a,b; Rastogi et al. 2003; Lei et al. 2006; Liu et al. 2007; Vianello et al. 1998; Gyss and Bourdillon 1987; Timur et al. 2003; Timur et al. 2007; Liang et al. 2012) és a vezetőképességi (Moore et al. 2011; Radi et al. 2009; Chowdhury et al. 2012; Kim et al. 2009) érzékelők.

2.2.1. Jelölésmentes detektálási módszerek

A molekuláris felismerés nagy szerepet játszik a biológiai folyamatokban. Antigén és antitest, enzim és szubsztrát kölcsönhatása, a receptorok és jelzőanyagok között lejátszódó folyamatok mind meghatározó szerepet töltenek be a biológiai szabályozásban. Ezek a biokémiai reakciók, felismerési folyamatok a természetben különböző határfelületeken játszódnak le (pl. a hormonok sejtmembránba ágyazott hormonreceptorokon, a fehérjék lipidmembránokon adszorbeálódnak). Az új méréstechnikai fejlesztések lehetővé tették, hogy ezeket a biológiai, biokémiai folvamatokat ne a korábban alkalmazott homogén oldatban, hanem biológiailag alkalmasabb határfelületen tanulmányozzuk. Erre elsősorban a bioanalitika területén egyre kedveltebb jelölésmentes detektálási eljárások adnak lehetőséget. Segítségükkel valós időben meghatározható a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikája, a biomolekulák kötödése nyomonkövethető a különféle optikai tulajdonságokkal rendelkező szenzorok határfelületén, a közvetlen optikai adatok változásának függvényében (Vörös 1999). Ennek alapját – egyebek között – az integrált optikai hullámvezető szenzorok biztosítják, amelyek felületén a molekulák között lejátszódó erős, affinitáson alapuló kötődési reakció révén a mérni kívánt anyag jelenléte, koncentrációja a vizsgált oldatból közvetlenül meghatározható.

A jelölésmentes szenzorok alkalmazása – a biospecifikus kötődés időbeli vizsgálata jelölő molekulák nélkül – új lehetőségeket tárt fel a biomolekulák tanulmányozására az immunszenzorok fejlesztésétől a receptor-ligandum-kölcsönhatások tudományos vizsgálatáig. A fent említett szenzorok kialakítása során a jeleket optikai és piezoelektromos detektorokkal mérhetjük.

• Optikai ráccsal történő becsatolás. Ez esetben a hullámvezető felületén kialakított optikai rács szórja a ráeső fényt. Megfelelő becsési szögeknél becsatolódik a hullámvezetőbe (OWLS).

- Prizmában terjedő fény a felületen teljes visszaverődést szenved. A felületet 50 nm aranyfilmmel vonják be. Ez a filmréteg helyezkedik el a vezető evaneszcens rétegében, vagyis adott kritikus beesési szögnél a fémfilm plazmonjai gerjesztődnek (SPR).
- Az ellipszometria síkfelületre vetített fény polarizációjának megváltozását méri a felületen végbemenő kölcsönhatások alapján, ebből számolható a közeg törésmutatója, és a kivált film vastagsága.
- A különböző felépítésű optikai szenzorok mellett a piezoelektromos kvarckristály-mikromérleg (QCM) elterjedten alkalmazott tömegmérő eljárás. Az oszcillációs frekvencia a kristályra adszorbeálódó molekulák hatására változik meg, a rezonancia frekvenciája csökken.

2.2.2. Optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia (OWLS)

A technika alapja az integrált optikai hullámvezető szenzor, amely két rétegből áll: az alsó üveghordozó felületén vékony, nagy törésmutatójú szilícium-oxid – titánoxid (STO) réteget alakítanak ki (2.1. ábra). Ebben a rétegben található az aktív becsatoló rács. A mérőműszer a He-Ne fényforrás által kibocsátott lézersugarat (λ = 632,8 nm) prizma és tükrök segítségével s és p síkban polarizált transzverz elektromos (TE) és mágneses (TM) módusra bontja, alulról felfelé az üveghordozó irányából a rácsra irányítja, és méri a becsatolási szöget a becsatolt fény intenzitásának függvényében. Az üveghordozó és a hullámvezető réteg határfelületére adott szögben beeső fény teljes visszaverődések sorozatával irányított fényterjedéssel, azaz hullámvezetéssel terjed. A fény hullámvezetőbe történő becsatolása függ a szenzor felett elhelyezkedő anyag törésmutatójától, a szenzor a jellemző becsatolási szög megváltozásával érzékenyen reagál a határfelületen történő változásokra (Bernard and Bosshard 1995; Piehler *et al.* 1997; Ramsden *et al.* 1997; Tiefenthaler 1992).



2.1. ábra Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia (OWLS) mérési elve

2.2.3. Felületi plazmon rezonancia (SPR)

A felületi plazmonok egy fém (az esetek többségében arany)-dielektrikum határfelületen a vezetési elektronok mozgásához kapcsolódó elektronsűrűséghullámok (Kroó, 2003). A felületi plazmonok kialakításához a fényt egy nagy törésmutatójú dielektrikus prizma (Kretschmann-elrendezés) segítségével csatolják be a tipikusan 50

nm vastag fémrétegbe (2.2. ábra). A plazmongerjesztés a fény egy adott beesési szögénél történik meg, ekkor a fémfelületről visszavert fény intenzitása minimumértéket mutat. A rezonanciának megfelelő beesési szög értéke függ a megvilágított fémréteg másik oldalával érintkező közeg törésmutatójától. A fém felületén rögzített biomolekulákhoz való bekötődés megváltoztatja a felülettel közvetlenül érintkező réteg törésmutatóját, amit a készülék a rezonanciaszög eltolódása alapján érzékenyen detektál. Az analitikai és kinetikai információt a rezonanciaszög időbeli változásának nyomonkövetése szolgáltatja (Gyurcsányi 2005; Brecht and Gauglitz 1997; Geddes *et al.* 1994).



2.2. ábra Felületi plazmon rezonancia mérési elve (Tőzsér et al. 2011)

Az SPR technika alapjait és bioszenzorként való széleskörű felhasználását számos összefoglaló tudományos cikk ismerteti (Wijaya *et al.* 2011; Safina 2012; Hoa *et al.* 2007; Šípová and Homola 2013; Petryayeva and Krull 2011). 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. Oh *és mtsai* (2003, 2004) SPR szenzort fejlesztettek *Legionella pneumonia* kimutatására. A szenzor felszínén G-fehérje önszerveződő monorétegén (SAM) rögzítették a monoklonális antitestet, a módszerrel elért detektálás alsó határa 10⁵ telepképző-egység/ml (TKE/ml) volt. Ugyanezen kutatócsoport 11-merkapto-undekánsavval képezett SAM-réteghez kapcsolt G-fehérje segítségével kapcsolta az SPR szenzor felszínéhez a *Salmonella typhimurium* meghatározását lehetővé tevő antitestet, a lineáris méréstartomány 10²-10⁹ TKE/ml értékűnek adódott.

2.2.4. 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 (2.3. ábra). A fáziskülönbség függ a felületen lévő réteg vastagságától és törésmutatójától (Garipcan *et al.* 2011). Tsargorodskaya *és mtsai.* (2004) ellipszometriás méréssel vizsgálták marhaszérumalbumin (BSA) adszorpcióját porózus szilícium-oxidon.

dc 457 12



2.3. ábra Az ellipszometria mérési elve (Petrik, 2011; Φ_0 – beesési szög, p – a beesési síkkal párhuzamos polarizációs irány; s – p-re merőleges irány; a beeső lineárisan polarizált fény reflexió után általános esetben elliptikusan polarizált lesz)

2.2.5. Kvarckristály-mikromérleg (QCM)

A kvarckristály-mikromérleg a piezoelektromos hatás alapján működő rendkívül érzékeny tömegmérő rendszer. Az arannyal bevont kvarckristály-érzékelő váltóárammal magas frekvenciájú rezgésbe hozható (2.4. ábra). Ez a stabil oszcillációs frekvencia a kristályra rakodó molekulák hatására megváltozik, és ezt a frekvenciaváltozást detektálják. Ha a kristály felületére molekulák kötődnek, nő a tömege, s 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).

Kößlinger és mtsai (1992) az emberi immunhiányt okozó vírus (HIV) antitestek mérésére készített bioszenzorukban szintetikus HIV peptideket immobilizáltak piezoelektromos kvarckristály felületén. Az immunreakció hatására létrejött tömegváltozást az oszcilláló frekvencia mérésén keresztül, oszcillátor segítségével határozták meg. Park és mtsai (2000) a kvarckristály felületén Salmonella felületi antigénje ellen termelődött antitestet rögzítve, igen érzékenyen (3,2x10⁶–4,8x10⁸ TKE/ml koncentrációtartományban) tudtak kimutatni Salmonella thyphimurium-ot. Yakovleva és mtsai (2011) QCM szenzorok arany felszínén különböző eredetű lektint rögzítve vizsgálták a különböző Campylobacter jejuni törzsek kötődését. A baktériumtörzsek a disszipációs jelek eltolódása alapján megkülönböztethetőek voltak egymástól.



2.4. ábra A kvarckristály-mikromérleg mérési elve (Kim et al. 2008)

2.3. Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia elvi alapjai

Az új vizsgálati módszerek akkor jöhettek létre, amikor a fény visszaverődésének törvényszerűségeit nemcsak felismerték, de mérni is tudták. Isaac Newton a XVII. században végzett kísérletei során felfedezte, hogy a fény teljes visszaverődésének fázisváltozása az üveg / levegő határánál lévő vékony réteg jelenlététől függ (Newton, 1704). Az 1950-es években terjesztették ki a Fresnel-féle visszaverődési törvényeket olyan határfelületekre, ahol különböző anyagokból való vékony réteg van jelen. A 70-es években jött létre az integrált optika. Fejlődését két irány fémjelzi, egyrészt a telekommunikációban az egész világot behálózó optikai szálak alkalmazása, amelyek a környezettől elszigetelt integrált hullámvezetők, másrészt pedig az egyre inkább előtérbe kerülő sík hullámvezetőszenzoroké (Vörös, 1999).

Hazánkban is számos tudományos műhelyben kezdték meg a hullámvezetők kutatását, így Tóth *és mtsai* (1997) sík hullámvezetőt alkalmaztak teljes belső reflexiós (TIR) méréseknél, amelyet K-ionszelektív optód membránnal egészítettek ki. A mikroszkóplemezből kialakított hullámvezető felszínén rögzítették a K-szelektív komplexet tartalmazó karboxilált PVC-alapú optódmembránt, amellyel 20 s válaszidőt és 0,05 mmol/l kimutatási határt értek el. Kovács *és mtsai* (2003) hasonló kísérleti elrendezéssel karbamid mérésére alkalmas bioszenzort fejlesztettek ki, ammónium meghatározására alkalmas PVC-membránt és ureáz enzimet tartalmazó hidrogélt rögzítve a hullámvezetőn.

Egy EUREKA MEMOCS (Membrane –coated optical grating coupler sensors) ipari együttműködés keretében 1994-ben a KFKI (ATKI) és a MikroVákuum Kft. részvételével kezdődött a ráccsal csatolt hullámvezető bioszenzorok kutatása Magyarországon. Ekkor kezdte meg a MikroVákuum Kft. az Artificial Sensing Instruments (ASI) AG (Zurich, Svájc) szabadalma alapján saját fejlesztésben a ráccsal csatolt hullámvezető szenzorstruktúrát gyártani és kereskedelmi forgalomban értékesíteni. A szenzorgyártás stabilizálódását követően kezdődtek a szenzor-kiértékelő műszerfejlesztések, amelyek eredményeképpen a 90-es évek végére megjelentek a kereskedelemben az úgynevezett OWLS típusú mérőberendezések (www.owlssensors.com).

A fény hullámtermészetéből következően az optikai rácson illetve a hullámvezető közeg határáról visszaverődő fény optikai tulajdonságai (diffrakció) függnek a hullámvezetőt körülvevő közeg optikai adataitól, paramétereitől. Az optikai hullámvezetőkre eső fény kölcsönhatásba kerül az evaneszcens mezőben a környezetével. Az evaneszcens mező egy alacsony és egy nagy törésmutatójú közeg határán jön létre az alacsony törésmutatójú közegben akkor, ha a nagy törésmutatójú közegből érkező fény teljes visszaverődést szenved a közeghatáron. Az evaneszcens mező vastagsága néhány száz nanométer, és intenzitása exponenciálisan csökken a közeghatártól távolodva (Horváth 2011). Ez a fizikai jelenség teszi lehetővé a hullámvezetők alkalmazását a határfelületen végbemenő folyamatok vizsgálatára, detektálására többféle technika megoldás alkalmazható (pl. ráccsal történő ki-becsatolás esetén a ki-, illetve becsatolási szögek mérése, Mach-Zehnder interferométer). Az evaneszcens mezőben végbemenő változásokat különböző folyamatok okozhatják, pl.:

- az evaneszcens térben lévő anyagok optikai sűrűsége (denzitása) változhat,
- réteg képződhet a felületen (*adlayer*), amelynek a polarizálhatósága különbözik az őt körülvevő egyéb közegtől,

• az oldatok összetételének változása miatt a törésmutató módosul (Erdélyi *et al.* 2008).

A ráccsal csatolt hullámvezető felépítése többféle lehet, a legelterjedtebb a Balzers-féle félvezető technikával készülő struktúra, valamint az ASI – MikroVákuum Kft. által szol-gél technológiával készített szenzorstruktúra. Az OWLS technikánál alkalmazott szenzor két fő részből áll: egy kisebb törésmutatójú (1,5) üveghordozóból, és az arra felvitt vékony (160-220 nm), nagy törésmutatójú (1,8) hullámvezető rétegből. A hullámvezető rétegen van az optikai rács, aminek a segítségével fény becsatol a hullámvezetőbe (2.5. ábra). A mérésnél a rácsot alulról polarizált He-Ne lézer (632,8 nm) fénnyel világítjuk meg. A *chip*et tengelye mentén kis szögtartományban (±10°) forgatva a lézernyaláb felett, a fény a rácson megtörik, illetve szóródik, és meghatározott szögértékeknél – az ún. becsatolási szögnél – belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával terjed. A bevezetett fénymennyiség detektálása a *chip* két végén elhelyezett fotodiódával történik. A becsatolás a polarizált fény két módusnak (transzverzális elektromos, TE és transzverzális mágneses, TM) megfelelően, két jól meghatározott beesési szög esetén jön létre.



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

A TM és TE fénymódusok segítségével mérhető a hullámvezető minőségi paramétereinek változása (pl. vastagság és/vagy törésmutató), továbbá а módusegyenletek segítségével közvetlen kapcsolatot lehet teremteni a hullámvezető paraméterei és az evaneszcens térben lévő mérendő anyagok tulajdonságai között. A felületi plazmon rezonancia (SPR) technikával a TM módus mérhető, a hullámvezető interferométer különböző formáinál is egy módus mérésére van lehetőség. Az ellipszometria esetében a megfelelő módus egyenletek alakja miatt a mért paraméterek kevésbé érzékenyek a mérendő réteg vastagságára és törésmutatójára, mint az OWLS esetében. A ráccsal csatolt optikai hullámvezető érzékenysége meghaladja az SPR szenzorét (Lukosz 1991). A becsatolási szögeket mechanikus goniométerrel lehet meghatározni, a szögmérés elérhető pontossága összemérhető a fényforrás monokromatikusságának mértékével, a hullámvezető anyagának hőstabilitásával. Ha a hullámvezetők becsatolási szögét urad felbontással mérjük, elegendő néhány tized °C pontossággal termosztálni az OWLS berendezést. Lukosz (1995) valamint Ramsden és mtsai (1997)összehasonlította a különböző hullámvezetésen alapuló szenzortechnikákat. Kiemelték a hullámvezető alapú szenzorok előnyeit (beleértve, hogy az OWLS technika elméletileg egy nagyságrenddel érzékenyebb, mint az SPR), és

kiemelték, hogy a TE és TM módushoz tartozó két független becsatolási szög mérésével a szenzor felületén lévő adszorbeált réteg két független paramétere határozható meg. Ugyanakkor a becsatoláson alapuló technika hátránya, hogy a forgó alkatrészek miatt nem miniatürizálható, és nem lehet sokcsatornás *array*-rendszert kialakítani. Az OWLS eljárás a flexibilitása, valamint az alapinformációk minősége és mennyisége alapján azonban nagyon alkalmas kutatás-fejlesztési feladatok elvégzésére.

2.3.1. Elméleti háttér – elektromágneses hullám terjedése hullámvezetőben

Két dielektrikum (F és S, törésmutatójuk n_F és n_S) határfelületére α szögben beeső fénysugár megtörik, és a jól ismert Snellius-Descartes-törvénynek megfelelően β szögben halad tovább (1).

$$n_S \sin \alpha = n_F \sin \beta \tag{1}$$

Ha $n_F > n_S$, akkor $arcsin(n_S/n_F) < \beta < \pi/2$ beesési szög esetén teljes visszaverődés történik a határfelületen. Ha az F közeg vékony, nagy törésmutatójú dielektrikum, akkor benne a teljes visszaverődések sorozatából irányított fényterjedés, azaz hullámvezetés jöhet létre.



2.6. ábra A hullámvezető sugároptikai szemléltetése (λ_0 – a lézer hullámhossza, *D* – a rácsállandó, α – beesési szög, β – haladási szög az üvegrétegben, γ – visszaverődési szög, *k* – térerővektor)

A fényt az optikai rács csatolja be a hullámvezetőbe (2.6. ábra). Az x irányban a fény terjedését a térerővektor k_x komponense szabja meg, aminek segítségével meghatározható a hullámvezetőre jellemző N effektív törésmutató (2).

$$k_x = k_0 n_F \sin \gamma = k_0 N \tag{2}$$

ahol $k=2\pi/\lambda$ a vákuumbeli hullámszám, n_0 a levegő törésmutatója, γ a visszaverődés szöge.

A filmbe a fény β szögben lép be, a térerővektor (k) vízszintes komponense (3):

$$k_x = k_0 n_F \sin\beta \tag{3}$$

A felületen lévő optikai rács által visszavert fény elindul a hullámvezetőben, és a sorozatos visszaverődés során önmagával interferál. Hullámvezetés csak abban az esetben jön létre, ha a becsatolt fény önmagával fázisban van, azaz egy "cikk-cakk" során $2\pi m \ (m=0,1,...)$ fáziseltolást szenved (4).

$$n_F D(\sin \gamma - \sin \beta) = m\lambda_0 \qquad (4)$$

ahol λ_0 a lézer hullámhossza, *D* a rácsállandó.

A visszavert fény hullámvezetésének meghatározására a hullámvektor x irányú komponensét a (2) egyenletbe behelyettesítve megkapjuk a becsatolási feltétel egyenletét (5):

$$N - n_F \sin\beta = m\lambda_0 / D \tag{5}$$

A fény a levegőből az üvegszubsztráton keresztül jut a hullámvezetőre α_0 beesési szögben, amit mérünk. A Snellius-Descartes-törvény alapján β meghatározható (6):

$$n_0 \sin \alpha_0 = n_F \sin \beta \tag{6}$$

Az egyenlet alapján akkor jön létre a hullámvezetés, ha (7)

$$n_0 \sin \alpha_0 = N - m\lambda_0 / D \tag{7}$$

Mivel az elektromágneses teret két független módussal jellemezhetjük (TE és TM), a hullámvezetőt két törésmutató jellemzi, N_{TE} és N_{TM} . Ennek megfelelően az α_{TE} és α_{TM} becsatolási szögekből mindkét módusnál meghatározható a törésmutató, az N_{TE} és az N_{TM} . Ha feltételezzük, hogy m=0, akkor (8)

$$N_{TE} = n_0 \sin \alpha_{TE} \quad \text{és} \quad N_{TM} = n_0 \sin \alpha_{TM} \quad (8)$$

Abban az esetben, amikor a törésmutató csak a z irányban változik és nincs adszorbeálódott anyag a felületen, a Maxwell egyenleteket megoldva kiszámolhatjuk a fáziseltolódást a transzverz elektromos (TE) és a transzverz mágneses (TM) hullámokra. Így kapjuk meg a háromrétegű hullámvezető egyenleteit (Vörös *et al.* 2002). Ezeket az adatokat alkalmazhatjuk a négyrétegű hullámvezető egyenleteinek megoldásához is, amikor a felületen adszorbeált réteg is jelen van (a levezetés további részleteiről ld. Lukosz, 1995; Hild 2011; Tiefenthaler 1992).

A levezetésben szereplő n_F , n_C , n_S törésmutatók és a hullámvezető d_F vastagsága ismert (azaz mérhető) mennyiségek, N az effektív törésmutató, n_A és d_A pedig a hullámvezetőre adszorbeálódott réteg törésmutatója illetve vastagsága, amit mérünk. Ha a két különböző módusra megmérjük az N effektív törésmutatót, akkor az így kapott két egyenletből n_A és d_A kiszámítható. Ezt a két paramétert a Feijter-egyenletbe (Malmsten 1994) behelyettesítve, meghatározható az egységnyi felületre adszorbeálódott tömeg (9):

$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc}$$
(9)

A *dn/dc* értéke a felületre adszorbeálódott anyag törésmutatójának a koncentrációtól való függésére jellemző, és precíziós törésmutató-méréssel (pl. interferométerrel) mérhető. Értéke a fehérjék többségére egységes és gyakorlatilag állandó: 0,182 ml/g. Ennek az állandónak ismeretében kalibráció nélkül tudjuk a szenzor felületén kötött fehérjék, különböző biomolekulák tömegét meghatározni.

A tömegszámítás három- és négyrétegű modellekkel történő levezetése elsősorban a felületen adszorbeálódott molekulák tömegének meghatározására alkalmas, munkánk során azonban többrétegű modellekkel dolgoztunk. Az immunreakcióban a meghatározandó fehérje már az ötödik vagy hatodik réteg volt az alkalmazott rögzítési módtól függően, ezért nem bizonyított, hogy a mért (látszólagos) tömegváltozás tényleg megfelel a szenzor felületén kötődő molekulák tömegének. Ennek megfelelően az ábrákon nem a ng/cm² mértékegységet tüntettük fel, hanem az "egység"-et (*arbitrary unit*, a.u.), ez azonban nem befolyásolta az eredményeinket, mert minden esetben alkalmaztunk standard oldatokat a kalibrációhoz, illetve minták értékeléséhez.

A hullámvezetők tehát alkalmasak a felületen végbemenő folyamatok vizsgálatára, ugyanakkor kinetikai mérések is közvetlenül végezhetőek a szenzor gyors válaszának köszönhetően. Ezek alapján lehetőség kínálkozik az adszorpciós réteg (*adlayer*) képződésének, mechanizmusának vagy élő sejtek fiziológiai válaszának magyarázatára.

2.3.2. Elektrokémiai-OWLS technika

hullámvezető fénymódus-spektroszkópiát Az optikai voltammetriás elektródokkal kiegészítve lehetővé vált a szenzor felületén végbemenő folyamatok egyidejű elektrokémiai vizsgálata is (EC-OWLS). A szenzor felszínét borító hullámvezető réteget a korábban alkalmazott szilícium-oxid - titán-oxid helyett indiumoxid - ón-oxid keverékéből készítve (ITO) az optikai szenzornak megfelelően nagy a törésmutatója, ugyanakkor mivel elektromosan vezető réteg keletkezik, a felület munkaelektródként is kiválóan alkalmazható. A mérőcellát elektrokémiai átfolyó cellával kiegészítetve az ITO-mérőelektród mellett a Pt referencia- és az Ag segédelektród is helyet kapott. Az optikai vizsgálatokat elektrokémiai mérésekkel kiegészítve, az EC-OWLS technika új lehetőségeket teremt a szenzor felületén adott potenciálon végbemenő molekuláris adszorpciós folyamatok vagy egy adszorbeált réteg vastagságában bekövetkező változások in situ tanulmányozására (Vörös et al. 2002; Brusatori and Van Tassel 2003). Loaiza és mtsai (2007) munkájuk során a rögzített próba és a target DNS elektródfelületen történő hibridizációját metilénkék, mint elektrokémiai indikátor alkalmazásával mérték. Berganza és mtsai (2007) által kifejlesztett DNS-bioszenzor esetében az elektrokémiai jelátalakító felületen rögzített egyszálú DNS-próbához kapcsolódó Escherichia coli 0157:H7 komplement target DNS-szekvenciáit ciklikus voltammetriás méréssel detektálták. A polarizáló feszültség alkalmazása elősegítheti a natív biomolekulák, illetve sejtek rögzítését.

2.3.3. Integrált optikai hullámvezető szenzorok

A szenzor üveglapon kialakított speciális üvegréteg, amelynek törésmutatója (n_{F} ~1,6-2,2) nagyobb, mint az alkalmazott üvegé (1,45-1,51), homogén anyagú, egyenletes vastagságú. A kialakítani kívánt hullámvezető törésmutatóját a SiO₂ (n~1,45)

esetében különböző átlátszó fémoxidok, esetünkben TiO₂ (n~2,0-2,4) adagolásával lehet növelni. A SiO₂-TiO₂ felületén a Si és a Ti atomokhoz kapcsoltan hidroxilcsoportok, azaz szilanol, illetve titanolcsoportok találhatók. Ezek száma függ a SiO₂/TiO₂-aránytól, valamint a szenzor készítésénél alkalmazott hőkezelés mértékétől. A TiO₂ mennyiségének növelése javítja a felület vízmegkötő képességét. Azonos körülmények között, nagyobb TiO₂-aránynál a hullámvezető pórusaiban, valamint annak felületén megkötött víz mennyisége is nagyobb (Perry and Li 1992). Más anyagú hullámvezetők is használatosak, pl. tantál-pentoxid (Ta₂O₅, Optics Balzers) titán-dioxid (TiO₂), ittriumoxid (Y₂O₃, Corning), szilícium-nitrid (Si₃N₄).

Az üveghordozón a megfelelő SiO₂-TiO₂ összetételű réteg előállítása különböző technológiával történhet, pl. vákuumtechnikai módszerekkel (elektronsugaras párologtatással, illetve vákuumporlasztással), szol-gél oldatból centrifugálással (*spin coating*) vagy az adott oldatba mártott hordozó lassú kihúzásával (*dip coating*). A hullámvezető rétegben alakítják ki a nagy periodicitású (frekvenciájú) rácsot (rendszerint 2000-3000 vonal/mm), amely gyártási technológiája a rétegkészítés módszeréhez igazodik.

Az említett vákuumtechnikai eljárások alkalmazásánál az érzékelő aktív részét, a lézer becsatolására szolgáló optikai rácsot fotolitográfiai vagy kémiai maratással, illetve ionos (plazma) maratással lehet kialakítani. A szenzorok gyártására alkalmas berendezések ugyan nagyon fejlettek, azonban igen drágák közepes mennyiségű hullámvezető előállítására.

A fenti nanostruktúrák nagy tömegű, olcsó előállítására gazdaságos eljárást biztosít a szol-gél technika alkalmazása. Ennek során Si-alkoxid (Si(OR)₄) és Ti-alkoxid (Ti(OR)₄) oldatoknak az adott törésmutató biztosításához megfelelő arányú keverékéből homogenizált kolloidot állítunk elő. A kezelést követő szárítás és hőkezelés után képződött vékony rétegben az előre tervezett Si-Ti-arány alakul ki, biztosítva a megfelelő törésmutató-értéket. Nagy fordulatszámú (1000-10000 fordulat/perc) és rendkívül gyorsan (a másodperc tört része alatt) felpörgő centrifugát alkalmazva lehetőség van a vákuummal vagy mechanikailag rögzített üveglapon homogén Ti-Sitartalmú, egyenletes vastagságú szol-gél réteg kialakítására. A hullámvezető réteg kialakítása történhet az üveglemez lassú (kb. 1,5 mm/s) egyenletes sebességű kihúzásával a kolloid oldatból, vagy a szol-gél oldat turbulenciától mentes leeresztésével. A korábban említett rétegkészítési eljárással szemben ez utóbbi módszerrel az üveglemez mindkét oldalán kialakul a hullámvezető üvegréteg (Lukosz and Tiefenthaler 1985). A rács kialakítása a még képlékeny, frissen képződött szol-gél rétegben "formázással", azaz mesterráccsal való nyomással történik. Az ezt követő hőkezeléssel véglegesíthető, stabilizálható a kialakított rács, amely 5-20 nm mély és 2 mm széles. A rácssűrűség rendszerint 2400 vonal/mm (Yoldas 1980; Szendrő 2001).

Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiát új szenzorral bővítve lehetővé vált a szenzor felületén végbemenő folyamatok elektrokémiai vizsgálata is (EC-OWLS). A szenzor felszínét borító indium-oxid – ón-oxid (ITO) egyaránt megfelel nagy refraktív indexű hullámvezetőnek és elektromosan vezető elektródnak. Az ITO átlátszó, jó elektromos vezető képességű vékony réteg, melyet főként a szerves fénykibocsátó diódákhoz (OLED technológia), a folyadékkristályos képernyőkhöz, monitorokhoz (LCD) és napelemekhez használnak. Az ITO-bevonat e két előnyös tulajdonsága ellenére nem ideális katód, mivel elektronátadási képessége a felületén heterogén (Liau *et al.* 2001). Az ITO vezetőképességének megőrzésére jó eredményt szolgáltat az oxigénplazmás kezelés, amely maradéktalanul eltávolítja a szennyeződéseket.

2.4. Bioszenzorok kialakítása a hullámvezető szenzor felszínén

Az integrált optikai hullámvezető szenzorokat eltérő feladatok megoldására, különböző vizsgálatokra használhatjuk. Alkalmazhatjuk őket kémiai szenzorként, biomolekulák adszorpciós tulajdonságainak vizsgálatára vagy bioszenzorként.

2.4.1. A hullámvezető felület tisztítása, hidratálása

A SiO₂-TiO₂ hullámvezető a levegőben található szerves szennyeződéseket képes adszorbeálni. Ennek következtében felülete hidrofóbbá válik a tárolás során. Ezért használat előtt a szenzort tisztítani és hidratálni kell. A felület tisztításánál tekintettel kell lenni a hullámvezető anyagának oldhatósági tulajdonságaira. Míg a TiO₂ savas és lúgos közegben megőrzi stabilitását, addig a SiO₂ oldhatósága pH-függő, erősen savas közegben igen stabil, lúgos közegben (pH>8) történő hosszú, dinamikus használatot követően viszont kismértékű oldódás tapasztalható (Kennedy and Cabral 1987; Weetall and Filbert 1974).

A hullámvezető tisztítására, hidratálására többféle fizikai és/vagy kémiai módszer használatos. Fizikai módszerként hőkezelést, ultrahangos vagy oxigénplazmakezelést használnak. А legtisztább, "leghidrofilebb" felület oxigénplazma alkalmazásával érhető el (Xiao et al. 1998). Kémiai tisztításra különböző savakat (pl. kénsav: Matveev 1994, perkénsav: Ramsden and, Schneider 1993, krómkénsav: Charles et al. 1993; Maupas et al. 1996; Brecht et al. 1993; Bier and Schmid 1994, sósav: Suri et al. 1994, salétromsav: Williamson et al. 1989; Weetall 1993; Williams and Blanch 1994), ritkábban lúgokat (pl. nátrium-hidroxid, ammónium-hidroxid), oxidálószereket (hidrogén-peroxid) vagy detergenseket (pl. Deconex: Buckle et al. 1993; Clerc and Lukosz 1997) alkalmaznak a szerzők, különböző hőmérsékleteken.

A tisztított szenzor a nagyméretű biomolekulák (fehérjék) vagy sejtek felületi adszorpciójának vizsgálatára közvetlenül alkalmas. Ekkor a vizsgált molekulák, sejtek a szenzor felületéhez másodlagos kötőerőkkel, fizikai adszorpcióval kapcsolódnak. A kötődés reverzíbilis, az alkalmazott közeg pH-jának, ionerősségének változásával a vizsgált biomolekulák, sejtek lemosódhatnak a felületről. Scott *et al.* (2008) munkája során bioaktív mikrogélek fibrinogén-kitapadást csökkentő hatását vizsgálta, Hug *és mtsai* (2001) pedig fehérjék és sejtek felülethez kötődését tanulmányozta OWLS méréssel.

A biomolekuláknak a hullámvezető, mint hordozó felületén történő kovalens rögzítése azonban bonyolultabb, többlépéses folyamat. Mivel a hullámvezető felületén található hidroxilcsopotok nem alkalmasak fehérjék rögzítésére, ezért a SiO₂-TiO₂ szenzor felületén különböző felületmódosító eljárásokkal különböző aktív rétegek, reaktív csoportok alakíthatók ki.

2.4.2. Hullámvezetőn alkalmazható felületmódosítási eljárások

Az utóbbi években, évtizedekben a bioszenzor-technika robbanásszerű fejlődésének köszönhetően nagyon sok felületmódosító eljárást fejlesztettek ki. Most csak néhány, a hullámvezető szenzorok alkalmazásánál jellemző eljárást mutatok be, nem törekedve a rögzítési technikák teljeskörű ismertetésére.

A Langmuir-Blodgett-technikával különböző filmbevonatok készíthetőek (Blodgett and Langmuir 1937). Az eljárás során, a víz felszínén lévő amfipatikus molekulák monomolekuláris rétege függőleges kihúzással áttelepíthető a szilárd

hordozóra. A Langmuir-Blodgett-filmleválasztási módszerrel a felületen homogén, nagysűrűségű, tetszőleges vastagságú molekularéteg alakítható ki (Peterson 1990). A technikát elsősorban folyadék-levegő-határfelületen irányítottan megoszló vegyületek esetén alkalmazzák, pl. membránképző foszfolipideknél, ahol a molekula poláros része a víz felé orientálódik, az apoláros zsírsavlánc ugyanakkor a vízből kiszorul és a levegő felé fordul. Langmuir-Blodgett-film számos hordozón kialakítható, leggyakrabban az üveget használják hordozóként. A kialakított filmréteg optikai módszerekkel vizsgálható. A Langmuir-Blodgett-technikát napjainkban előszeretettel alkalmazzák nanorészecskéken való filmképzésre. A Langmuir-Blodgett-filmek segítségével leggyakrabban antitesteket (Ahluwalia et al. 1992, Dubrovsky et al. 1993) és lipideket rögzítenek a szenzor felületére. Ramsden és Schneider (1993) SiO₂-TiO₂ optikai Langmuir-Blodgett-technikával alakítottak ki hullámvezető felületén kettős glikolipidmembránt, amellyel felületi proteáz enzim membránrétegbe történő beépülését vizsgálták. A film kialakítása történhet az eredeti, tisztított szenzorfelületen vagy a már módosított (szilanizált) felületen is.

A lipidkettősrétegek a természetben nem folytonosak, hanem azt a felülethez kötődő vagy azon áthatoló, egyedül vagy csoportosan elhelyezkedő fehérjemolekulák szakítják meg. Ez a szerkezet dinamikus, mozgékony, de termodinamikailag stabil. Ezért jól alkalmazhatók a szenzorfelületen kialakított transzmembrán fehérjéket magukban foglaló lipidkettősrétegek a vízoldható molekulák transzportfolyamatainak tanulmányozására. A lipidkettősrétegben kötött fehérjék ugyanakkor megfelelő körülmények között elég stabilak, immunszenzorok kialakítására használhatók. (2000)lipidkettősréteg alkalmazásával tanulmányozta Ramsden perforin а immunfehérje hatását, Bürgel és mtsai (2010) liposzómák képződését és aggregációját követték nyomon. Csúcs és Ramsden (1998) a detergensek hatását tanulmányozták a lipidkettősrétegekre, Stadler és mtsai (2010) pedig a lipidkettősrétegben rögzített DNSszálak hibridizációját vizsgálták reaktív oxigéngyökök jelenlétében.

Az avidin-biotin-komplexet a bioanalitika számos területén alkalmazzák, mivel a biotin és az avidin vagy a sztreptavidin között kialakuló másodlagos kötés a természetben előforduló legnagyobb affinitású kötés. A komplexképződés rendkívül gyors, a reakció rendkívül specifikus (Wilchek and Bayer 1988). A biomolekulák szenzorfelületen történő rögzítésének legegyszerűbb módja, amikor a felületen először az avidinmolekulát adszorbeáltatják, majd ehhez kötődik a rögzíteni kívánt molekula biotinilált származéka (Polzius *et al.* 1996; Börchers *et al.* 1997; Wood 1993). Az avidint vagy sztreptavidint gyakran nem az eredeti szenzorfelületen, hanem szilánvegyületekkel vagy dextránmátrix-szal módosított felületen kovalensen rögzítik, majd ehhez kötik a szenzorfelület érzékenyítésére szolgáló biotinilált biomolekulát (Polzius *et al.* 1996; Watts *et al.* 1995).

Börchers *és mtsai* (1997) 10-800 bp hosszúságú PCR-termékek detektálására alkalmas, regenerálható OWLS szenzorukban a próba DNS-t avidin–biotin-hídon keresztül rögzítették oly módon, hogy a Ta₂O₅ hullámvezető felületén az avidin adszorbeálódott, majd ehhez rögzítették a biotinilált próbaszekvenciát. A szenzort az egyes mérések között 1 mmol/l koncentrációjú sósavoldattal regenerálták. Wood (1993) 40-mer oligonukleotid szakasz kimutatására karboxi-metil-dextrán-felületen ugyancsak avidin–biotin-komplex-szel rögzített 20-mer DNS-próbát, majd a próba és cél DNS közötti hibridizációt SPR technikával követte nyomon. A mérés során a DNS denaturálását 56 °C-on, a hibridizálást 51 °C-on végezte. Ouerghi *és mtsai* (2002) vezetőképességi mérésen alapuló immunszenzort fejlesztettek úgy, hogy a szenzor

felületére elektrokémiai úton biotinilált polipirrolréteget választottak le, majd avidinnel rögzítették a biotinilált antitestet (anti-human IgG).

2.4.3. Szilanizálás

A fémoxid alapú üveghordozókon, mint az OWLS technikánál használt hullámvezető szenzor SiO₂-TiO₂ felületén található kevés hidroxilcsoport korlátozott lehetőséget biztosít a biomolekulák közvetlen kovalens kötéssel való rögzítéséhez. A fém-oxidok felületének módosítására az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárással, a szilanizálással a felületen különböző funkciós csoportok alakíthatók ki, amelyeken a molekulák méretüknek, szerkezetüknek megfelelően közvetlenül vagy további módosítást követően kovalens kötéssel, illetve a korábban említett eljárásokkal rögzíthetőek. A szilanizálás további előnye, hogy a felületet a külső behatásokkal szemben is ellenállóbbá teszi. A szilanizált üvegfelület pl. lúgra kevésbé érzékeny.

A szilánok általános képlete: R_n Si $X_{(4-n)}$, ahol n=1, 2, 3,

X olyan hidrolizálható csoport, amely a szilán és a hordozó közötti sziloxánkötés kialakításában vesz részt (pl. alkoxi-, amino- vagy klórcsoport). Leggyakrabban alkoxi-szilánokat alkalmaznak, ahol az alkoxicsoport metoxi- (X=OCH₃) vagy etoxi-(X=OCH₂CH₃) csoport.

R olyan nem hidrolizálható funkciós csoport, amely a szilanizált felületen rögzíteni kívánt molekula megfelelő csoportjához közvetlenül, vagy közvetett módon, keresztkötő vegyületek segítségével kapcsolódik. A funkciós csoportok sokfélék lehetnek (pl. amino-, epoxi-, ciano-, vinil-, szulfhidril-, fenilcsoportok).

A hosszú alkilláncú, egy hidrolizálható csoportot tartalmazó (mono)szilánok a hordozó felületén monomolekuláris réteget képeznek. Ezek a vegyületek erős hidrofób felületet biztosítanak, hidrolitikus stabilitásuk azonban kicsi, idővel lemosódnak a felületről. A rövid szénláncú, két hidrolizálható csoportot tartalmazó szilánvegyületek a funkciós csoportok hidrolízisével, vízvesztéssel lineárisan polimerizálódnak, ezt követően kötődnek a hordozó felülethez. A rövid szénláncú, három hidrolizálható csoportok csoportot tartalmazó szilánok а hidrolízisekor többszörösen összekapcsolódnak, ezáltal egy háromdimenziós, erősen keresztkötött hálózat jön létre (Wang et al. 1994). A rövid szénláncú di- és trialkoxi-szilánok tehát a felületen multimolekuláris réteget alkothatnak. A szilanizálást követő hőkezelés során a megkötött rétegben a szomszédos molekulák még szabad reaktív csoportjaik révén kapcsolódnak, horizontálisan is polimerizálódnak. A trifunkciós szilánok kissé rideg, merev felületet biztosítanak, de maximális hidrolitikus stabilitást adnak a szilanizált anyagnak. A rétegvastagságot elsősorban az alkalmazott szilánvegyület (szénlánc hossza, hidrolizálható csoportok száma) és az oldószer típusa, az oldat koncentrációja, víztartalma befolyásolja, de fontos tényező az oldat pH-ja, a kezelés hőmérséklete és időtartama is. A szilanizálás történhet oldatban, mind vizes mind pedig szerves fázisban, illetve gőzölögtetéssel, a kezelést minden esetben hőkezelés követi (Bier and Schmid 1994; Suri et al. 1994). A kialakított réteg vastagságát a szilanizálást követő hőkezelés is befolyásolja, a kialakítható szilánréteg vastagsága általában néhány nanométer (Spinke et al. 1997; Jönsson et al. 1985; Xiao et al. 1997).

2.4.4. Biomolekulák rögzítése szilanizált szenzorokon

A felületre szilanizálással felvitt funkciós csoportok – leggyakrabban aminocsoportok – közvetlenül vagy származékképzés után alkalmasak a biomolekulák rögzítésére (2.7. ábra). A 3-amino-propil-trietoxi-szilán (APTS) reagenssel szilanizált,

aminocsoportokat hordozó felület több más felületmódosító eljárás alapját képezi. 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. Maguk a rögzítendő molekulák is aktiválhatók, de mivel a molekulák fehérje természetüknél fogva érzékenyek a kémiai kezelésekre, az aktiválásnak ezt a módját csak ritkán alkalmazzák. Az aktiválás történhet rövid bifunkciós keresztkötő vegyülettel (pl. glutáraldehid) vagy más, reaktív csoport kialakítására alkalmas vegyületekkel (pl. karbodiimidek, 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid (EDC) / N-hidroxi-szukcinimid (NHS), Hunt *et al.* 2010). A keresztkötő vegyületek a hordozó és a fehérje megfelelő csoportjait "hídként" kötik össze, míg más aktiváló szerek az aktiválást követően, a rögzítés során lehasadnak a hordozó felületéről, így a fehérje közvetlenül a hordozóhoz kapcsolódik.



2.7. ábra Különböző felületmódosítási eljárások alkalmazásával kapott felületi rétegek funkciós csoportjai

(APTS – 3-amino-propil-trietoxi-szilán, GOPS – 3-glicidoxi-propil-trimetoxiszilán, EDC – 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)karbodiimid-hidroklorid, NHS – N-hidroxi-szukcinimid, CMD – karboximetil-dextrán)

Az aminocsoportok aktiválására leggyakrabban a glutáraldehidet használják, mivel a molekula két végén található aldehidcsoport alkalmas két aminocsoport összekapcsolására. Az aktiváláshoz rendszerint 1-2,5%-os frissen hígított vizes glutáraldehidoldatot használnak (Watts *et al.* 1994; Ye *et al.* 1997; Williamson *et al.* 1989; Bier and Schmid 1994). Ye *és mtsai* (1997) a patogén *Salmonella typhimurium* kimutatására dolgoztak ki QCM szenzort, a mikrobára specifikus antitestet rögzítve a szenzor arannyal bevont felületén. A rögzítést polietilén-iminnel módosított, glutáraldehiddel aktivált felületen végezték. Az aminocsoport borostyánkősavanhidrides kezeléssel egy lépésben karboxilcsoporttá alakítható, ezen a felületen alkalmazható az EDC/NHS rögzítési eljárás a hordozófelület aktiválására. Az EDC amino- és karboxilcsoport összekapcsolására alkalmas karbodiimid, amely az aktiválás során az NHS karboxilcsoporthoz való kötődését teszi lehetővé. Az NHS kötődésével a fehérje aminocsoportjai számára könnyen támadható szukcinimid-észter alakul ki, amely a rögzítés során lehasad a hordozóról, és a fehérje közvetlenül a karboxilcsoporthoz kapcsolódik (Watts *et al.* 1994; Johnsson *et al.* 1991).

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 rögzíthetőek a biomolekulák. Johnsson *és mtsai* (1991) SPR szenzoron protein-A-receptort (antigént) rögzítettek karboxi-metil-dextránnal borított, CM5 típusú *chip* felületén EDC/NHS kémiával, majd a receptor és különböző ellenanyagok kötődését vizsgálták. Watts *és mtsai* (1995) 40 bp hosszúságú cél-DNS-szakasz mérésére fejlesztettek ki regenerálható rezonanciatükör-szenzort, melynek felületét 20-mer DNS-próbával érzékenyítették. A rögzítés során a CMD reagenssel borított küvetta felületét először EDC/NHS technikával aktiválták, kovalensen rögzítettek rajta sztreptavidint, majd az így kialakított felülethez kötötték a biotinilált DNS-próbát. A szenzorfelületet az egyes mérések között 1 mmol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid oldattal regenerálták.

2.5. Immunszenzorok az élelmiszer-biztonság és a környezetanalitika területén

Az ipari és környezeti szennyező anyagok a mezőgazdaság, az ipar, a bányászat, a közlekedés, a hulladéklerakóhelyek és -égetők, az atomreaktorok működése következtében jutnak közvetlenül a környezetbe vagy közvetve az élelmiszerekbe. Kémiai és toxikológiai tulajdonságaikat tekintve igen sokfélék, számos rendkívül veszélyes és igen perzisztens, a táplálékláncon át feldúsuló anyag van közöttük, amelyeknek minőségi és mennyiségi kimutatására az analitika széles tárházát alkalmazzák, újabb és újabb technikai, metodikai fejlesztésekről beszámolva. Jelen dolgozatban csak azokra a szennyező anyagokra térek ki, amelyeknek meghatározására munkánkban sikeresen dolgoztunk ki gyors, jelölésmentes eljárást. Kutatásaink során trifluralin szermaradvány, különböző, növénypatogén gombák által termelt mikotoxinok, allergiás reakciót okozó biogén amin, a hisztamin, valamint az endokrin zavaró vegyületek hatására képződő vitellogenin gyors monitorozására, kimutatására fejlesztettünk immunszenzorokat. Bakteriális szenzorokat alakítottunk ki vizsgálva a különböző kémiai szerek mikroorganizmusokra gyakorolt hatását. A bakteriális szenzorok kifejlesztéséhez az EC-OWLS technika adta lehetőségeket is bemutattuk, mivel a jól megválasztott állandó polarizációs feszültség hatására a sejteket nem kellett kovalens kötéssel rögzíteni, ami a túlélésüket jelentősen befolvásolta. Kidolgoztunk egy, a rekombináns E. coli BL21AI-sejtek rögzítésére alkalmas bioszilika alapú rögzítési eljárást, ami fiziológiás körülmények között végbemenő immobilizálást tette lehetővé.

2.5.1. Trifluralin szermaradvány környezeti- és élelmiszermintákban

A trifluralin (CAS No 1582098) dinitro-anilin-származék növényvédőszerhatóanyag, amelyet az 1960-as évek óta alkalmaztak a mezőgazdaságban szelektív, vetés illetve palántázás előtt alkalmazható herbicidként. Elsősorban gabonák, zöldségek, gyümölcsök és diófélék termesztésénél alkalmazták, azonban az utóbbi évtized intenzív vizsgálata során kimutatták, hogy talajbeli perzisztenciát mutat, máj- és vesekárosító, valamint immunszupresszív hatású (Francis *et al.* 1991; Moody *et al.* 1991; Byrd *et al.* 1995). Az eredmények alapján a trifluralint az EU endokrin zavaró vegyületnek minősítette (Commission of the European Communities, 2001), sőt későbbi kutatások alapján a trifluralint is azon szerek közé sorolták, amelyek esetében összefüggést találtak a gyermekkori daganatos megbetegedések és a növényvédőszeres szennyezés mértéke között (Gunier *et al.* 2001). A trifluralin koncentrációjának megengedett határértéke az ivóvízben 0,1 μ g/l, élelmiszerekben, elsősorban zöldségekben 0,05-0,1 μ g/kg az EU előírásai szerint.

A trifluralin meghatározására UV spektrofotometriás (Traore and Aaron 1989), folyadékkromatográfiás eljárásokat alkalmaztak (Fang *et al.* 1998; Garimella *et al.* 2000), majd a tömegspektrometriás detektálás került előtérbe (Asperger *et al.* 2001). Számos gázkromatográfiás módszerről is beszámoltak kutatók, pl. egy több növényvédőszer együttes meghatározására alkalmas eljárásról, amely kimutatási határa megfelel a nemzetközi előírásoknak (Karasali *et al.* 2006). A trifluralin elektroaktív tulajdonságát kihasználva szénnanocsövekkel érzékenyített üveges szénelektródot készítettek, a detektálás alsó határa ennek alkalmazásakor 2,0x10⁻⁹ mol/l értékűnek adódott (Wen *et al.* 2008). Mirabi-Semnakolaii *és mtsai* (2011) szénpasztába ágyazott réznanocső kompozit elektróddal 0,02-100 nmol/l méréstartományt értek el. Az enzimhez kapcsolt immunszorbens eljárás (ELISA) kifejlesztése (Hegedűs *et al.* 2000) nyomán került sor a trifluralin-immunszenzor kialakítására.

2.5.2. Mikotoxinok megjelenése az élelmiszerláncban

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 mikotoxinok közül a legfontosabbak a zearalenon (ZON, F-2 toxin), az aflatoxin és az ochratoxin valamint ezek származékai (Sohár és Varga 2003).

A *Fusarium* gombatörzsek által termelt **zearalenon** (ZON)-származékok közül a ZON a legjelentősebb, mint a növényi termékek természetes szennyezője, kémiai szerkezetét tekintve rezorcilakton (2.8. ábra). A *Fusarium* a gabonaféléket már a földeken megtámadja. A gomba növekedése és különösen a toxin képződése a betakarítás után is folytatódik, ha a termény kezelése és szárítása nem megfelelő. A zearalenon a gabonaféléken felületi szennyeződésként jelenik meg, a malomipari feldolgozás után a korpába kerül (Pleadin *et al.* 2012). Ösztrogénhatású anyag, a méh és a tejmirigyek megnagyobbodását, fokozott váladékozást, rendszertelen ivarzást, vetélést, a spermatermelés zavarát mutatták ki sertéseken (Modrá, Svobodová 2009). Rákkeltő hatása nem bizonyított.



ZEARALENON

2.8. ábra A zearalenon szerkezeti képlete

Az **aflatoxinok**at elsősorban az *Aspergillus flavus* és az *A. parasiticus* termeli. A természetben előforduló legfontosabb aflatoxinok a B1, B2, G1 és G2, amelyek kémiailag benzpirén szerkezetű, többszörösen konjugált, policiklusos vegyületek, míg a tejben az aflatoxin M_1 és M_2 hidroxilált metabolitok választódnak ki (2.9. ábra). Az aflatoxinok májkárosodást okoznak, genotoxikus és immunszupresszív hatásúak, egyes származékainak toxicitási sorrendje a következő: B1>G1>B2>G2. Leggyakrabban a

földimogyorón találjuk meg, de előfordul más élelmiszerekben (pl. szója, rizs, köles, kukorica, zab, bab, kávé, paprika) és takarmányféleségeken is. Elsősorban meleg égövi országokban, csapadékos, magas páratartalmú időben gyakoriak; bár az utóbbi időben a környező országokban is megjelent az éghajlatváltozás hatására (Tirado *et al.* 2010). Dobolyi *és mtsai* (2011, 2013) bizonyították, hogy az aflatoxin-termelésre képes *Aspergillus flavus* – hasonlóan a szomszédos országokhoz – hazai kukoricatermő területeken is megjelent.



2.9. ábra Az aflatoxinszármazékok képlete

és Penicillium-fajok **Ochratoxinok**at az Aspergillustermelnek, és leggyakrabban a gabonafélékben, hüvelyesekben (kakaó-, kávé- és szójababban) rizsben, borban, aszalt gyümölcsökben, fűszerekben fordulnak elő (2.10. ábra). Kémiai szerkezetük szerint dihidro-kumarinhoz kapcsolódó β-fenilalanin-származékok, amelveknek két alapváltozata ismert. A és B toxin, illetve ezek etil- és metil-észterszármazékai. Az ochratoxin A toxinok klórszármazékok, ezért erősen toxikusak: vesekárosító, rákkeltő, immunszupresszív hatásúak, idegrendszeri problémákat, légzési nehézséget okoznak, teratogén vegyületek, felezési idejük hosszú, lassan ürülnek ki a szervezetből. Hazai éghajlati körülmények között is képződhetnek, mivel a raktári penészgombák termelhetik a takarmányokban a rossz tárolás következtében, a toxinképződés széles hőmérséklet tartományban felléphet (4-30 °C között), koncentrációjuk egyes gócokban igen nagy lehet (Ramos et al. 1998).



OCHRATOXIN A

2.10. ábra Az ochratoxin A szerkezeti képlete

A deoxinivalenol (DON), más néven vomitoxin B-típusú trichotecénvázas vegyület, epoxi-terpenoid-származék (2.11. ábra). A DON elsősorban gabonákban fordul elő, (búza, árpa, zab, rozs, kukorica), búzán a szemek üszkösödését, kukoricában a kalász rothadását okozza, elsősorban a *Fusarium graminearum* és a *F. culmorum* gombák termelik (Schollenberger *et al.* 2005; Papadopoulou-Bouraoui *et al.* 2004; Speijers and Speijers 2004; Pleadin *et al.* 2012). A DON akut hatásai közé az émelygés, hányás, hasmenés, has- és fejfájás, láz tartozik, sertéseken is megfigyelhetőek a DON toxin okozta emésztési problémák, hányás, csökkenő súlygyarapodás (D'Mello *et al.* 1999; Modrá and Svobodová 2009).



2.11. ábra A deoxinivalenol szerkezeti képlete

Az Európai Bizottság az élelmiszerekben előforduló mikotoxinok megengedett határértékét már évtizedekkel ezelőtt meghatározta. A közvetlen emberi fogyasztásra vagy felhasználásra szolgáló áruk aflatoxin B1 tartalma 2 μ g/kg, összes aflatoxinszennyezettsége 4 μ g/kg, az ochratoxin maximális mennyisége 5-50 μ g/kg, míg ZON-tartalma 30-1000 μ g/kg lehet (Stroka and Anklam 2002). A Codex Committee on Food Additives and Contaminants (2006) ajánlata alapján az étkezési gabonákban a ZON megengedett határértékét 5 μ g/kg értékre kell csökkenteni. Magyarországon az étkezési korpában a DON megengedett határértéke 1200 μ g/kg, míg egyéb cereáliákban 1000 μ g/kg.

A fenti elvárásoknak megfelelően a mikotoxinok azonosítására és mennyiségi meghatározására mind pontosabb, egyre kisebb kimutatási határral rendelkező analitikai módszerekre van szükség (Monaci and Palmisano 2004). A mikotoxinok vizsgálata során már számos analitikai eljárás kidolgozására került sor (Turner et al. 2009). A vizsgálatok közül a vékonyréteg-kromatográfia (TLC, Whitaker 2003), túlnyomásos rétegkromatográfia (OPLC; Móricz et al. 2007), kapilláris elektroforézis (Pena et al. 2002) és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárások а legelterjedtebbek. Napjainkban számos kutató alkalmaz tömegspektroszkópiás detektorral csatolt kromatográfiás eljárásokat, mint pl. a LC-MS-MS (Sherma 2000; Sulvok et al. 2010). Az utóbbi időben számos erőfeszítés történt immunanalitikai eljárások bevezetésére és nagyérzékenységű, gyors analitikai méréstechnikák kifejlesztésére. Az immunreakciót Nabok és mtsai. (2013) zearalenon és aflatoxin kivonására is alkalmazták, nátrium-polisztirol-szulfonáttal és poli(allil-amin klorid)-dal borított MnCO3 mikrorészecskéken a megfelelő antitestet rögzítve. A különböző mikotoxinok meghatározására antigén-antitest-reakción alapuló módszerek közül immunassay (ELISA tesztcsomagok, Clarke et al. 1994; Rousseau et al. 1987; Xiao et al. 1995; Gathumbi et al. 2003; Korde et al. 2003; Lipigorngoson et al. 2003), valamint fluoreszcens immunassay (Nasir et al. 2003; Carlson et al. 2000) terjedt el. Monitorozásra antitest alapú immunaffinitáson alapuló kolonnák (Gathumbi et al. 2003; Carlson, et al. 2000; Aydin, et al. 2007; Chun, et al. 2007; Stroka et al. 2003; Huebner and Phillips 2003) és liposzómák rögzítésével készített nitrocellulóz-tesztcsík (Ho and Wauchope 2002) kifejlesztésére került sor. Több szerző számolt be jelölésmentes immunanalitikai eljárás kidolgozásáról tömegszelektív SPR (Gaag et al. 2003; Yuan et al. 2009; Kadota et al. 2010), valamint QCM detektor (Prieto-Simon et al. 2007) alkalmazásával aflatoxin és ochratoxin gyors meghatározására.

2.5.3. Hisztamin előfordulása élelmiszerekben, szelektív meghatározása

A biogén aminok jelen vannak az élő szervezetekben, és részt vesznek különböző nélkülözhetetlen élettani folyamatokban, ugyanakkor nagy koncentrációban felelősek az élelmiszer-mérgezésekért (Zaman *et al.* 2009; Schwelberger 2009). Kisebb mennyiségben élelmiszer-intoleranciát válthatnak ki (Bodmer *et al.* 1999; Jansen *et al.*

2003; Maintz and Novak 2007), elsősorban a hisztaminlebontás genetikai zavara miatt (Maintz et al. 2011). Az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló biogén aminok a hisztamin, a putreszcin, a kadaverin, a tiramin, a triptamin, a p-fenil-etilamin, a spermin, spermidin és az agmatin. A biogén aminok elsősorban halakban а és hústermékekben, halkészítményekben, sajtokban, fermentált zöldségekben, szójatermékekben, borokban és sörökben fordulhatnak elő (Shalaby 1996). Hisztamin (2.12. ábra) sokféle élelmiszerben jelen lehet, de a nagy hisztidin-dekarboxilázaktivitással rendelkező mikroorganizmusok is termelik (Suzzi and Gardini 2003; Carsol and Mascini 1999).



2.12. ábra A hisztamin szerkezeti képlete

A biogén aminok és ezen belül a hisztamin koncentrációját fermentált élelmiszerekben, pl. savanyú káposztában ellenőrizték (Kalac *et al.* 1999; Tsai *et al.* 2005), a hisztamin vagy a hisztamintermelő baktériumok jelenléte alapján pedig a mustok és borok eredetét igazolták (Herbert *et al.* 2005; Kiss és Sass-Kiss 2005). A biogén aminok vizsgálatának másik igen fontos területe a halak és a tenger gyümölcseinek vizsgálata, a hisztamin, a kadaverin és az agmatin koncentrációja jelzi pl. a tonhalak frissességét (Ruiz-Capillas and Moral 2005). Élelmiszerekben a hisztamin koncentrációja a biogén aminok kumulatív szennyezésének indikátora lehet, felhalmozódása megelőzi az érzékszervileg felismerhető "romlást", ezért a mennyisége az élelmiszer frissességét, higiéniai minőségét, gyártási és tárolási körülményeit jelzi. A Codex Alimentarius (1995) határértéke alapján a hisztamin koncentrációja nem haladhatja meg a 100 mg/kg határértéket.

A hisztamin koncentrációjának meghatározására számos eljárást alkalmaznak, köztük vékonyréteg-kromatográfiával gyors, félkvantitatív módszert fejlesztettek ki (Lieber and Taylor 1978), majd OPLC eljárással növelték az elválasztás hatékonyságát, csökkentették az idejét (Simon-Sarkadi *et al.* 1997). HPLC módszert kolonna előtti vagy utáni derivatizálással alkalmazták (o-ftálaldehiddel vagy danzil-kloriddal), az eljárással ugyan párhuzamosan meghatározható több biogén amin koncentrációja, azonban a módszer hosszadalmas minta-előkészítés igényel (Meitz and Karmas 1978; Hui and Taylor 1983; Veciana-Nogues *et al.* 1995; Saito *et al.* 1992; Moret *et al.* 2005). Az ELISA eljárások szelektív és kellően érzékeny (1-500 mg/kg) módszernek bizonyultak, de bonyolult minta-előkészítés és hosszú inkubációs idő szükséges meghatározásukhoz (Serrar *et al.* 1995, Simon-Sarkadi *et al.* 2003).

Hisztamin gyors meghatározására tesztcsíkot készítettek, ez azonban csak szűk koncentrációtartományban alkalmazható (Hall *et al.* 1995). Li *és mtsai* (2006) SPR alapú indirekt versengő immunszenzort fejlesztettek ki, amelynek gátlási középértéke (IC₅₀) 7 ng/ml és a LOD 3 ng/ml hisztamin. Az utóbbi években is több kutatócsoport foglalkozott a hisztamin szelektív meghatározására alkalmas szenzorok fejlesztésével, köztük biomimetikus rétegekkel, MIP-pel és különböző detektorokkal, pl. impedancia-spektroszkópiával (Bongaers *et al.* 2010; Broeders *et al.* 2011), mikrogravimetriával (Horemans *et al.* 2010) vagy piezoelektromos szenzorral (Pietrzyk *et al.*2009) történtek próbálkozások.

Munkánk során hisztamin kimutatására alkalmas immunszenzort fejlesztettünk ki, amit fermentált zöldséglevek vizsgálatára alkalmaztunk.

2.5.4. Vitellogenin koncentrációjának meghatározása

A mezőgazdaságban a termés védelme érdekében számos, az emberi szervezetre káros növényvédő szert alkalmaznak világszerte. Ezek közül is kiemelkedően veszélyesek azok a hatóanyagok, amelyek a nem célszervezetek szervezetébe jutva, ott különböző mértékű károsodást okoznak. Ezek legtöbbször kis koncentrációban vannak jelen, így közvetlen toxikus hatást nem váltanak ki, jelenlétük azonban folyamatos, így hosszú távú hatásaikkal számolnunk kell. Ezen anyagok egyik csoportját alkotják az élőlények hormonális rendszerét károsító ún. endokrin zavaró (ED) vegyületek, amelyek különböző mechanizmusokon keresztül megzavarják a hormonháztartást, gátolják bizonyos enzimek működését, az ivarszervek normális fejlődését, ezáltal szaporodási zavarokat okoznak.

Halakban, kétéltűekben a máj által előállított vitellogenin a legfontosabb al. alkotóeleme szikfehérjéknek (Tyler et 1991). vérplazma а А vitellogeninkoncentrációja a nőstény egyedekben vitellogenezis kezdetén hirtelen megnő, és a növekedési fázis végéig azonos szinten marad. A vér magas vitellogeninkoncentrációja a vitellogenezis alatt az oocyta növekedését eredményezi. Biotesztekkel igazolták, hogy az állati szervezetekben termelődő, hagyományos úton nehezen meghatározható vitellogenin fehérje vérbeli koncentrációja az ED hatású szennyezők hatására a hímek vérszérumában is abnormális szintre emelkedhet (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 jelenlétnek felismeréséhez. Gyakori előfordulása miatt a ponty (Cyprinus carpio) – más halakhoz hasonlóan – alkalmasnak bizonyult az endokrin zavarók hatásának monitorozására a vérben található Vtg szintjének meghatározásával (Solé et al. 2000; Bervoets et al. 2009; Tlili et al. 2010). A hím pontyok vérében lévő magas Vtg-koncentrációért a vizeket szennyező növényvédő szerek (pl. atrazin és alaklór, Chang et al. 2005; Mikula et al. 2009), műanyaglágyító szerek (ftalátok, Barse et al. 2007), egyéb vegyületek (biszfenol A, Letcher et al. 2005), valamint a szerves mikroszennyezők (Sumi et al. 2007; Hinck et al. 2008; Falfushynska and Stolyar 2009; Güngördü and Ozmen 2011) felelősek.

A Vtg meghatározására számos eljárást fejlesztettek ki. Több kutatócsoport fejlesztett ki ELISA módszert halak, köztük ponty vizsgálatára (An *et al.* 2008; Van Veld *et al.* 2005; Barucca *et al,* 2006; Hennies *et al.* 2003). Scott *és mtsai* (2006) tőkehal-lipovitellin (Lpv) rögzítésével vizsgálták a Vtg mennyiségét. Parks *és mtsai* (1999) amerikai cselle (*Pimephales promelas*) Vtg fehérjéjének tisztításáról számoltak be, és szendvics-ELISA eljárást fejlesztettek a Vtg-koncentrációjának meghatározására. Brion *és mtsai* (2002) zebrehalat (*Danio rerio*) vizsgáltak ELISA eljárás kialakításával.

Az elmúlt időben a Vtg mérésére szolgáló bioszenzorok kifejlesztésére is sor került. Darain *és mtsai* (2003; 2004) különböző típusú szenzort készítettek; vezetőképességi detektoron és amperometriás mérőcellán alapuló immunszenzort alakítottak ki, vezető polimerrel módosított szitanyomott szénpasztaelektródon rögzítve a ponty-Vtg fehérjét. A szenzor dinamikus méréstartománya 0,25-7,8 ng/ml, a LOD pedig 0,09 ng/ml volt. Fukada *és mtsai* (2003) kemilumineszcenciás immunszenzort dolgoztak ki ponty-Vtg meghatározására, a módszerrel 1,95-1000 ng/ml méréstartományban határozták meg a Vtg koncentrációját. Jelölésmentes eljárásokat

ismertettek kutatók ppm tartományban alkalmazható SPR immunszenzorra (Bulukin et al. 2007), valamint QCM immunszenzorra (Oshima et al. 2005).

2.6. Mikrobiológiai vizsgálatok

A bioszenzorkutatások területén a mikrobiológiai vizsgálatok több irányban folynak, egyrészt nagyon fontos feladat egyes mikroorganizmusok jelenlétének szelektív meghatározása az élelmiszer-alapanyagokban és az élelmiszerekben. Másrészt pedig különböző baktériumok alkalmazásával mikrobiális szenzor készíthető pl. növényvédőszer-maradványok, antibiotikumok jelenlétének gyors monitorozására, vagy szennyvizek biológiai oxigénigényének meghatározására.

2.6.1. Baktériumok kimutatására alkalmas eljárások

Az élelmiszeriparban a mikrobák megítélése igen sokrétű. Egyrészt a baktériumok felelősek az élelmiszerek romlásáért és néhány, élelmiszeren keresztül terjedő betegségért. Másrészt az évszázadok óta fogyasztott fermentált élelmiszerekben a feldolgozás során szükséges változásokat is mikrobák hozzák létre. A probiotikus baktériumoknak kulcsfontosságú szerepe van az egészségünk védelmében. Az élelmiszereket szennyező mikrobák közül az utóbbi időben több fertőzést okozott a *Salmonella enteritidis*, amely elsősorban szárnyasokban, sertéshúsban, tenger gyümölcseiben mutatható ki, esetenként a feldolgozó eszközök felületének rossz higiéniai állapota miatt. Húskészítményekben, gyümölcslevekben, nyers tejben az *Escherichia coli*, tejben, lágy sajtokban, fagylaltban, nyers húsokban, nyers, illetve füstölt halakban a *Listeria monocytogenes*, valamint felszíni vizekben a *Vibrio cholerae* okozhat fertőzést.

A mikroorganizmusok vizsgálatában illetve, bioszenzorok alkalmazásában is megnyilvánul ez a sokszínűség. A hagyományos mikrobiológiai eljárások időigényesek, ezért egyre fontosabb a gyorstesztek, bioszenzorok, és a rekombináns DNS alapú eljárások fejlesztése bizonyos patogén fajok specifikus meghatározásához. Számos törekvés van a mikrobák kimutatásának gyors és szelektív meghatározására antitest és DNS alapú eljárásokkal. A valós idejű és mennyiségi meghatározásra alkalmas új analitikai eljárások kidolgozása során a legtöbb kutatás az E. coli kimutatására alkalmas szenzorok kialakítására irányult; szelektív meghatározására különböző felépítésű immunszenzorokat fejlesztettek ki. Számos elektrokémiai detektálással párosított bioszenzort dolgoztak ki az E. coli meghatározására, köztük anti-E. coli antitestet elektródon (Sippy et al. 2003) vagy szűrőbetéten (Carnes and Wilkins 2005) rögzítve, majd a HRP enzimreakciót követően amperometriás detektálást, illetve vezetőképesség mérést alkalmazva (Muhammad-Tahir and Alocilja 2003; 2004). Subramanian (2006) polietilén-glikol alapú önrendeződő monomolekuláris réteggel (SAM) rögzítette SPR szenzor felszínén a tisztított monoklonális vagy poliklonális E. coli O157:H7-szelektív antitestet, és az így érzékenyített szenzorral mérte a mintában található sejtszámot. Washa és mtsai (2006) ugyancsak SPR alapú bioszenzort fejlesztettek ki tejminták vizsgálatára.

Baktériumok szelektív felismerésére és mennyiségi meghatározására az E-QCM szenzor felületén különböző lektineket rögzítve készítettek bioszenzort. Serra *és mtsai* (2008) concanavalin A (Con A) fehérjét rögzítettek avidin–biotin-kötéssel a QCM szenzor aranyfelületére, és vizsgálták az *E. coli* kötődését polarizált és nem polarizált cellában mérve. Számos eljárást ismertettek, ahol a biomolekulákat nanorészecskéken rögzítve antigén–antitest-immunreakció, komplementer DNS-szekvencia meghatározása

vált lehetségessé a biofunkcionalizált nanorészecskék alkalmazásával (Yang *et al.* 2008). Több kutatócsoport ismertette különböző mikrobák kimutatására szolgáló módszerét, pl. QCM szenzort alkalmazva *Listeria monocytogenes* vizsgálatára (Vaughan *et al.* 2001), míg Wong *és mtsai* (2002) különböző *Salmonella*-törzsek szelektív meghatározásának lehetőségét ismertették. Cooper *és mtsai* (2009) *Legionella pneumophila* szelektív meghatározására alkalmas módszert mutattak be OWLS detektálással.

2.6.2. Mikrobiális szenzorok alkalmazása kémiai zavaró hatások, gátlások kimutatására

A mikrobiális szenzorok kialakításához az élő sejteket a szenzorok felszínén kémiai és fizikai módszerekkel rögzíteni kell, azonban az alkalmazott rögzítési mód jelentősen befolyásolja a sejtek életképességét. A kovalens kötések stabil kapcsolatot teremtenek, azonban ennek érdekében az egész sejtet veszélyes kémiai reagenseknek, reakcióközegnek kell kitenni, amely roncsolhatja a sejtfalat, és csökkentheti a biológiai aktivitást (Lei et al. 2006). A sejteket lényegesen enyhébb körülmények között lehet gélbezárni, pl. Trichosporon cutaneum és Bacillus subtilis baktériumokat együtt rögzítettek szilíciumtartalmú szol-gél mátrixban (Jia et al. 2003). A baktériumsejteket grafitelektród felszínén kitozánmátrixban rögzítettek, és így készítettek mikrobiális bioszenzort (Odaci et al. 2008). Biolumineszcenciásan jelzett baktériumot polivinilalkohol-kriogélből képzett vékony rétegben rögzítettek Philp és mtsai (2003), míg Premkumar és mtsai (2002) szilikafilmet alkalmaztak a rögzítéshez. Karasinski és mtsai (2007) az amperometriás jelek alapján tanulmányozta a különböző baktériumokra ható szermaradványok jelenlétét, és az oxigén felhasználásának direkt mérése alapján vizsgálták a széles spektrumú antibiotikumok légzési aktivitásra gyakorolt gátló hatását. Galindo és mtsai (1998) teljes sejt alapú bioszenzort fejlesztettek ki ß-laktamázban gazdag E. coli-sejtek pH-elektród felszínén történő rögzítésével. Odaci és mtsai (2009) Gluconobacter oxydans sejtjeit szénnanocsöveken kitozánnal rögzítve fejlesztettek ki bioelektrokémiai mérőrendszert.

Az E. coli antibiotikumok jelenlétében való szaporodásának kimutatására bioszenzort készítettek, amely mikromechanikai oszcillátor segítségével 2 órán belül eredményt szolgáltat (Gfeller et al. 2005). Biolumineszcenciás szenzort fejlesztettek E. coli-törzsek alkalmazásával hidrogén-peroxid, fenol és mitimicin C (Kim and Gu 2003), valamint klóramfenikol és ofloxacin (Shapiro and Baneyx 2007) gyors és érzékeny kimutatására. Különböző típusú antibiotikumokat biolumineszcens baktériumtörzsekkel kis koncentrációban vizsgálva kimutatták, hogy a bioaktív vegyületek gátlási hatásmechanizmusa szerint a DNS- és a fehérjeszintézis, valamint a sejtfal és a folsavmetabolizmus gátlása tapasztalható (Eltzov et al. 2008). Pellegrini és mtsai (2004) bioszenzort fejlesztettek tejben előforduló gyógyszerhatóanyagelektrokémiai maradványok (kinolin, tetraciklin) detektálására a széndioxid-termelés változásának mérésével. Choi és mtsai (2005) fenol kimutatására alkalmas jelölésmentes szenzort fejlesztettek szintetikus oligopeptiddel immobilizálva az E. coli O157:H7-sejteket SPR szenzor aranyfelszínén. Wex és mtsai (2006) a 3,5-diklór-fenol hatására bekövetkező baktériumgátlást vizsgálták különböző hőmérsékleten.

A patogén mikrobák vizsgálatán és a szermaradványok baktériumgátló hatásának meghatározásán túl a fermentációs technológiák során számos probiotikus mikroorganizmus tanulmányozása vált szükségessé. A tejsavbaktériumok jelen vannak a természetes humán bélflórában, és fontos szerepet játszanak a különböző élelmiszerek (pl. tejtermékek, sajtok, probiotikus zöldséglevek, húskészítmények) fermentálásában,

ezek közül a Lactobacillusok és a Bifidobacteriumok játszanak kiemelt szerepet (Fioramonti et al. 2003). A fermentációs folyamatok során a tejsavbaktériumok számos gátló anyaggal, kémiai közeggel találkoznak. Ilyen pl. a nagy sókoncentráció, a hőmérséklet változása, szerves savak jelenléte. A tejsavbaktériumok a fermentáció során tartósító hatású tejsavat termelnek, amely gátolja számos baktérium, élesztő- és penészgomba szaporodását az élelmiszerekben. Alacsony pH-n a tejsav jelentős hányada disszociálatlan formában van jelen, ezáltal passzív transzporttal átjuthat a sejtek membránján, megzavarva az elektrokémiai protongradiens kialakulását és befolvásolva a membrán átjárhatóságát, ami végül a szubsztráttranszport összeomlásához vezethet (Smulders et al. 1986; Lindgren and Dobrogosz 1990). Az ecetsav szinergista hatást mutat a tejsavval, mikor a tejsav hatására csökken a minták pH-ja, nő az ecetsav toxicitása (Adams and Hall 1988). A tejsavbaktériumok oxigén jelenlétében hidrogén-peroxidot képezhetnek, ami molekuláris szinten reagálhat a sejtfalalkotókkal, a fehérjékkel és a nukleinsavakkal. A hidrogén-peroxid a membránlipidek oxidációját okozhatja és a sejtfalfehérjékkel való reakció során változhat a sejtfal permeabilitása, az ozmoreguláció (Kong and Davison 1980).

2.6.3. Új, bioszilika alapú immobilizálás bioszenzorok fejlesztésére

Mint már korábban elemeztük, a mikrobiális szenzorok fejlesztése során igen kritikus feladat az élő sejtek rögzítése a szenzor felületén. Korábban német kutatók a szilíciumtartalmú exopolimert képző szivacsokból (*Suberites domuncula: Porifera, Demospongiae, Hadromerida*, Lim-csatorna, Isztria, Horvátország) enzimatikusan aktív fehérjecsoportot, ún. szilikateineket izoláltak, amelyek a szilícium-alkoxid (tetraetoxi-szilán, TEOS) polimerizációját / polikondenzációját katalizálják poliszilikáttá, amorf szilikaszálakat képezve kíméletes körülmények között (alacsony hőmérséklet, fiziológiai pH, Müller *et al.* 2007a,b).



2.13. ábra A szilikatein enzim feltételezett szerkezete (Müller *et al.* 2007a) (Sc – szilikatein enzim, S26 – szerin, N185 – aszparagin, H165 – hisztidin, α, β – alegység, ac – aktív központ)

A szilikatein enzim szerkezetének felderítése során a és b enzimatikusan aktív fehérjecsoportot, monomert (\approx 24 kDa) különböztettek meg, a térbeli elrendeződésre dimer, tetramer és hexamer formát feltételezve. További szerkezetvizsgálatok szerint az α és β módosulatok aránya 4:1, az α alegység aktív központját (ac) szerin (S26),

hisztidin (H165) és aszparagin (N185) jelenléte jellemzi, a szerinben gazdag rész a tetramer közepe felé helyezkedik el, közrefogva a szilikatein β egységet (2.13. ábra). A szilikatein enzim által katalizált reakció mechanizmusa a Ser/His tartalmú aktív centrumot tartalmazó proteineknek megfelelő séma szerint mehet végbe. A hisztidin imidazolgyűrűjének N-csoportja és a szerin aktív hidroxilcsoportja között lévő hidrogénhidas kötés következtében a szerin nukleofil oxigénatomja a szilíciummal etanol felszabadulása mellett protein-O-Si átmeneti terméket képez. Víz hatására az átmeneti komplex hidrolizál. A nukleofil Si-O- csoport és a következő TEOS-molekula Si-atomja között kondenzáció megy végbe, disziloxán termék képződik (Cha *et al.* 1999).

E. coli BL21AI módosított sejtekben szilikatein rekombináns fehérje képződik, amelynek hatására megfelelő körülmények között poliszilika-háló képződik, lehetővé téve a sejtek fiziológiai körülmények között való rögzítését STO szenzor felületén (Müller *et al.* 2007b).

3. CÉLKITŰZÉS

Az OWLS és az EC-OWLS technika fejlesztése és alkalmazási területének kibővítése érdekében végzett sokoldalú hazai (OTKA, NKFP, BIOTECH, GVOP) és nemzetközi együttműködés (EU5, EUROSTARS, TéT) keretében a szenzor felületének kémiai módosítását, immun- és mikrobiális szenzorok fejlesztését tűztem ki célul.

- A biomolekulák immobilizálásának elősegítésére APTS és GOPS reagenssel módosított szenzorokat készítettünk, kidolgoztuk a rögzítési eljárást.
- Immunszenzorokat fejlesztettünk ki gabona-, élelmiszer- és környezeti minták kis koncentrációban előforduló szennyezésének szelektív és érzékeny kimutatására:
 - Trifluralin növényvédőszer-maradvány kimutatására felszíni vizekből és gyümölcsléből.
 - Mikotoxinok kimutatására, ezen belül zearalenon kimutatására kukoricából, aflatoxin meghatárzására gabonákból és fűszerpaprikából, ochratoxin meghatározására gabonákból és vörösborból, deoxinivalenol kimutatására búzából.
 - Hisztamin szelektív vizsgálatára fermentált zöldséglevekből.
 - Az endokrin zavaró anyagok biomarkerének, a vitellogenin fehérjének pontyban és vöröshasú unkában történő meghatározására.
- Mikrobiológiai vizsgálataink során:
 - *E. coli*-sejtek szelektív vizsgálatára immunszenzoros eljárást dolgoztunk ki, vizsgáltuk az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek jele közötti különbséget.
 - Mikrobiális szenzorokat fejlesztettünk EC-OWLS technikával *Lactobacillus plantarum* 2142 sejtek (LAB) sejtekben különböző kémiai stresszhatások vizsgálatára.
 - Bioszilika keletkezését és kötődését vizsgáltuk az OWLS szenzoron, meghatároztuk a szilikatein enzim látszólagos K_M értékét.
 - Anti-szilikatein antitesttel végzett immunvizsgálatokkal igazoltuk a szilikatein jelenlétét módosított *E. coli*-sejtek felszínén.
 - Szilikatein termelő módosított *E. coli*-sejteket bioszilika segítségével rögzítve az STO szenzoron mikrobiális szenzort készítettünk, és különböző gátló szerek hatását vizsgáltuk.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Anyagok

A SiO₂-TiO₂ szenzorok felületének módosítása során alkalmazott 3-aminopropil-trietoxi-szilán (APTS) a Fluka (Neu-Ulm, Németország) terméke volt. A 3glicidoxi-propil-trimetoxi-szilánt (GOPS), a glutáraldehidet, a borostyánkősav anhidridet, az 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (EDC), valamint az Nhidroxi-szukcinimidet (NHS) a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

Az immunizáláshoz használt komplett és inkomplett Freund adjuvánst a Sigma-Aldrich Co. Ltd-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A konjugátumok készítéséhez valamint a modellmérésekhez 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) terméke volt. Minden további általános vegyszer alt. minőségű kereskedelmi termék volt.

4.1.1. Trifluralin kimutatása

A mérések során alkalmazott trifluralin, benfluralin és ethalfluralin hatóanyagokat, valamint a 2,6-dinitro-4-trifluorometil-1-klórbenzol intermediert a Budapesti Vegyiművek Rt.-től szereztük be. Az isopropalin és pendimethalin hatóanyagokat az Országos Növény- és Talajvédelmi Szolgálat (jelenleg Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal) biztosította.

4.1.2. Zearalenon kimutatása

A zearalenon, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol és β -zearalanol standardokat a Sigma-Aldrich Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

4.1.3. Aflatoxin B1 kimutatása

Az aflatoxin meghatározása során felhasznált aflatoxin B1 (*Aspergillus flavus*) mikotoxint és az aflatoxin B1-BSA konjugátumot (*A. flavus*) a Sigma-Aldrich Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. Az anti-aflatoxin monoklonális antitestet (1G7-1E2A) az Adgen Ltd (UK) biztosította a kísérletekhez. Az antitest aflatoxinra specifikus, ugyanakkor nagy a keresztreaktivitása a különböző aflatoxinokra (aflatoxin B1: 100%, B2: 62,5%, G1: 32,7%, G2: 100%, versengő ELISA módszerrel mérve).

4.1.4. Ochratoxin A kimutatása

Az ochratoxin vizsgálata során alkalmazott ochratoxin A (*Aspergillus oryzae*) mikotoxin és az ochratoxin A-BSA konjugátum (*A. oryzae*) a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) terméke volt. Az anti-ochratoxin monoklonális antitestet (AF-12) az Adgen Ltd (UK) biztosította a metodika fejlesztési feladatokhoz. Az antitest ochratoxin A mikotoxinra szelektív, (ochratoxin A: 100%, ochratoxin C: 8,24%, ochratoxin α : 0,6%, 4-OH-kumarin, kumarin és fenil-alanin: <0,01% keresztreaktivitás, aflatoxin B1: 1,7%, a T-2 toxin: 2,75%).

4.1.5. Deoxinivalenol kimutatása

A deoxinivalenol mikotoxint a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

4.1.6. Hisztamin kimutatása

A hisztamin, putreszcin, kadaverin, agmatin, spermin, spermidin, triptofán standardokat, valamint az anti-hisztamin antitestet (nyúlban termeltetett hisztamin-KLH konjugátum ellen, összes fehérje: 23,4 mg/ml) a Sigma-Aldrich Co. Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) rendeltük meg.

4.1.7. Vitellogenin kimutatása

A méréshez szükséges fehérjéket és antitesteket a munka során tisztítottuk, illetve készítettük.

4.1.8. LAB-sejtek alkalmazása

Lactobacillus plantarum 2142 sejteket a University of Perugia, Culture Collection of the Institute of Dairy Microbiology bocsátotta a KÉKI Mikrobiológiai Osztály rendelkezésére. A deMan Rogosa Sharpe (MRS) táptalajt a Merck Ltd.-től (Darmstadt, Németország) rendeltük meg.

A természetes táptalajként alkalmazott csicsókaszirupot *(Jerusalem artichoke, Helianthus tuberosus, JA 65,3°Bx 20 °C-on, 65,8% szárazanyag, 121 °C-on 15 percig sterilezve)* a KÉKI Technológiai osztály biztosította a mérésekhez.

4.1.9. *E. coli* alkalmazása

Az anti-*E.coli* antitestet ("O" és "K" szerotípusra) az Accurate Chemical & Scientific Corporation-től (NY, USA) szereztük be. Az *E. coli*-törzset (NCAIM B.00200, http://www.uni-corvinus.hu:8089/NCAIM/frameset.jsp) a KÉKI, Mikrobiológiai Osztály biztosította a kísérletekhez. A Luria-Bertani (LB) tápleves a Merck Ltd. (Darmstadt, Németország) terméke volt.

4.1.10. Módosított E. coli BL21AI-sejtek alkalmazása

A tetraetil-ortoszilikát (TEOS, Si $(OC_2H_5)_4$, 4,48 mol/l, 934 g/l, GC-grade) a Merck Ltd. terméke volt. A rekombináns *E. coli* BL21AI-sejteket, a rekombináns α -szilikatein enzimet (24 mg/ml), valamint az anti-szilikatein antitestet a NanotecMARIN GmbH (Mainz, Germany) bocsátotta rendelkezésünkre. Az *E. coli* B200-törzset (NCAIM B.00200, http://www.uni-corvinus.hu:8089/NCAIM/frameset.jsp) a KÉKI Mikrobiológiai Osztály biztosította a kísérletekhez.

4.2. Módszerek

4.2.1. OWLS mérőműszer

Lukosz *és mtsai* úttörő munkájának köszönhetően a becsatoláson alapuló optikai hullámvezető elvén működő berendezések kereskedelemben kaphatóak (Nellen, Lukosz 1990, Tiefenthaler and Lukosz 1989). Munkánk során a MikroVákuum Kft. által
gyártott berendezéssel (OWLS 120) dolgoztunk, az eredmények kiértékeléséhez BioSense 2.6. programot alkalmaztuk.



4.1. ábra Az OWLS berendezés működési sémája

A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába helyezve használjuk (4.1. ábra). A mérésnél a hullámvezetőn lévő rácsot polarizált He-Ne lézer (632,8 nm) fénnyel alulról világítjuk meg. A szenzort tengelye mentén kis szögtartományban ($\pm 10^{\circ}$) forgatva a lézernyaláb felett, a fény a rácson megtörik illetve szóródik, és meghatározott szögértékeknél – az ún. becsatolási szögnél – belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával terjed.



4.2. ábra A hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának, felületi borítottságának ábrázolása a lézerfény beesési szögének függvényében
(A (inzert) – adott *chip*re jellemző pillanatnyi intenzitásspektrum, α_{TE} -- transzverz elektromos fénymódus becsatolási szöge, α_{TM} -- transzverz mágneses fénymódus becsatolási szöge,

B – a hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának időbeli alakulása)

A becsatolt fény intenzitását a *chip* két végén elhelyezett fotodiódákkal detektáljuk. A pillanatnyi becsatolási szögeket mechanikus goniométerrel lehet meghatározni, 10⁻⁴ fok szögfelbontással mérhetők. A pillanatnyi becsatolási szögek

helyét (értékét) az intenzitásspektrum mutatja (4.2. A ábra). A jel felbontása az effektív törésmutatóra vonatkoztatva $\Delta N \sim 10^{-6}$. A fény mindkét síkban poláros módusának számított effektív törésmutatójából megkapjuk a hullámvezető felszínén a folyamatosan áramló oldatból megkötődött molekularéteg (pl. fehérje) vastagságát, illetve a felületi borítottságot (ng/cm², 4.2. B ábra). Az intenzitásspektrumok alapján mért becsatolási szögek időbeli változása alapján kapjuk a mérési görbét.

4.2.2. EC-OWLS mérőműszer

Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiát új szenzorral bővítve lehetővé vált a szenzor felületén végbemenő folyamatok elektrokémiai vizsgálata is (EC-OWLS). A szenzor felszínét borító hullámvezető réteget indium-oxid – ónoxidból (ITO) készítve az optikai szenzornak megfelelően nagy a törésmutatója, ugyanakkor elektromosan vezető réteg készíthető, ezt alkalmazzuk munkaelektródként. Az elektrokémiai átfolyó cellában az ITO-munkaelektród mellett a Pt-referencia- és az Ag-segédelektród teszi lehetővé az elektrokémiai vizsgálatokat.

4.2.3. Immunizálás, antitestek előállítása

Az adott antigénre specifikus nyúlszérumot fejlesztettünk vadas nyúlban történő immunizálással, Harboe és Inglid (1973) módszerét adaptálva. Az immunizálást a KÉKI Osztályán működő Állatházban végeztük. Az immunizálás Biológia kis molekulatömegű antigén esetén az antigén konjugátumával történt. Az alapimmunizálás során Freund-komplett adjuvánssal, míg az emlékeztető immunizálások Freundinkomplett adjuvánssal történtek. A tisztított antigént vagy antigénkonjugátumot 1 mg/ml koncentrációban 0,01 mol/l foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) (pH 7,4) oldottunk fel. A 0., 14., 28. és 42. napon a kb. 2-2,5 kg testtömegű nyulakat (2 nyúl/antigén) 25 µg antigén/kg nyúl testtömeg koncentrációjú antigén oldattal (50 µl fiziológiás sóoldat és 50 µl komplett/inkomplett Freund adjuváns) immunizáltunk lapocka közötti, többszöri injektálással. A kontrollszérumot az immunizálás előtt, illetve az immunszérumokat a marginális vénából, 8-10 nappal az emlékeztető oltások után vettük.

4.2.4. Antigénspecifikus, tisztított IgG előállítása

Az immunszérumokat kisózásos módszerrel IgG-re tisztítottuk (Harbo and Inglid 1973). 10 ml nyers immunszérumhoz lassú kevertetés mellett 10 ml 70%-os ammónium-szulfát-oldatot adtunk szobahőmérsékleten. A kémhatást ammóniával állítottuk be (pH 7,0). További kétórás kevertetés után a szuszpenziót centrifugáltuk (20 perc, 2500 fordulat/perc). A csapadékot 5 ml 0,01 mol/l PBS pufferben (pH 7,4) újraoldottuk, és 5 ml 70%-os ammónium-szulfát-oldatot adtunk hozzá. A szuszpenziót ismét 2 órán át kevertettük, majd centrifugáltuk az előbbiek szerint. A specifikus immunglobulinokat is tartalmazó nyúl-IgG-frakcióból álló csapadékot 5 ml 0,01 mol/l PBS pufferben (pH 7,4) feloldottuk és 10 mm×21 mm dializáló zsákba töltöttük (Serva, Visning). A dialízist 4 °C-on 2×12 óráig, kb. 20-szoros térfogatnyi pufferrel szemben végeztük. A tisztított szérum egy részét liofilizáltuk, másik részét mélyhűtőben tároltuk.

4.2.5. Referenciavizsgálatok ismertetése

4.2.5.1. ELISA eljárás referenciamérésekhez

Az ELISA vizsgálatokat 96-üreges ELISA mikrotálcán a szilárd fázisú immunassay elve alapján végeztük 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) fedtük. A lemezeket 0,01 mol/l PBS pufferral (0,8% NaCl, pH 7,4) való mosás után blokkoltuk üregenként 150 ul blokkoló reagenssel (1% zselatin PBS pufferben, pH=7,4) 38 °C-on 1 h inkubálással. A mikrotiterlemezt 0,2% Tween 20 detergenst tartalmazó PBS (PBST 0,2) oldattal mostuk, majd minden üregbe 50 µl standardot vagy mintát és 50 µl PBST 0,2 oldattal hígított antiszérumoldatot adtunk, és 38 °C-on 60 percig inkubáltuk. Újabb mosás után (PBST 0,2), 100 µl kecskéből nyert anti-nyúl-IgG-HRP konjugátumot (1:12000 hígításban PBST 0,05; BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) adtunk, és ismét 60 percig inkubáltuk. 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) adagoltunk. A szín kialakulása után (10 - 60 perc) az enzimreakciót 50 µl 4 N H₂SO₄ reagenssel leállítottuk. A színintenzitást az üregekben 492 nm hullámhosszon mértük. A mért értékekből a standard görbéket 4-paraméteres (szigmoid) egyenlettel készítettük. A detektálás alsó határa (LOD) az a koncentráció, amely a vakminta szórásának (3x ismétlés) háromszorosát adja.

4.2.5.2. GC/MS módszer trifluralin meghatározására

A trifluralin koncentrációjának meghatározását GC-MS (Saturn 2000, Varian Inc.) készülékkel végeztük. A vizsgálathoz CP-Sil 8CB kvarckolonnát használtunk (0,25 µm filmvastagság, 30 m x 0,25 mm I.D.), 5 µl mintabevitellel (*splitless*). Az injektor a hőmérsékletprogram szerint 60 °C-ot tartott 0,5 percig, majd 260 °C-ra fűtött fel 200 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 5 percig tartotta. A kolonna a hőmérsékletprogramja 70 °C-ot tartott 0,5 percig, majd 100°C-ra fűtött fel 6 °C/perc sebességgel, majd ezt követően 240 °C-ra fűtött fel 10°C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 20 percig tartotta. Vivőgázként héliumot alkalmaztunk, a nyomás 0,097 MPa volt, az ionizációs áram 350 µA, az elektronütköztetés energiája 70 eV. Az ioncsapdával elektronütközéses (EI) módban 40 és 650 amu között mértünk. A trifluralin vizsgálatához a kiválasztott ionok a 264 és 306 amu voltak.

4.2.5.3. Biogén aminok vizsgálata HPLC módszerrel

A referenciavizsgálatokat Alliance Waters 2690 HPLC kromatográfiás rendszerrel, fluorimetriás detektorral (l_{ex} =345 nm; l_{em} =455 nm) végeztük. A biogén aminokat oktánszulfonsavval történő ionpárképzéssel fordított fázisú kolonnán (µBondapak C18, 300*3,9 mm 10 µm; Waters) gradiens elúcióval választottuk el, majd a koncentrációjukat elválasztás után o-ftálaldehiddel és 2-merkapto-etanollal történő származékképzéssel határoztuk meg.

4.2.5.4. Lactobacillus plantarum 2142-sejtek vizsgálata referencia eljárással

A *L. plantarum* 2142-sejteket MRS táplevesben való szaporítást követően centrifugáltuk, és a sejteket a felülúszó elöntése után 10 ml steril vízben vettük fel. Kilencvenhat üregű mikrotiterlemez üregeibe 25 µl baktériumszuszpenziót és 225 µl 100x hígított csicsókaoldatot (JA) adtunk. A 250 µl 100-szorosára hígított JA-oldattal szemben mértük a baktériumszuszpenzió – sejtszámmal arányos – abszorbanciáját (630

nm). A gátló hatás vizsgálatához ugyancsak 25 µl LAB-szuszpenziót adtunk 225 µl 0,09 és 9,0 mmol/l hidrogén-peroxidot, 0,1 és 5 mol/l ecetsavat, valamint 0,1 mol/l és 5 mol/l tejsavat tartalmazó JA-oldathoz. Minden esetben az adott vizsgálatban alkalmazott oldattal szemben mértünk. Az abszorbanciát MR 7000 Dynatech ELISA Reader műszerrel mértük 630 nm hullámhosszon 0, 18, 22 és 24 h inkubálás után.

4.2.5.5. Referenciamérések az egyes gátló anyagok kimutatására *E. coli* BL21AI és *E. coli* B200-törzs összehasonlítására

Az E. coli BL21AI és E. coli B200-sejtek biológiai tulajdonságát, így különböző gátló anyagoknak, környezeti szennyezőanyagoknak az élettani folyamatokra gyakorolt hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze hagyományos módszerrel mért eredményekkel. A kísérleti elrendezésben 9 ml táptalajhoz 1 ml gátló anyagot adtunk különböző koncentrációban. A különböző gátló szerek, antibiotikum, növényvédő szer hatásának vizsgálatára az egyes szereket különböző koncentrációban adagoltuk a kémcsövekbe. A ferde agaron szaporított törzsekből 10 ml BHI táplevesbe oltottunk. Az E. coli BL21AI-törzshöz 50 μg/ml ampicillint adtunk, a tenyészeteket 37 °C-on 24 órán keresztül rázatott körülmények között inkubáltuk. A szaporítás után a tenyészet sejtkoncentrációja 5x10⁹ TKE/ml volt. Ezt az oldatot 5x10⁶ TKE/ml sejtkoncentrációig hígítottunk, és ebből a hígított szuszpenzióból 0,1-0,1 ml térfogatot mértünk minden, a vizsgálatokba bevont kémcsőbe. A kiértékelést turbidimetriás módszerrel végeztük, 37 °C-on 24 h inkubációt követően.

4.3. Minták, minta-előkészítés

4.3.1. Trifluralin meghatározása felszíni vízmintában és gyümölcslevekben

A felszíni vízmintát a Keleti Főcsatornából vettük 2001. július 18-án. A kísérletekben használt almalé és kivilé kereskedelmi forgalomból származott.

4.3.1.1. Minta-előkészítés ELISA és OWLS mérésekhez

A felszínivízmintákat mérés előtt megszűrtük, az ELISA méréshez a kémhatást pH=7,4 értékre állítottuk be, az OWLS méréshez TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4) hígítottuk.

A gyümölcsleveket (alma, kivi) ultraszűrőn (50.000 NMWL) 3 percig 9000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltunk, s a kapott szűrleteket 4 °C-on tároltuk felhasználásig. A mátrixhatás kiküszöbölésére a trifluralinstandardokat igazoltan tiszta mintába adagolva készítettünk kalibrációs görbét (10-100 μ g/kg).

4.3.1.2. Minta-előkészítés GC/MS méréshez

A trifluralin koncentrációját vizes oldatból szilárd fázisú extrakciós (SPE) mintaelőkészítést követően GC-MS vizsgálattal határoztuk meg. A GC-MS vizsgálatokhoz a vízminták egy literét szűrés után Carboprep-90 kolonnán (500 mg, 6 ml, Restek, Bellefonte, USA) extraháltuk, majd a nem savas szennyezőket diklór-metán:metanol (8:2) elegyével leoldottuk az oszlopról, a mintát bepároltuk és izooktánban felvettük. Az előkészített mintákat injektáltuk a GC-MS mérésekhez.

4.3.2. Zearalenon meghatározása kukoricamintából

A vizsgálat során zearalenonmentes kukorica-vetőmagokat Labmill típusú darálóval 1/60 szitaméretet alkalmazva ledaráltuk, majd az így kapott őrleményt különböző mennyiségű zearalenonstandarddal mesterségesen szennyeztünk (*spike*)

0,01-10 µg/kg koncentrációtartományban. A kalibrációhoz használt minta standardokhoz és a mérendő mintákhoz külön mintasorozatot készítettünk. Pontosan bemért 1 g gabonaőrleményt 10 ml acetonitril–víz (60:40) -eleggyel 30 percig kevertettünk, ezután 10 percig állni hagytuk, majd a felülúszót ultraszűrőn (50.000 NMWL) 5 percig 9000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltunk, s a kapott szűrleteket 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.3.3. Aflatoxin meghatározása gabonákból és fűszerekből

A méréseket két sorozat mesterségesen szennyezett (*spike*) mintával végeztük, amelyet a minta-előkészítés ellenőrzésére, illetve "ismeretlen" mintaként vizsgáltunk. Az aflatoxinmentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel koncentrációsort készítettünk (0,001-100 µg/kg) a 4.3.2. szerint.

Kereskedelmi fűszerpaprika minták aflatoxintartalmát vizsgáltuk. A mátrixhatás kiküszöbölésére az aflatoxinstandardokat igazoltan tiszta mintába mesterségesen szennyezve (1-100 μ g/kg) készítettünk kalibrációs görbét a fentiek szerint.

4.3.4. Ochratoxin meghatározása gabonákból és borokból

Két sorozat mesterségesen szennyezett (*spike*) mintát készítettünk, amelyeket a minta-előkészítés ellenőrzésére, illetve "ismeretlen" mintaként vizsgáltunk. Az ochratoxin A-mentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel koncentrációsort készítettünk (0,001-100 µg/kg) a 4.3.2. szerint.

Vörösborok ochratoxin A-szennyezettségének vizsgálatához 3 különböző kereskedelmi bormintát alkalmaztunk. A borokba 0,1-100 ng/l koncentrációjú ochratoxin A standardot mesterségesen szennyeztünk (*spike*). A mintákat ultraszűrőn (50.000 NMWL) 3 percig 9000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltunk, s a kapott szűrleteket 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.3.5. DON meghatározása búzalisztből

GC-MS módszerrel ellenőrzött (LOD: 0,01 mg/kg), DON-mentes búzalisztet mesterségesen szennyeztünk (*spike*) 0-100 mg/kg DON tartományban. A kalibrációhoz használt mintastandardokhoz és a mérendő mintákhoz külön mintasorozatot képeztünk a 4.3.2. szerint.

4.3.6. Hisztamin meghatározása fermentált zöldséglevekből

Kereskedelemben kapható savanyú káposzta, kovászos uborka, csalamádé levét használtuk fel a mérésekhez. A fermentált zöldséglevet (sárgarépalé) a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszer-tudományi Kar Sör- és Szeszipari Tanszékéről kaptuk. A mátrixhatás kiküszöbölésének érdekében a zöldségleveket ultraszűrő membránon (50.000 NMWL) 5 percig 9000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltunk, s a kapott szűrleteket 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.3.7. Vitellogenin meghatározása ponty és vöröshasú unka fajokból származó mintákból

A hím és nőstény pontyok (*Cyprinus carpio*) az Aranyponty Zrt. (Rácegres, Rétimajor) ökológiai halgazdaságból származtak. A vérmintákat 10 percig 6000 fordulat/perc fordulatszámon, majd 10 percig 11000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltuk. A minták felülúszóját 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

A halakból vett májmintákat felaprítottuk (Ultra-turrax, IKA, Németország), és 1 g mintát 10 ml 42 mmol/l TRIS pufferben (42 mmol/l, pH 7,4) homogenizáltuk. A mintákat 20 percig vákuum alatt 4000 fordulat/perc fordulatszámon, ezt követően pedig 10 percig 12000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltuk.

Az Lpv fehérje tisztításához kereskedelemben kapható keleti unkát (*Bombina* orientalis) alkalmaztunk. Tekintettel arra, hogy minden hazai békafaj védett, ezért a Természetvédelmi Felügyelőség engedélye alapján a természetből begyűjtött petecsomókból laboratóriumi tenyészetben neveltünk vöröshasú unkát (*Bombina* bombina). Máj-, szív- és ivarmirigymintákat vettünk a fiatal egyedekből, és azt ugyanúgy dolgoztuk fel, ahogy azt a pontyminták feldolgozásáról szóló részben leírtuk.

4.3.8. E. coli-sejtek kimutatása

E. coli (NCAIM B.00200) -sejtek szaporításához ferde agarról 1 kacsnyi sejttel beoltottuk az LB-táplevest, majd 37 °C-on 24 órás rázatott tenyészetet készítettünk.

4.3.9. LAB-sejtek alkalmazása

Lactobacillus plantarum 2142-sejtek szaporításához MRS táplevesbe 1% sejtszuszpenziót adtunk és 30 °C-on 24 órás rázatott tenyészetet készítettünk (rázógépben, sebesség 100 fordulat/perc). Az MRS tápoldatban szaporított sejteket sejtszámlálás után (3x 10⁹ TKE/ml baktérium) centrifugáltuk (6000 fordulat/perc, 10 perc). A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket JA-oldatban reszuszpendáltuk, majd a méréseknek megfelelően JA oldattal hígítottuk.

4.3.10. Rekombináns E. coli BL21AI -sejtek alkalmazása

A rekombináns *E. coli* BL21AI-sejteket 10 μ g/ml ampicillintartalmú LB ferde agarra 1-1,5 havonta átoltva tartottuk fenn. A szaporításhoz a ferde agarról 1 kacsnyi sejtet oltottunk be 10 μ g/ml ampicillintartalmú LB táplevesbe, majd 37 °C-on 24 órás rázatott tenyészetet készítettünk (rázógépben, sebesség 100 fordulat /perc).

A rekombináns E. coli BL21AI-sejtek előkezelése:

- SC-: a sejteket 37 °C-on 24 óráig inkubáltuk, centrifugáltuk és pufferoldattal hígítottuk közvetlenül a mérés előtt.
- SC- +TEOS: a sejteket 37 °C-on 24 óráig inkubáltuk, centrifugáltuk és pufferoldattal hígítottuk, majd TEOS reagenst (0,048 mmol/l) adtunk az oldathoz és 1 órát inkubáltuk közvetlenül a mérés előtt.
- SC+: a sejteket 37 °C-on 24 óráig TEOS reagenssel (0,048 mmol/l) inkubáltuk, centrifugáltuk és pufferoldattal hígítottuk közvetlenül a mérés előtt.

4.4. Az alkalmazott matematikai 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 használtuk. Az eredmények összehasonlításához a Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztuk, az átlagértékek közötti különbségeket p <0,05 szignifikanciaszinten vizsgáltuk.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. OWLS készülék alkalmazása FIA rendszerben

5.1.1. Átfolyó küvetta kialakítása FIA rendszerhez

Az OWLS méréstechnika nagy érzékenységének kihasználásához elsőrendű követelmény volt a kontrollált mérési körülmények megteremtése. Ennek érdekében módosítottuk az OWLS műszer mintatartóját, és az 5.1. ábrán látható átfolyó típusú küvettát fejlesztettünk ki. A szenzor felett elhelyezkedő küvetta tömítése az üveg *chip*hez a küvetta kialakításának megfelelően gumi O, illetve ovális gyűrűvel történik. A küvetta biokompatibilis PEEK anyagból készült, a folyadék ki-be vezetésére teflonvagy poliéter-éter-keton- (PEEK) csövek szolgáltak.



5.1. ábra Átfolyó küvetta az OWLS műszerhez



5.2. ábra OWLS 120 berendezés a FIA rendszerrel

A szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében az OWLS szenzort folyamatosan áramló injektálásos rendszerben (FIA) működtettük. Az átfolyó küvettát, perisztaltikus pumpát, mintainjektort, összekötő csővezetékeket, csatlakozásokat

magában foglaló kísérleti elrendezés működése alapján beigazolódott, hogy a FIA rendszerrel működtetett OWLS berendezés lényegesen megbízhatóbb, reprodukálhatóbb mérést tesz lehetővé, mint a korábbiakban használt kézi adagolású rendszer. A mérési biztonság és stabilitás javítása együtt járt az OWLS mérés érzékenységének növekedésével is. A kialakított FIA rendszert több kutatócsoport eredményesen használja, és mint az OWLS berendezés tartozéka kereskedelmi forgalomban van (5.2. ábra). Az utóbbi időben az áramlás stabilitásának növelése érdekében a perisztaltikus pumpa helyett fecskendőpumpát alkalmazunk (0,1 μ l/perc – 30 ml/perc), ehhez csatlakoztatva a mintainjektort. A mérési paraméterek, a kémiai, biokémiai reakciók, biológiai folyamatok optimális körülményeinek biztosításához a mérőküvettát 20-80 °C között ±0,1 °C pontossággal termosztálhatjuk a beépített Peltier elemes modullal vezérelve.

5.1.2. Inkubációs küvetta kialakítása biomolekulák immobilizálásához

A szenzorok érzékenyítésekor a különböző rögzítési eljárások kidolgozása, adaptálása során az immobilizálási lépéseket folyamatosan áramló (FIA), illetve szükség szerint megállított (*stopped-flow*) rendszerben végeztük. A valós idejű mérések segítségével kidolgoztuk a rögzítési paramétereket. Ugyanakkor kiderült, hogy az optimális inkubálási protokoll (pl. EDC/NHS alkalmazásával) hosszas műveletsort igényel, ezeket a kémiai reakciókat nem célszerű az OWLS berendezésben végezni, mert a gépidő túl drága, és feleslegesen veszi igénybe az OWLS berendezés kapacitását. A kísérletsorozatok eredményeképpen megterveztünk és létrehoztunk egy olyan küvettakonstrukciót, amely biztosítja, hogy

- a szenzor felületének csak az aktív része (a mérő fényfolt környezetében) érintkezzen az immobilizáláshoz szükséges vegyszerekkel;
- a reagensek cseréje, mosási lépések az OWLS berendezésben használt átfolyó rendszerű küvetta folyadékellátó rendszerével kompatibilis csővezetékkel történjen;
- az OWLS berendezéstől függetlenül alkalmazható a szenzorok felületén történő biomolekulák rögzítésére;
- moduláris kialakítása révén egyidőben több szenzor is kezelhető.
- A biomolekulák rögzítésére alkalmas küvetta kereskedelmi termékké vált, az OWLS berendezés tartozékai között "inkubációs küvetta" néven szerepel.

5.2. Szenzor felületének módosítása laboratóriumi és kisüzemi körülmények között

Mivel a hullámvezető szenzor felületén a hidroxilcsoportok nem alkalmasak a biomolekulák közvetlen rögzítésére, a felületet kémiailag módosítani kell. Így szilanizálással lehet különböző funkciós csoportokat biztosítani, amihez már megfelelő kémiai lépesekkel rögzíthetőek a biomolekulák. Szilanizálási kísérleteket végeztünk vizes vagy szerves oldószeres oldatban, illetve gőzölögtetéssel. A szilanizálással kapcsolatos eredményeinket Trummer *és mtsai* (2001), Levkovets *és mtsai* (2004) valamint Székács *és mtsai* (2009) közleményekben foglaltuk össze.

5.2.1. Szenzor felületének tisztítása, előkészítése a szilanizáláshoz

A szenzor felületének tisztítására a krómkénsavas áztatás bizonyult megfelelőnek, majd a krómkénsav használatának kiküszöbölésére a Nochromix (Godax

Laboratories Inc., USA) készítményét alkalmaztuk. A szükséges hidroxilcsoportok kialakításához a tisztított szenzorokat forró vízzel hidratáltuk (90 °C, 1 h).

5.2.2. Amino-csoportok kialakítása γ-amino-propil-trietoxi-szilánnal (APTS)

Mind a vizes, mind a szerves fázisú szilanizálásnál a leggyakrabban használt vegyület a γ-amino-propil-trietoxi-szilán (APTS), amellyel aminocsoportok vihetők fel a hordozó felületére. A szilanizálási kísérleteket az APTS trifunkciós szilánvegyület alkalmazásával végeztük vizes és szerves fázisban. Vizsgáltuk a szilánoldat koncentrációjának és pH-jának, a kezelés hőmérsékletének és időtartamának a képződött szilánréteg tulajdonságaira gyakorolt hatását.

5.2.2.1. Szilanizálás vizes fázisban bemerítéssel

Az előzőleg megtisztított és forró vízben hidratált szenzorok felületét az APTS 5, 10 és 20%-os oldatával (pH állítás nélkül, és pH 3), különböző hőmérsékleteken (20-75 °C), különböző ideig (1-6 h) kezeltük. Desztillált vízzel való mosás után a képződött szilánréteg stabilizálódása érdekében a szenzorokat hőkezeltük (95 °C, 4-16 h), és Eppendorf-csőben tároltuk a további felhasználásig. A megfelelőnek talált eljárással módosított szenzorok esetében vizsgáltuk, hogy a szilanizálás mennyire befolyásolja az intenzitásspektrumot, nem torzítja-e a spektrumot azáltal, hogy a rácson esetleg durva vagy egyenetlen réteg képződik, továbbá a szenzor rövidebb éleit is befedő szilánréteg nem okoz-e detektálási problémákat. Ennek érdekében a kísérlet során két-két *chip*et egyharmad, kétharmad részben, illetve teljes egészében szilanizáltunk. A kialakított szilánrétegek minősítésére vizsgáltuk egyrészt a szenzorok optikai paramétereinek változását, majd a felületen BSA-molekulákat adszorbeáltunk, és mértük a válaszjelek nagyságát. A szilanizálási eljárást ezen eredmények alapján optimalizáltuk.

A vizes fázisban végzett szilanizálással jól reprodukálható, sima, homogén, jól nedvesíthető réteget kaptunk. A módosított felületű szenzorok intenzitásspektrumában a jel-zaj-arány kismértékben csökkent, a kapott intenzitásspektrumok azonban jól értékelhetők voltak. A szilanizálás paramétereit tanulmányozva az APTS 10%-os töménységű, pH 3,0-ra beállított vizes oldatának használatával kaptunk megfelelő eredményeket. A kezelés hőmérsékletét és időtartamát vizsgálva megállapítottuk, hogy nincs jelentős különbség a szobahőmérsékleten 6 óráig és a 75 °C-on 4 óráig kezelt szenzorok között, az utóbbi stabilitása előnyösebb volt a modellmérések során. A hőkezelés vizsgálatakor a hosszabb kezelés volt a megfelelő, minimum 6 óra kellett a °C-on. szilánrétegek kialakításához 95 Α gyakorlatban az stabil eliárás folyamatosságának biztosítása miatt egy éjszakán át hőkezeltük a szenzorokat.

A szenzorokat szilanizálás előtt és után OWLS technikával mérve megállapítottuk a rétegvastagság növekedésének mértékét, a kialakított szilánréteg vastagságát. A felületmódosításnak alávetett *chip*ek intenzitásspektrumát vizsgálva kiderült, hogy a szilanizálás az eredeti spektrumot nem változtatta meg jelentősen, az adott *chip*re jellemző becsatolási szögek, a csúcsok intenzitása nem változott számottevően, az intenzitásspektrum nem torzult, nem vált "felemássá" amiatt, hogy a szilánréteg a rövidebb éleket is befedte. A szilanizálás 1,3-1,7 nm vastagságú szilánréteget eredményezett a kezelés időtartamától függően (5.1. táblázat). A nedves szilanizálás olcsó, jól reprodukálható módszer, laboratóriumi körülmények között megfelelően alkalmazható, a szenzorok 2-4 hétig tárolhatók, ugyanakkor néhány hátránya is van. A szenzorokat atomierő-mikroszkópiás (AFM) módszerrel vizsgálva kiderült, hogy a felület szilánnal való borítottsága nem homogén, a szilánmolekulák többrétegű szigeteket alkothatnak.

dc_457_12

Szilanizálás módja	Szilánréteg vastagsága (nm)	Szenzor száma
Vizes bemerítés, 10% APTS, 75 °C, 1 h	1,3±0,2	9
Vizes bemerítés, 10% APTS, 75 °C, 5 h	1,7±0,2	9
Gőzfázisban, 10% APTS vizes oldat, 75 °C, 5 h	0,9±0,3	7
Szerves oldatos bemerítés, 10% APTS, 60 °C, 1 h	25±5,9	5
Szerves oldatos bemerítés, 10% APTS, 60 °C, 6 h	41±4,2	5
Gőzfázisban, 10% APTS szerves oldat, 60 °C, 6 h	1,4±0,2	7

5.1. táblázat A szilánréteg vastagsága a kezelés körülményeinek függvényében

5.2.2.2. Szilanizálás gőzfázisban, vízben oldott szilánnal

A felületmódosításhoz a frissen hidratált *chip*eket a vízcseppek leszárítása után a vízzel hígított szilanizáló oldat fölé a gőztérbe helyeztük (75 °C, 6 óra). A gőzölögtetéses eljárással a szilánoldatba való bemerítéshez hasonlóan egyenletes, hidrofil réteget kaptunk a szenzorfelületen. A *chip*ek intenzitásspektruma az eredeti spektrumhoz viszonyítva nem változott számottevően. A gőzölögtetéses technikánál is vizsgáltuk a kezelés hosszának hatását, és megállapítottuk, hogy 5-7 óra a kezelés optimális időtartama, a kialakított szilánréteg vastagsága 0,9±0,3 nm volt.

5.2.2.3. Szilanizálás szerves fázisban bemerítéssel

Az APTS toluolban jól oldódik, azonban az oldat tárolása során csapadék válik ki, a szilán koncentrációja bizonytalan, ezért az APTS reagenssel végzett szerves szilanizáláshoz mindig friss szilánoldatot készítettünk. A szilanizálás előtt a szenzorokat a már korábban ismertetett eljárással tisztítottuk (ld. 5.2.1. fejezet), 2 órán át 100 °C-on szárítottuk a pórusokban maradt víz eltávolítására, majd vízmentes toluolban áztattuk. A felületmódosítást a szenzorok szilánoldatba történő bemerítésével végeztük szobahőmérsékleten, illetve 60 °C-on, 6 órán keresztül. A hőkezelés után a korábbiakhoz hasonlóan vizsgáltuk a szenzorok optikai tulajdonságait és a modellmolekulákkal nyert jeleket. A szerves fázisban való szilanizálással a szenzorok felületén csapadék vált ki, foltos, egyenetlen, de jól nedvesíthető, hidrofil felület keletkezett. Az APTS toluolos oldatában szobahőmérsékleten szilanizált szenzorok esetében torz intenzitásspektrumot kaptunk, a felületen lerakódott csapadék következtében nőtt a csúcsok félértékszélessége, a hullámvezető réteg vastagsága 6 órás kezelést követően átlagosan mintegy 40 nm-rel nőtt. A magasabb hőmérsékleten (60 °Con) végzett szilanizálás esetében a szilánvegyület jobb oldhatósági viszonyai miatt ugvan kevésbé nőtt a szenzorok vastagsága, a kapott intenzitásspektrumok jel-zajviszonya viszont annyira romlott, hogy egy részük kiértékelhetetlenné vált. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy szerves fázisban (toluol) végzett szilanizálással vastag, durva, egyenetlen szilánréteget tudtunk csak kialakítani. Az eljárás nem reprodukálható, a szilánoldat többször nem használható fel, szilanizálás előtt mindig frissen kellett készíteni.

5.2.2.4. Szilanizálás gőzfázisban, toluolban oldott szilánnal

A felületmódosításhoz a frissen hidratált *chip*eket a szilanizálás előtt 2 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk, vízmentes toluolban áztattuk, majd a toluolban oldott APTS (10%) oldat fölé a gőztérbe helyeztük (60 °C, 6 óra). A toluolos APTS oldattal

végzett gőzölögtetéses eljárással, a vizes oldattal nyert felülethez hasonló egyenletes, hidrofil réteget kaptunk. A *chip*ek intenzitásspektruma az eredeti spektrumhoz viszonyítva nem változott számottevően, a szilánréteg vastagsága is csak 1,4±0,2 nm volt.

5.2.2.5. Fehérje adszorpciójának vizsgálata a szilanizált szenzorok felületén

A vizes, illetve szerves fázisban szilanizált szenzorokat, a rétegek kapacitását fehérjeadszorpcióval vizsgáltuk. A vizsgálathoz BSA 5x10⁻⁴ mol/l koncentrációjú vizes oldatát használtuk. A mérés során először desztillált vízzel felvettük az alapvonalat, majd ezt követően a küvettába injektáltuk a BSA-oldatot, és mértük a felületi adszorpció mértékét a nem adszorbeálódott minta kimosódását, illetve az alapvonal stabilizálódását követően. Az 5.3. ábra a különböző szilanizálási eljárással készített szenzorokon adszorbeálódó BSA jelét mutatja.



5.3. ábra A szilánrétegeken adszorbeált BSA mennyisége

A legtöbb BSA a szerves fázisban végzett bemerítéses szilanizálással kialakított rétegeken adszorbeálódott. Ez a nagymértékű adszorpció azonban a kialakult szilánréteg egyenetlenségéből adódik. Az egyes szilanizálási technikákkal létrehozott felületek jellemzésénél már kiderült, hogy az APTS toluolos oldatába való bemerítésével vastag, egyenetlen réteg alakul ki. A vizes fázisban történő szilanizálási eljárások közül a 75 °C-on, 4 órán át bemerítéssel végzett szilanizálással kaptunk megfelelő eredményt, míg a szerves fázisban a gőzölögtetéssel (60 °C, 6 h) történő szilanizálás tekinthető a legjobbnak. Tekintve, hogy a két utóbbi eljárással kezelt szenzorok intenzitásspektrumai nem változtak meg jelentősen, továbbá mindkettő viszonylag egyszerűen kivitelezhető, az említett két technika alkalmas a SiO₂-TiO₂ hullámvezető felületének módosítására.

5.2.2.6. Aminocsoportokat hordozó szenzor készítése vákuumtechnikával

A laboratóriumi szilanizálás eredményeit alapul véve célunk volt, hogy olyan szilanizálási eljárást dolgozzunk ki, amely a szenzor felületén reprodukálható, homogén szilánréteget biztosít. Az eljárásra kisüzemi módszer került kifejlesztésre, ahol a kellően előkészített felületű szenzorokat vákuumtérbe helyezve, majd a szilánvegyület gőzét beengedve, a szenzor felületén homogén vastagságú szilánréteg alakul ki (5.4. ábra). A megtisztított és hidratált felületű szenzorokról közvetlenül szilanizálás előtt nagytisztaságú N₂-gázáramban lefújtuk a vízcseppeket. A vákuumszilanizálási kísérleteket a MikroVákuum Kft. saját fejlesztésű berendezésében végeztük. A

megtisztított, hidratált szenzorokat a vákuumszilanizáló berendezés vízhűtéses ajtaján keresztül, egy kvarcüvegből készített tartószerkezettel a kályha pyrexcsöves reakcióterébe helyeztük. A kályha háromzónás, ellenállás fűtésű berendezés, amelyben a reakciótér hőmérséklete 50-500 °C között szabályozható, és a reakciótér 400 mm hosszában egyenletes hőmérséklet állítható elő. Az egyenletes hőmérsékletre azért van szükség, hogy egyszerre minél több szenzort lehessen azonos hőmérsékleten szilanizálni. A kályha fűtőtestében lévő hengeres pyrexcső szolgál a vákuum alá helyezhető reakciótérként, amely a vákuum- és gázszolgáltató rendszerhez csatlakozik. A szenzorok behelyezése után a reakciótérből vákuummal eltávolítottuk a maradék vízgőzt és az esetleges szennyezéseket, majd a teret nagytisztaságú Ar-gázzal töltöttük fel. A kályha (és így a szenzorok) hőmérsékletét kb. 100 °C-ra növelve elérhető, hogy a reakciócső belső falán és a szenzorok felületén adszorbeálódott vízmolekulák deszorbeálodjanak, ugyanakkor ez a hőmérséklet elég kicsi ahhoz, hogy a felületre kötött hidroxilcsoportok még ne deszorbeálódjanak.



5.4. ábra Vákuumszilanizáló berendezés (MikroVákuum Kft.)

A megfelelően hőkezelt, hidratált szenzorok felületére a szilanizáló APTES gőzét vákuum alatt vezettük. A vákuum szerepe kettős, a rendszer tisztaságát, reprodukálhatóságát biztosította, ugyanakkor az adott körülmények között a felületen a szilanizáló reagens egyenletes felületi borítottságot eredményezett.

A reakciótérből a szilanizáló anyag maradványait ismételt vákuumozásgázfeltöltés-ciklusokkal távolítottuk el. A szilanizálást követően vizsgáltuk, hogy a szenzorok hőkezelését milyen hőmérsékleten kell végezni (a BSA – anti-BSA méréssel kapott eredményeket az 5.3.1. fejezet ismerteti). Az eredmények alapján a szilanizált felületen a kémiai kötések, keresztkötések reprodukálható kialakítását 150-170 °C-os hőkezeléssel biztosítottuk. A szenzorokat a kályha lehűtése után kivettük a reakciótérből és csomagoltuk. A vákuumszilanizálási technológia kidolgozásával egyszerre 200-300 db *chip* szilanizálása vált lehetővé, a ciklusidő közel 4 óra volt. A fenti technológiával készített, reprodukálhatóan jó minőségű szilanizált szenzorok kereskedelmi forgalomban vannak.

A vákuumszilanizált szenzorok felületi érdességét AFM módszerrel vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a vákuumban történő szilanizálás egyenletes borítottságú bevonatot eredményez a rácson (5.5. ábra A). Az 5.5. ábra B paneljén a szilanizált szenzor felülete fehérjemolekulához kötött aranynanorészecskékkel volt borítva. Látható, hogy a részecskék homogén módon borítják a szenzor felszínét, nem

keletkeznek nagy csomók, *cluster*ek a szilanizált felszínhez való rögzítéskor. A vákuumszilanizált szenzorok stabilitását vizsgálva, mintegy egy hónapig eltarthatóak úgy, hogy a felületi szilánréteg sajátságaiban jelentős változást nem tapasztaltunk (ld. 5.3.1. fejezet).



5.5. ábra Vákuumszilanizált szenzor felületének vizsgálata AFM módszerrel (Készítette Dr. Rozlosnyik Noémi, ELTE Biológiai Fizikai Tanszék;
A: vákuumszilanizált szenzor felületi érdesség, B: a szilanizált szenzor felülete fehérjemolekulához kötött aranynanorészecskékkel borítva)

5.2.3. Epoxicsoportok kialakítása γ-glicidoxi-propil-trimetoxiszilánnal

A SiO₂-TiO₂ hullámvezető réteget γ -glicidoxi-propil-trimetoxi-szilán (GOPS) toluolos oldatával kezelve epoxicsoportokat alakítottunk ki a felületen. A GOPS vízben csak igen korlátozott mértékben oldódik, ezért az epoxicsoportok kialakítása csak szerves oldószerben volt lehetséges.

5.2.3.1. Szilanizálás szerves fázisban bemerítéssel

A szilanizálás előtt a szenzorokat a már korábban ismertetett eljárással tisztítottuk (ld. 5.2.1. fejezet), 2 órán keresztül 100 °C-on szárítottuk a pórusokban maradt víz eltávolítására, majd vízmentes toluolban áztattuk. A szilanizálási lépést a

szenzorok 10%-os GOPS toluolos oldatába merítve végeztük 20 órán keresztül 60 °Con, majd toluollal mostuk, végül 100 °C-on egy órát hőkezeltük. A kezelés során a *chip*ek intenzitásspektruma alig változott, nem befolyásolva a kiértékelés pontosságát. A képződött szilánréteg vastagsága kb. 1-1,5 nm volt. A kapott felület sima és egyenletes, de hidrofób volt. További kísérletek során megállapítottuk, hogy ha a szilanizálást követő mosás során más, megfelelő polaritású oldószereket is alkalmazunk, akkor az oldószer vízzel való elegyedési sorrendjének megfelelően csökken a felület hidrofobicitása. A szerves oldószerek közül toluol és metanol egymást követő alkalmazása bizonyult a legjobb kombinációnak. Minden mosási lépést 30 perces 100 °C-on végzett hőkezelés követett. Az epoxicsoportokat tartalmazó szenzorokat a hőkezelés után csomagolva tároltuk a felhasználásig.

5.3. A szilanizált szenzorok vizsgálata, biomolekulák immobilizálása

A felületre szilanizálással felvitt funkciós csoportok – leggyakrabban aminocsoportok – kémiai reakciókkal, származékképzéssel egy vagy több lépésben átalakíthatók más reaktív csoportokká, hozzájuk további vegyületek kapcsolhatók. A szilanizálási kísérleteink során a kialakított rétegeket antitest–antigén-modellmolekulapár, a BSA – anti-BSA IgG antitest vizsgálatával értékeltük.

A biomolekulák rögzítésével kapcsolatos kísérleteket Trummer és mtsai (2001), Levkovets és mtsai (2004), valamint Székács és mtsai (2009) tudományos cikkekben ismertettük.

5.3.1. Aminofunkcionalizált szenzorok vizsgálata

A szilanizált szenzorok minőségét a BSA – anti-BSA IgG molekulapár alkalmazásával hasonlítottuk össze, a BSA molekulát glutáraldehiddel kovalensen rögzítve a szenzor felületén és mérve a különböző koncentrációjú antitest oldatokra adott szenzorválaszokat (5.6. ábra). A méréseket FIA rendszerben végeztük. Az alkalmazott áramlási sebesség 0,18 ml/perc volt. A kísérletek során, a mérőcellán először desztillált vizet áramoltattunk (A), majd a rendszerbe glutáraldehidoldatot (2,5% deszt. vizes) injektáltunk (B). Az oldat kimosódását követően a desztillált vizet TRIS pufferre (42 mmol/l, pH 7,4) cseréltük (C). A BSA rögzítése 200 µg/ml töménységű oldat injektálásával történt (D). A rögzítési lépés után a szenzort rövid ideig pufferrel mostuk a meg nem kötődött molekulák eltávolítására, majd 0,1 mol/l HCl-at injektáltunk. Az érzékenyített szenzorfelület ezt követően alkalmas a minták mérésére. Az egyes IgG standardok mérése között a felület regenerálása, a megkötődött IgG molekulák lemosása ugyancsak 0,1 mol/l sósavoldat injektálásával történt. A kezdeti vizsgálatok során kiderült, hogy az antigént kisebb koncentrációban injektálva ugyan kisebb jeleket kaptunk, de a szenzor stabilabb, több minta mérése vált lehetségessé. dc 457 12



5.6. ábra BSA rögzítése aminofunkcionalizált szenzorfelületen és különböző koncentrációjú anti-BSA oldatokra adott jelei (A – desztillált víz; B – 2,5% glutáraldehid; C – TRIS puffer (42 mmol/l, pH 7,4); D – 200 μg/ml BSA; r – 0,1 mol/l HCl; 1. – 10 μg/ml anti-BSA; 2. – 25 μg/ml anti-BSA; 3. – 50 μg/ml anti-BSA; 4. – 100 μg/ml anti-BSA; 5. – 200 μg/ml anti-BSA)

Az 5.7 A-B ábrákon a BSA-molekulákkal érzékenyített szenzor kalibrációs görbéje látható. A mérés dinamikus méréstartománya 1-10 μg/ml volt. Az immobilizálási kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a módosított felületű szenzorok alkalmasak biomolekulák kovalens rögzítésére, a szenzorfelület adott molekulával történő érzékenyítésére. Az elvégzett kísérletek megfelelő alapot biztosítanak regenerálható szenzorfelületek kialakítására, az OWLS szenzorok folyamatosan áramló rendszerben működő immunszenzorként történő alkalmazására.



5.7. ábra BSA fehérjével (50 μg/ml) érzékenyített szenzor anti-BSA standard oldatokkal felvett kalibrációs görbéje (A) és a görbe lineáris tartománya (B)

A vizes fázisban szilanizált *chip*ek mérési lehetőségeit a vákuumban szilanizált és különböző hőmérsékleten hőkezelt szenzorok tulajdonságaival hasonlítottuk össze (5.8. ábra). Irodalmi adatok alapján a szilanizált felületen a hőmérséklet növelésével nő a reaktív csoportok száma, ezért a kísérletek során 70, 250 és 500 °C-on hőkezelt *chip*eket vizsgáltunk. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az 500 °C-on hőkezelt szenzorok vizsgálatakor látszólag valóban több BSA-molekula kötődött a felületen, az

dc 457 12

anti-BSA-antitestre mért jelek is nagyobbak, azonban az érzékenység gyorsan csökken a mérések során, így egy *chip*en kb. 15 mintát lehetett mérni. A 250 °C-on hőkezelt *chip*ek viselkedése hasonló volt a vizes fázisban frissen szilanizált és hőkezelt *chip*ek működéséhez, a jelek ugyan kisebbek, mint az 500 °C-on kezelt *chip*ek esetében, azonban sokkal stabilabbak, több mérést (25-30) tudtunk egy szenzorral elvégezni. A 70 °C-on hőkezelt szenzorok érzékenysége és stabilitása is jelentősen elmaradt az előbbiektől. További kísérletekkel megállapítottuk, hogy a hőkezelés optimális hőmérséklete 150-170 °C.



5.8. ábra Vákuumszilanizált szenzorok hőkezelésének hatása az anti-BSA jelére (50 μg/ml BSA, friss - vizes APTS oldatban kezelt szenzor hőkezelés után, tárolás nélkül; vákuumban szilanizált szenzorok 500 °C, 250 °C, 70 °C-on hőkezelve)



5.9. ábra Szilanizált *chip*ek tárolási idejének hatása az anti-BSA jelére
(50 μg/ml BSA; vizes oldatban szilanizált: A – tárolás nélkül, E – 4 hét; vákuumszilanizált: B – 1 hét, C – 4 hét, D – 8 hét)

A vákuumszilanizált szenzorok stabilitását tárolás alatt vizsgálva megállapítottuk, hogy 4-6 hétig eltarthatóak anélkül, hogy jelentős változás történne a biomolekulák jelének a modellvizsgálatok során mért értékében, nagyságában. A 5.9.

ábrán nedves eljárással és vákuumszilanizálással készített szenzorok eltarthatóságát hasonlítottuk össze. A nedves szilanizálással készített *chip*eket levegőn, pormentes helyen tároltuk, míg a vákuumszilanizált szenzorok légmentesen voltak lezárva. Megállapítható, hogy a vákuumszilanizálással készült szenzorok igen stabilak, a tárolás nem befolyásolja működésüket kb. 4-6 hétig. A nedves szilanizálással készített szenzorok érzékenysége azonban kb. 4 hét után már jelentősen csökkent.

5.3.2. Felületi karboxilcsoportok képzése, biomolekulák rögzítése EDC/NHS eljárással

Az APTS reagenssel kezelt szenzorfelületek aminocsoportjait borostyánkősavanhidrides kezeléssel karboxilcsoportokká alakítottuk. A származékképzési reakciót a minél nagyobb kapacitású rétegek kialakítása érdekében optimalizáltuk, figyelembe véve az alkalmazott reagensek koncentrációját, a reakció hőmérsékletét, időtartamát. A rétegeket ismét BSA – anti-BSA molekulapár vizsgálatával értékeltük, a biomolekulákat EDC/NHS vegyületekkel rögzítve a karboxilcsoportokat hordozó szenzor felületen. Az EDC amino- és karboxilcsoportok összekapcsolására alkalmas karbodiimid, amely az aktiválás során az NHS karboxilcsoporthoz való kötődését teszi lehetővé. Az NHS kötődésével egy, a fehérjék aminocsoportjai számára könnyen támadható szukcinimidészter alakul ki, ez a rögzítés során lehasad a hordozóról, és a fehérje közvetlenül a karboxilcsoporthoz kapcsolódik. A karboxilcsoportokat hordozó szenzoron való BSA rögzítésének és az anti-BSA-koncentráció mérésének folyamatát mutatja be az 5.10. ábra. Bár a rögzítés elvégezhető közvetlenül a mérés során, azonban megállapítottuk, hogy célszerű hosszabb reakcióidők alkalmazása a jobb rögzítés érdekében. Ezért a kialakított mérési protokoll szerint az inkubációs küvettában végeztük a biomolekulák rögzítését, és már csak a kész szenzort helyeztük a mérőműszerbe.



5.10. ábra BSA rögzítése és az anti-BSA-koncentráció mérése karboxilcsoportokat hordozó szenzoron (0,5 mol/l EDC/0,5 mol/l NHS (1:1), 100 μg/ml BSA, 1 mol/l etanolamin, 0,1mol/l HCl, minta: 5, 10, 20 μg/ml anti-BSA standard)

A karboxilálást különböző koncentrációjú borostyánkősav-anhidriddel (1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% absz. etanolban) bemerítéssel végeztük (1 óra 25 °C), majd a *chip*eket 15 percig 90 °C-on szárítottuk. A biomolekulák rögzítését az összehasonlítás kedvéért elvégeztük olyan szenzoron is, amelyet nem karboxiláltunk, hanem csak aminocsoportokat tartalmazott. A mérés elején a legnagyobb jelet az 1%-os

borostyánkősav-anhidrid-oldattal kezelt szenzorokra kaptuk, a különböző koncentrációjú standardok jele közötti különbség azonban kisebb, mint a többi mérésnél, bizonytalan, gyorsan csökkenő jeleket kaptunk, ezért az 1% borostyánkősav-anhidrides kezelést a továbbiakban nem alkalmaztuk.

Az 5.11. ábra a szenzorjelek stabilitását mutatja be a karboxilcsoportok kialakításához alkalmazott borostyánkősav-anhidrid koncentrációjának függvényében (0,5%, 0,2%, 0,1%). A szenzor felületén 100 μg/ml BSA fehérjét rögzítettünk 0,5 mol/l EDC és 0,5 mol/l NHS 1:1 arányú keverékével, a szabadon maradt reaktív észterkötőhelyeket 1 mol/l etanolamin injektálásával blokkoltuk. A 20 μg/ml koncentrációjú anti-BSA-standardot egymás után többször injektáltuk, a mérések után 0,1 mol/l HCl-val regeneráltuk a szenzort. A kezeletlen, aminocsoportokat tartalmazó szenzoron bár kezdetben kaptunk jeleket, azonban a jelek nagysága gyorsan csökkent; 12 mérés után már csak a kezdeti érték 16%-át mértük, bizonyítva, hogy a biomolekulák nincsenek kovalens kötésekkel rögzítve. A legnagyobb jeleket 0,5%-os borostyánkősav-anhidriddel karboxilált szenzorok felületén kaptuk, azonban a jelek ez esetben is gyorsan csökkentek (38%). A jelek a 0,2%-os oldat alkalmazásakor voltak a legstabilabbak, 12 injektálás után a mért jelek nagysága a kezdeti érték 80%-a volt.



5.11. ábra 20 μg/ml koncentrációjú anti-BSA standardok jele a borostyánkősav-anhidrid koncentrációjának függvényében (0,5 mol/l EDC/0,5 mol/l NHS (1:1), 100 μg/ml BSA, 1 mol/l etanolamin, 0,1 mol/l HCl, 20 μg/ml anti-BSA standard)

A karboxilálás után hőkezelt *chip*eket légmentesen lezárva tároltuk, 48 és 96 óra után vizsgálva nem tapasztaltunk jelentős csökkenést a jelekben, az előkészített *chip*ek rövid ideig tárolhatók voltak. A további kísérletek alapján azonban megállapítottuk, hogy célszerű volt a rögzítés teljes folyamatát egyszerre elvégezni, és nem a karboxilált szenzorokat tárolni. Az alkalmazott EDC/NHS reagensek aránya, illetve koncentrációja jelentősen befolyásolta a szenzorválaszok nagyságát és a mérések reprodukálhatóságát, ezért a biomolekulák rögzítésénél részletesen vizsgáltuk az alkalmazott reagensek koncentrációjának (0,05-0,4 mol/l EDC, illetve NHS) hatását (ld. 5.4.1.4.2. fejezet).

Eredményeink alapján a 0,4 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS (1:1), valamint a 0,2 mol/l EDC/0,05 mol/l NHS (1:1) összetételű oldatokkal mértünk reprodukálható, stabil jeleket. A 0,4 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS (1:1) összetételű reagensek alkalmazásakor a különböző koncentrációjú standardokra mért jelek lineárisak voltak, a továbbiakban ezt a reagens-összetételt alkalmaztuk a biomolekulák rögzítésekor. Az immobilizált biomolekulát tartalmazó szenzort Eppendorf-csőben, 4 °C-on tároltuk, és vizsgáltuk a

szenzorok mérési stabilitását. Megállapítottuk, hogy 2-4 hetes tárolás során nem romlott a szenzor érzékenysége, hasonló nagyságú jeleket kaptunk, jó a mérések reprodukálhatósága az egyes szenzorok között, az eljárás alkalmas a szenzorokon a szükséges biomolekula előre történő rögzítésére. Ez az eljárás jelentősen lerövidíti a minták mérésnek idejét is, mert nincs szükség a szenzorok hosszadalmas előkészítésére.

5.3.3. Epoxicsoportot hordozó szenzorok vizsgálata

A GOPS reagenssel szilanizát, epoxicsoportokat hordozó felületek vizsgálatára rögzítési kísérleteket végeztünk a BSA – anti-BSA modell-molekulapárral. Az 5.12. ábra epoxicsoportokat hordozó hullámvezető felületen végzett rögzítési és mérési kísérletet mutat be. A rögzítés során a szenzorra injektáltuk a BSA-molekulák 200 µg/ml oldatát (0,2 mol/l karbonátpuffer, pH 9,5), majd a rögzítés után a desztillált vizet TRIS pufferre cseréltük (42 mmol/l, pH 7,4), a felületről 0,1 mol/l sósavoldatot injektálva a meg nem kötődött fehérjemolekulákat eltávolítottuk. A BSA-molekulák rögzítése után vizsgáltuk mért jelek reprodukálhatóságát, valamint a felület regenerálhatóságát a szenzorra azonos (50 µg/ml) koncentrációjú anti-BSAantitestoldatot injektálva. A kapott szenzorválaszok között nincs szignifikáns különbség, a válaszok reprodukálhatóak. További vizsgálatok során azonban kiderült, hogy bár hasonló eredményeket kaptunk a GOPS reagenssel módosított szenzorral történő mérések során, mint az APTS reagenssel kezelteknél, azonban az epoxicsoportokkal módosított szenzorok eltarthatósága rövidebb, a rögzítés kevésbé stabil, a szenzoron a jelek csökkennek, kevesebb minta (15-20 minta) mérhető egy szenzorral.



5.12. ábra BSA – anti-BSA-mérés epoxi hullámvezető felületen (A – desztillált víz, B – 200 μg/ml BSA (pH 8,5, karbonátpufferban), C – TRIS puffer (42 mmol/l, pH 7,4), r – 0,1 mol/l HCl, S – 50 μg/ml anti-BSA)

Összefoglalva az eredményeket, a szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében folyamatosan áramló injektálásos rendszert állítottunk össze. A biomolekulák rögzítésére alkalmas amino- és epoxicsoportokat hordozó szenzorfelületet alakítottunk ki a szilanizálási eljárás optimalizálásával laboratóriumi körülmények között, és vizsgáltuk a vákuumszilanizálással készített szenzorok alkalmazhatóságát is a különböző rögzítési eljárások során. Az aminocsoportokat hordozó hullámvezetőn glutáraldehiddel (2,5%) közvetlenül rögzítettük a biomolekulákat, illetve borostyánkősav anhidriddel (0,2%)

karboxilcsoporttá alakítva, az EDC/NHS reagensek összetételét optimalizálva (0,4 mol/l EDC / 0,1 mol/l NHS; 1:1) immobilizáltuk a fehérjemolekulákat. Az epoxicsoportokat hordozó szenzoron közvetlenül lúgos közegben (pH=9,5) rögzítettük a biomolekulákat.

5.4. Immunszenzorok fejlesztése

A szenzorfejlesztések során két immunszenzortípust vizsgáltunk, a direkt (nem versengő) illetve a versengő elrendezést (5.13. ábra). A nem versengő vagy direkt mérés (A) esetében a hullámvezető felületén a specifikus szérum megfelelő hígítású oldatát rögzítettük kovalensen, és közvetlenül mértük a kimutatni kívánt vegyületeket tartalmazó standardokra, illetve mintákra adott szenzorválaszok nagyságát.

A versengő (kompetitív) immunszenzor (B) kifejlesztése során a vizsgálandó antigén vagy az antigénmolekuláknak fehérjével képzett konjugátuma került rögzítésre. A mérések során a standardoldatokat, illetve mintákat ismert mennyiségű antitestet tartalmazó szérummal elegyítettük, inkubáltuk, majd injektáltuk a mérőrendszerbe. A mérésnél így a mintában lévő antigének által meg nem kötött, szabad antitestek mennyiségét határoztuk meg, és ebből a jelből következtettünk a minták eredeti antigéntartalmára.



5.13 ábra A vizsgált immunszenzorok működésének elvi vázlata (A – nem versengő, direkt mérés, B – versengő mérés)

5.4.1. Immunszenzor fejlesztése trifluralin meghatározására

A trifluralin a mezőgazdaságban rendszeresen alkalmazott gyomirtószerhatóanyag, amely vegyületről a széleskörű biológiai vizsgálatok során kimutatták, hogy kis koncentrációban endokrin zavaró hatást okoz a vízi élőhelyeken élő állatokban. Ezért volt indokolt, hogy a trifluralin kimutatására szelektív, nagyérzékenységű immunszenzoros mérési eljárást fejlesszünk ki, melynek eredményeit Székács *és mtsai* (2003), Levkovets *és mtsai* (2004), Székács *és mtsai* (2009) közleményekben publikáltuk.

5.4.1.1. Trifluralinhaptének és -konjugátumok szintézise

Minthogy a kisméretű (10 kDa 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), célvegyületeinket kellő méretű hordozómolekulához (fehérjékhez) kellett kapcsolnunk, hogy az immunizálási kísérletek a későbbiekben elvégezhetőek legyenek, s a célvegyületekre specifikus antitesteket nyerhessünk. A vizsgálni kívánt célvegyületek az esetek többségében nem rendelkeznek a fehérjékhez való kapcsoláshoz alkalmas funkciós csoportokkal, emiatt a célvegyületeknek először megfelelő funkciós csoporttal ellátott származékát (az ún. hapténszármazékot) kellett előállítani.

A dinitro-anilin-származék trifluralin gyomirtószer-hatóanyag immunanalitikai meghatározásához a hapténszármazékot szintézissel 1-klór-2,6-dinitro-4-triflourmetilbenzolból állították elő (Hegedűs *et al.* 2000). A szintézis során *N*-propil-*N*-(2,6-dinitro-4-triflourmetil-fenil)-6-amino-hexánsavat készítettek, majd a hapténmolekulát sikeresen kapcsolták különféle hordozófehérjékhez, így BSA-hoz és hemocianinhoz. A kapcsolási reakcióhoz a trifluralin alapszerkezetbe bevitt szabad karboxilcsoportot *N*-hidroxiborostyánkősav-imiddel (valamint diciklohexil-karbodiimid alkalmazásával) aktiválták, majd a hordozófehérje *N*-terminális és egyéb amino-csoportjaihoz kapcsolták. A fehérjekonjugátumban spektrofotometriás és tömegspektrometriás úton sikeresen igazolták a hapténmolekulák beépülését (a haptén/fehérje mólarány az immunogénben 509 mmol/mol), s így az immár kellően nagy móltömegű trifluralinkonjugátum alkalmazható volt immunizáló ágensként.

5.4.1.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése

A trifluralin-hemocianin-konjugátummal az 4.2.3. fejezetben ismertetett immunizációs eljárással termeltettük a poliklonális ellenanyagot, majd a szérum tisztítása (ld. 4.2.4. fejezet), liofilizálása után a szérumokat ELISA rendszerben ellenőriztük. Meghatároztuk a szérumtitereket, a célvegyületek kötődésének erősségét, valamint a versengő ELISA rendszerben elérhető kimutatási érzékenységet.

Az érzékenyítő antigénkonjugátumot 1 µg/ml koncentrációban rögzítettük, míg az enzimjelzéssel ellátott anti-IgG antitestet (második antitest) 1:12000 hígításban alkalmaztuk. A titrálási kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a két kísérleti szérum gátlási görbéje hasonló lefutású, a titrálási görbe középértéke mindkettőre \approx 1:600, és munkahígításként 1:1000 – 1:2000 alkalmazható. Ugyanakkor a liofilizálás nem befolyásolta jelentős mértékben a titerértéket, a továbbiakban valamennyi szérumkomponenst 1:1000 hígításban (munkahígítás) alkalmaztuk az ELISA vizsgálatokban.

A gátlási vizsgálatokban adott felületi antigénkoncentráció mellett rögzített szérumhígítást alkalmaztunk, s ehhez adagoltuk a meghatározni kívánt célvegyületet

(trifluralin) változó koncentrációban annak megállapítására, hogy a célvegyület milyen koncentrációtartományban képes leszorítani az antitesteket a felületi antigénről, vagyis mi a mérési koncentrációtartomány és érzékenység, valamint a kimutatási határ. Az e körülmények között nyert gátlási görbék az 5.14. ábrán láthatók. A 2. szérum valamelyest jobb kimutatást biztosított az 1. szérumnál, de a gátlási középérték (IC₅₀) mindkét esetben az 1 ng/ml körül volt. A liofilizálás az 1. szérum érzékenységét nem változtatta meg jelentősen, míg a 2. szérum esetében majdnem háromszorosára rontotta a gátlási középértéket (IC₅₀). Mindazonáltal megállapítható, hogy mind a négy szérumfrakció alkalmazható ELISA rendszerben a trifluralin 0,05–100 ng/ml koncentráció tartománybeli kimutatására és OWLS alapú immunszenzor fejlesztésére.



5.14. ábra A trifluralin felületi érzékenyítő antigén (1 μg/ml) alkalmazásával nyert gátlási görbék a rögzített antigén alapú, versengő ELISA rendszerben (szérumhígítás 1:1000)

5.4.1.3. Direkt immunszenzor trifluralin kimutatására

A direkt immunszenzorok kialakításakor 2000x és 6000x hígított szérumot rögzítettünk glutáraldehiddel az aminoszilanizált szenzor felületén, és 10⁻¹-10⁵ ng/ml koncentrációtartományban injektáltuk a trifluralinstandardokat az érzékenyített szenzorra. Mindkét esetben csak a 100 ng/ml standardoldat adott értékelhető jelet, az antigén koncentrációját 10⁴ ng/ml koncentrációig növelve a jelek arányosan változtak. A 100-1000 ng/ml méréstartományban a 6000x szérummal kezelt szenzorokon a jelek nagyobbak voltak, mint a másik esetben, azonban a jelek nem stabilak, és 1000 ng/ml felett nem adtak lineáris választ. A szérumot 2000x hígítva és a szenzor felületén rögzítve a standard trifluralinoldatokra 100-10000 ng/ml koncentrációtartományban stabil, jól értékelhető mérési görbéket kaptunk, a jelek a koncentráció függvényében lineárisak voltak (5.15. ábra).



5.15. ábra Direkt immunszenzor kalibrációs görbéje 2000x hígítású szérum alkalmazása esetén

Mivel a trifluralin növényvédőszerhatóanyag-molekula igen kis móltömegű (335,28 g/mol), a jelölésmentes OWLS szenzoron csekély tömegváltozást okozott, ezért standardoldatok esetén a legkisebb kimutatható koncentráció 100 ng/ml volt. Az előírt detektálási határ a trifluralin növényvédő szer esetén 0,1 µg/kg zöldségekben, a nem versengő meghatározással elérhető érzékenység azonban nem elegendő az analitikai vizsgálatokhoz.

5.4.1.4. Versengő immunszenzor trifluralin kimutatására

Az aminocsoportokat, illetve az azok módosításával készített karboxilcsoportokat hordozó szenzorokkal trifluralin detektálására alkalmas indirekt immunszenzort fejlesztettünk, feltételezve, hogy ezzel az eljárással nagyobb érzékenységet érhetünk el, mint a direkt szenzorok esetében. A szenzorok kialakítása során a trifluralinkonjugátumot aminofunkcionalizált felület esetén glutáraldehiddel két lépésben, míg karboxilfelület esetén az EDC/NHS technika alkalmazásával, reaktív szukcinimid-észterek képzésével rögzítettük a hullámvezető felszínén.

5.4.1.4.1. Immunszenzor kialakítása aminofunkcionalizált szenzorfelületen

A versengő szenzorok fejlesztésekor a legfontosabb optimalizálandó paraméter a szenzorfelületen rögzített trifluralin-BSA-konjugátum koncentrációja, valamint az alkalmazott poliklonális szérum hígításának mértéke volt. A kísérletek során, a szenzor felületén 1, 5 és 10 µg/ml trifluralin-BSA-konjugátumot rögzítettünk glutáraldehiddel. Összehasonlítva a különböző koncentrációjú trifluralinkonjugátummal érzékenyített szenzor szérumokra adott válaszát, megállapítottuk, hogy a rögzítéshez alkalmazott konjugátum koncentrációjának növelésével csökkent a szenzorválaszok nagysága. Az 1 ug/ml trifluralin-BSA-konjugátum rögzítése során kb. 15%-kal nagyobb szenzorválaszokat kaptuk, mint a 10 µg/ml konjugátummal érzékenvített szenzor esetében, azonban ez utóbbi esetben a jelek stabilnak bizonyultak az ismételt injektálás során, ezért a továbbiakban ez utóbbit alkalmaztuk.

dc_457_12



5.16. ábra Szenzorjelek a szérumhígítás függvényében (10 μg/ml trifluralin-BSA)

Az antitestek hígításának (6000x, 3000x, 2000x, 1500x, 500x) hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a nagy szérumhígítást alkalmazva a szenzor túlzottan érzékennyé vált, nagyobb antigénkoncentráció esetén szinte az összes antitest lekötődik, a szenzorválasz kicsi és bizonytalan. Kis szérumhígítás esetén ugyan kellően nagy a szenzorválasz, de a szenzor érzékenysége romlik, csak nagyobb antigénkoncentráció esetén válik érzékennyé. Azt a szérumhígítást kell választani, ahol az antitestek éppen telítik a szenzor felületét, a szenzorválasznál már kismértékű lemosódás tapasztalható, a görbének van platója. Az 5.16. ábra alapján megállapítható, hogy a 2000-1500-szoros szenzorhígítással jól definiálható, szép görbéket mértünk, így a további kísérletek során a 2000x szérumhígítást használtuk.

5.4.1.4.2. Immunszenzor kialakítása karboxilált szenzorfelületen

Az optimálisnak talált 10 μ g/ml trifluralin-BSA-konjugátum rögzítésével vizsgáltuk, hogy a karboxilált szenzor felületén milyen EDC/NHS összetételnél érünk el megfelelően stabil rögzítést. A karboxilcsoportokkal funkcionalizált szenzorok használatakor az 5.3.2. fejezetben leírt eljárást követtük. Első lépésben az aminofunkcionalizált szenzorfelületeket borostyánkősav-anhidrid 0,2%-os (absz. etanol) oldatával kezeltük, a *chip*eket 1 órán át az oldatban áztatva, majd a szenzorokat etanollal mostuk és 15 percig 75 °C-on szárítottuk. A karboxilcsoportok aktiválása, a reaktív szukcinimid-észter-gyűrű kialakítása az EDC/NHS reagensek különböző arányú vizes oldatának alkalmazásával történt a hullámvezető felületén az inkubációs küvettában. Úgy találtuk, hogy az EDC/NHS reagensek különböző aránya jelentősen befolyásolta a szenzorválaszok nagyságát és a mérések reprodukálhatóságát, ezért vizsgáltuk a jelek nagyságát, minden esetben 10 μ g/ml trifluralin-BSA-konjugátumot rögzítve.

Az 5.17. ábrán látható, hogy a koncentrációval arányos szenzorválaszokat a 0,4 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS, míg a legnagyobb válaszokat a 0,2 mol/l EDC/0,05 mol/l NHS összetételű oldatokkal kaptuk. A karboxilált szenzorokon az eredmények alapján a 0,4 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS arányú keverékkel végeztük az immobilizálást. A fent ismertetett rögzítési eljárást az optimálisnak talált paraméterek mellett alkalmaztuk, és az így elkészített szenzorral vizsgáltuk a szenzor stabilitását, a trifluralin mérhető lineáris méréstartományát. Összevetve az aminofunkcionalizált, illetve a karboxilált felületeken kapott szenzorválaszokat, az aminocsoportokat hordozó felületek esetében

kisebb detektálási határokat értünk el, mint a karboxilfelületek alkalmazásánál, ugyanakkor a karboxilfelületek stabilabb, reprodukálhatóbb válaszokat adtak.



5.17. ábra Trifluralin jele a trifluralinkonjugátum rögzítésekor alkalmazott különböző összetételű EDC/NHS keverék függvényében (1 – 0,4 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS; 2 – 0,2 mol/l EDC/0,05mol/l NHS; 3 – 0,2 mol/l EDC/0,1 mol/l NHS; 4 – 0,3 mol/l EDC/0,2 mol/l NHS; 5 – 0,17 mol/l EDC/0,35 mol/l NHS)

5.4.1.4.3. Trifluralin meghatározására alkalmas szenzor statisztikai értékelése

A szenzor stabilitásának vizsgálatához egymás után többször mértünk standard vakoldatot és 0,1 ng/ml trifluralinstandardot. A mérés elején minden esetben legalább 3 előmérés és sósavas mosás szükséges, amíg a szenzoron rosszul kötődött molekulák lemosódnak majd ezután kb. 20-30 minta mérésére alkalmas a szenzor. A minta standardok között rendszeresen mértünk vakmintát is, és ahhoz viszonyítottuk a standardok jelét. Míg a jelek nagysága kissé csökkent a mérések során, a standardok és a vakminta közötti különbség stabil értéket mutatott, a 0,1 ng/ml koncentrációjú standard minta különbsége a vakmintához képest 9 párhuzamos mérés alapján 9,97±0,82 tömeg/felületegység volt.

Az optimálisnak talált mérési paraméterek alkalmazásával (10 µg/ml trifluralin-BSA rögzítése, 2000x hígított szérumoldat) kalibrációs görbét készítettünk a 0,1 pg/ml-0,1 ng/ml koncentráció tartományban és összehasonlítottuk az ELISA módszerrel elérhető értékekkel (5.18. ábra). A trifluralin meghatározásakor az OWLS szenzorral mérhető gátlási középérték (IC₅₀) $1,05 \times 10^{-6} \pm 0,52 \times 10^{-6}$ ng/ml, ami több nagyságrenddel kisebb, mint ELISA módszerrel (2,87±0,39 ng/ml) mérve. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy ezeket az értékeket TRIS pufferben (42 mmol/l, pH 7,4) határoztuk meg, a valós minták vizsgálatakor az esetleges mátrixhatás miatt csökkenhet a módszerek érzékenysége. A kalibrációs görbék eltolódása, a LOD jelentős eltérése a szenzortechnikának köszönhető, hiszen a biológiai anyagok azonosak voltak. Az OWLS immunszenzor és az ELISA kalibrációs görbe alakja nagyon hasonló volt (a meredekség 0,91 illetve 0,88 volt). A trifluralin kimutatási határa az OWLS szenzorral femtomoláris nagyságrendben van (3,14x10⁻¹⁵ mol/l). Ilyen alacsony kimutatási határ ugyan ritka, de nem egyedülálló az immunanalitikai módszerek között, hasonló LOD-ot találtak fehérjék (Schlatter et al. 1993, Plowman et al. 1996) és mikrobiális toxinok (Ahn et al. 2002) kimutatása során.

dc_457_12



5.18. ábra Trifluralin kalibrációs görbéje versengő immunszenzorral (OWLS) és ELISA-val

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a különböző dinitro-anilin-herbicidek, azok hapténszármazékai és a különböző szintetikus közti termékek mekkora keresztreakciót adnak a kifejlesztett szenzorban, mennyire szelektív az eljárás. A trifluralinra mért szenzorválaszt 100%-nak véve vizsgáltuk, hogy azonos koncentrációban a különböző származékok mekkora jelet adnak a trifluralin jeléhez képest. Az 5.2. táblázat adatai alapján megállapítottuk, hogy az OWLS detektáláson alapuló immunszenzorral mért eredmények, valamint az ELISA módszerrel mérhető adatok között nincs szignifikáns különbség, a két eljárás szelektivitása hasonló.

Vagyülat	Keresztreakció (%)	Keresztreakció (%)	
vegyulet	OWLS szenzorral	ELISA módszerrel ^a	
trifluralin	100	100	
ethalfluralin	6,9	2,9	
benfluralin	3,4	5,2	
isopropalin	0,26	<0,1	
2,6-dinitro-4-trifluorometil-anilin	0,09	0,18	
pendimetalin	>0,01	<<0,1	
2,6-dinitro-4-trifluorometil-1-klór-	>>0.01	<< 0.1	
benzol	0,01	~~0,1	
2,6-dinitro-anilin	>>0,01	<<0,1	
anilin	>>0,01	<<0,1	

5.2. táblázat Különböző vegyületek keresztreakciójának nagysága (CR) versengő immunszenzorral és ELISA módszerrel (^a Hegedűs *et al.* 2000)

5.4.1.4.4. Valós minták mérése a trifluralinra specifikus immunszenzorral

Az OWLS immunszenzort, az ELISA eljárást, valamint a GC-MS módszert (ld. 4.2.5.1. és 4.2.5.2. fejezet) összehasonlítva értékeltük a kifejlesztett módszerek alkalmazhatóságát valós minták vizsgálatára. GC-MS módszerrel vizsgálva

Trifluralinkoncentráció (ng/ml)				
Bevitt (spike)	OWLS módszerrel mért	ELISA módszerrel mért	GC-MS módszerrel mért	
0	< 0,0001	< 0,02	< 0,01	
2,5	1,81 ± 0,30	$1,79 \pm 0,38$	$2,42 \pm 0,08$	
5	5,43 ± 0,30	$4,16 \pm 1,16$	$4,32 \pm 1,01$	
25,0	36,3 ± 1,11	$34,1 \pm 4,01$	$24,6 \pm 3,76$	
^a	3,08 ± 1,02	1,29 ± 0,53	$1,94 \pm 0,53$	

kiválasztottunk egy trifluralint nem tartalmazó felszínivízmintát, és trifluralinnal mesterségesen szennyeztük (*spike*) úgy, hogy 2,5, 5 és 25 ng/ml koncentrációban tartalmazta a kimutatandó vegyületet.

^a Trifluralintartalmú felszínivíz-minta (Keleti Főcsatorna, 2001. július 18. mintavétel)

5.3. táblázat Felszínivíz trifluralintartalmának meghatározása (független kétmintás tpróba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

A vizsgálat eredményeit az 5.3. táblázatban foglaljuk össze, és megállapítottuk, hogy a kifejlesztett immunszenzorral mért eredmények jól megfeleltek az ELISA és GC-MS eljárásokkal mért értékeknek, a módszer alkalmas talajvíz, felszínivíz trifluralinkoncentrációjának meghatározására.

Tekintettel arra, hogy a szennyezett talajból a gyümölcsökbe is bekerülhet a szermaradvány, ezért vizsgáltuk, hogy gyümölcslevekből milyen minta-előkészítés után, milyen hígításban tudjuk meghatározni a minta trifluralintartalmát. Almalébe különböző mennyiségű trifluralint adagoltunk (5, 30, 70, 100, 500 µg/kg). Az almalevek tükrös oldatok, ezért nem kellett külön minta-előkészítő lépést beiktatni, elegendő volt a minták TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4) való hígítása. Ha nem tükrös gyümölcslevet, hanem rostos leveket (pl. kivi, őszibarack) vizsgáltunk, akkor a mátrixhatás csökkentése érdekében ultraszűrőmembránnal centrifugáltuk a mintákat (50.000 NMWL, 5000 fordulat/perc, 10 perc). A szűrleteket 4 °C-on tároltuk a mérésig. Ha ezeket a mintákat 100-10000x hígítva versengő immunszenzorral mértük, a minta mátrixhatása miatt szignifikánsan nagyobb jeleket kaptunk, mint a TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4) hígított kalibráló oldatokra. A mátrixhatás kiküszöbölésére a trifluralint nem tartalmazó almaléhez adagolt standardokkal készítettünk kalibrációs görbét. Az eredmények szerint a 100-szorosára hígított mintákkal stabil és reprodukálható jeleket kaptunk, a szenzor azonban hamar kimerült, csak 10-15 mintát tudtunk mérni vele. A sorozatméréshez az 1000x hígítást választottuk, mert stabil, reprodukálható eredményeket kaptunk, míg a 10000x hígított mintákra a vizsgált méréstartományban már nem volt megfelelően érzékeny a szenzor (5.19. ábra). A mesterségesen szennyezett (spike) minták vizsgálatakor meghatároztuk a minta-előkészítés során a trifluralin visszanyerésének százalékát, ami minden minta esetén meghaladta a 70%-ot, ez megfelelő a valós minták előkészítéséhez.



5.19. ábra Kalibrációs görbe almalevek trifluralintartalmának meghatározására

Az 5.4. táblázatban foglaltuk össze a kivilébe mesterségesen szennyezett (*spike*) minták vizsgálatának eredményeit, összehasonlítottuk az immunszenzorral valamint ELISA módszerrel mért trifluralinkoncentrációkat. Az OWLS méréshez a mintákat szűrtük és 1000x hígítottuk TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a két módszer jól megfelel egymásnak.

Minta	Trifluralin koncentráció (µg/kg)		
	Bevitt (spike)	OWLS módszerrel mért	ELISA módszerrel mért
Α	100	126±27	114±17
В	500	457±34	479±28
С	200	223±37	190±21
D	50	44±6	39±3
Е	10	10±4	13±6

5.4. táblázat Ismeretlen kiviléminták trifluralinkoncentrációjának meghatározása (független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

Összefoglalva az eredményeket, versengő immunszenzort fejlesztettük ki trifluralin növényvédőszer-maradvány meghatározására felszíni vizekből, valamint gyümölcslevekből. A trifluralin növényvédőszer-hatóanyag kimutatására a célvegyületből haptént, konjugátumokat és ellenanyagot készítettünk. Az optimalizált működési paraméterek mellett a TRIS puffer oldatban (42 mmol/l, pH 7,4) mért kalibrációs görbe alapján a szenzor gátlási középértéke (IC₅₀) 1,05x10⁻⁶ \pm 0,52x10⁻⁶ ng/ml-nek adódott, ami több nagyságrenddel kisebb, mint ELISA módszerrel (2,87±0,39 ng/ml) mérve. Felszíni víz és gyümölcslevek vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények megfeleltek az ELISA és GS-MS referenciamódszerrel mért értékeknek a független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten.

5.4.2. Immunszenzor fejlesztése zearalenon meghatározására

A zearalenon a *Fusarium*-gombák által felületi fertőzésként kerül a gabonákra, és nem megfelelő tárolás során a termelt toxin mennyisége növekszik. Ezért vált szükségessé a gyors, jelölésmentes immunszenzor fejlesztése, aminek eredményeiről a Székács *és mtsai* (2009) közleményben számoltunk be.

5.4.2.1. Zearalenonhaptének és -konjugátumok szintézise

A mikotoxinok, köztük a ZON is, kis molekulák lévén (C₁₈H₂₂O₅ 318,36 g/mol) önmagukban nem váltanak ki immunogén hatást, a további munkához az immunválasz kiváltásának alsó határát elérő molekuláris méretű fehérjeszármazékot kellett képeznünk az alapmolekulából. A rezorcilakton szerkezetű ZON nem rendelkezik a fehérjékhez való kapcsoláshoz alkalmas funkciós csoportokkal (elsősorban amino-, karboxil- vagy tiolcsoport), emiatt a célvegyületet először megfelelő funkciós csoporttal kellett ellátnunk. A funkciós csoport felvitelére részint a fenolos OH-csoportok, részint a laktongyűrűn elhelyezkedő karbonilcsoport kínált lehetőséget. Feltételezve, hogy a fenolrész a molekula karakterisztikus része, ezért annak érdekében, hogy a hapténmolekula emlékeztessen az alapmolekulára, jobban választásunk а karbonilcsoport módosítására esett. A karbonilcsoport könnyen oximálható, és amennyiben a szintézist a hidroxilamin N-karboxi-alkil-származékával, a 2-aminooxiecetsavval végeztük, a molekulába – rövid oximoldalláncon – karboxilcsoportot tudtunk bevinni (5.20. ábra). A reakciót erősen bázikus közegben végeztük, majd a nyersterméket vizes/etil-acetátos extrakcióval tisztítottuk és spektrofotometriásan jellemeztük.

A zearalenonszármazék hapténmolekulát sikeresen kapcsoltuk BSA és konalbumin (ConA) hordozófehérjéhez. A kapcsolási reakcióhoz a zearalenon alapszerkezetbe bevitt szabad karboxilcsoportot *N*-hidroxi-borostyánkősav-imiddel (valamint diciklohexil-karbodiimid alkalmazásával) aktiváltuk, majd a hordozófehérje *N*-terminális és egyéb aminocsoportjaihoz kapcsoltuk.

Mivel a zearalenon rezorcilakton alapszerkezete nem tartalmazott olyan kromofór csoportot, amelynek segítségével a hapténmolekula jelenlétét spektroszkópikus úton meghatározhattuk volna a zearalenon konjugátumokban, ezért a vizsgálatot a hordozó fehérjemolekulák szabad aminocsoportjainak 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsavval való visszatitrálásával végeztük el Habeeb (1966) klasszikus eljárása szerint. A konjugálási reakcióban a hapténszármazékot 1,07 µmol haptén/mg fehérje arány mellett adagoltuk a hordozófehérjéhez, és a kapott konjugátumban a hapténbeépülést spektrofotometriás úton visszatitrálva 0,29 µmol haptén/mg fehérje arányt kaptunk, vagyis a konjugálási reakció hatékonysága 27% volt.



5.20. ábra Zearalenonszármazék hapténmolekula előállítása Schiff-bázis képzésével zearalenonból 2-aminooxi-ecetsav segítségével

5.4.2.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése

Zearalenon-ConA konjugátummal az 4.2.3. fejezetben ismertetett immunizációs eljárással termeltettük a poliklonális ellenanyagot, majd a szérum tisztítása (ld. 4.2.4. fejezet) és liofilizálása után a szérumokat ELISA rendszerben ellenőriztük. Megállapítottuk a szérumtitereket, a célvegyületek kötődésének erősségét, valamint a versengő ELISA rendszerben elérhető kimutatási határt. Érzékenvítő antigénként a zearalenon hapténszármazékának BSA hordozófehérjéhez kötött konjugátumát alkalmaztuk. A két nyúlban termeltetett szérumból vizsgáltuk az immunglobulinokra tisztított, valamint a liofilizált mintákat. A szérumtitrálási kísérletekben a 2,5 µg/ml antigént rögzítettünk érzékenyítő antigénként, míg a szérumfrakciókat változó hígításban adagoltuk. A titrálási kísérletekből megállapítottuk, hogy a két kísérleti szérum gátlási görbéje hasonló lefutású, a titrálási görbe középértéke mindkettőre ≈ 1:2000, és munkahígításként 1:3000–1:5000 alkalmazható. A liofilizálás gyakorlatilag befolyásolta a titerértéket. А vizsgálatokban adott nem gátlási felületi antigénkoncentráció mellett rögzített szérumhígítást alkalmazunk, s ehhez adagoltuk a meghatározni kívánt célvegyületet (zearalenon) változó koncentrációban annak megállapítására, hogy mi a mérési koncentrációtartomány és érzékenység, valamint a detektálás alsó határa. A fent részletezett körülmények között nyert gátlási görbék az 5.21. ábrán láthatók.



5.21. ábra Zearalenon gátlási görbéi rögzített antigén-alapú, versengő ELISA rendszerben (ZON-BSA 2,5 μg/ml; szérumhígítás 1:2000)

A gátlási vizsgálatban a két szérum hasonló kimutatást biztosított, a gátlási középérték (IC₅₀) 6 és 12 ng/ml koncentráció között volt. A liofilizálás az 1. szérum esetében lényegében nem befolyásolta (vagy valamelyest javította) az érzékenységét, míg a 2. szérum esetében rontotta azt. A szérumok a zearalenon mennyiségi kimutatására 0,1–500 ng/ml koncentráció tartományban az ELISA mérési eredmények alapján alkalmasak voltak.

5.4.2.3. Direkt immunszenzor zearalenon kimutatására

A direkt immunszenzorok fejlesztésekor elsősorban a hullámvezető felületén rögzített zearalenon elleni poliklonális szérum minősége és mennyisége (hígítása) az érzékenységet meghatározó tényező. Különböző hígítású szérum rögzítését vizsgálva a 2000x-ére hígított szérum glutáraldehiddel való rögzítése esetén kaptunk reprodukálható eredményeket, a legkisebb kimutatott koncentráció a 0,5 µg/ml volt, a nem versengő meghatározással elérhető érzékenység tehát nem elegendő a valós minták vizsgálatához.

5.4.2.4. Versengő immunszenzor zearalenon kimutatására

Zearalenon detektálására alkalmas indirekt immunszenzort alakítottunk ki mind az aminocsoportokat hordozó felületen, mind pedig a karboxilcsoportokat tartalmazó szenzorok felhasználásával.

5.4.2.4.1. Immunszenzor kialakítása aminofunkcionalizált szenzorfelületen

A mérési módszer optimalizálása során a szenzorfelületen rögzített zearalenon-BSA-konjugátum koncentrációját, valamint az alkalmazott poliklonális szérum hígításának mértékét vizsgáltuk. A szenzor felületén 2, 5, 10 és 20 µg/ml ZON-BSAkonjugátumot rögzítettünk 2,5%-os glutáraldehidoldattal (5.22. ábra).



5.22. ábra A rögzített ZON-BSA koncentrációjának hatása az indirekt immunszenzor működésére (2000x hígított szérum)

Összehasonlítva a különböző koncentrációjú ZON-konjugátummal érzékenyített szenzor szérumokra adott válaszait, megállapítottuk, hogy a legnagyobb szenzorválaszokat és a legstabilabb jeleket is 10 µg/ml zearalenon-BSA-konjugátum rögzítése során kaptuk (10^{-2} pg/ml standardra $8,13\pm1,24$ egység, míg 10^{-1} pg/ml standardra $18,77\pm2,62$ egység), ezért a továbbiakban ezt a konjugátomkoncentrációt alkalmaztuk.



5.23. ábra Szenzorjelek a szérumhígítás függvényében (10 μg/ml ZON-BSA rögzítve)

A szérumok vizsgálata során különböző hígításban (16000x, 8000x, 4000x, 2000x, 1000x, 500x) injektáltuk a mintákat a 10 μg/ml ZON-BSA-val érzékenyített szenzorra. Az eredmények alapján (5.23. ábra) látható, hogy a nagy hígítású (16000x, 8000x) szérumok válaszai közel azonosak, esetükben nem kaptunk megfelelő válaszgörbét. Az 1000x, valamint az 500x hígítású szérumok által adott válaszok elválnak a többi görbétől, túl nagy jelet adnak. A 2000-4000x hígítással jól definiálható,

szép görbéket mértünk. Ezt követően a fenti paraméterek alkalmazásával immunszenzort készítettünk a felületen 10 μ g/ml ZON-BSA-konjugátumot glutáraldehiddel kovalensen rögzítve. A 2000x hígítású szérummal felvett kalibrációs görbe érzékeny szakasza a 10⁻²-10¹ pg/ml ZON-koncentráció között volt, a detektálás alsó határa 5x10⁻³ pg/ml ZON.

5.4.2.4.2. Immunszenzor kialakítása karboxilált szenzorfelületen

A karboxilcsoportokat tartalmazó szenzoron korábban (ld. 5.3.2. és 5.4.1.4.2. fejezet) ismertetett rögzítési eljárás és az optimálisnak talált paraméterek alkalmazásával felvettük a zearalenon kalibrációs görbéjét. A rögzítéshez 10 μ g/ml ZON-BSA-konjugátumot alkalmaztunk. A versengő immunszenzor kalibrációs görbe dinamikus szakasza ebben az esetben 10^{-2} - 10^2 pg/ml értékek közé esett, a detektálás alsó határa $2x10^{-3}$ pg/ml ZON.

Összevetve az amino-, illetve a karboxifunkcionalizált felületeken kapott szenzorválaszokat, elmondható, hogy mindkét rögzítési eljárással hasonló detektálási határt és dinamikus méréstartományt értünk el, azonban az aminocsoportokat hordozó felületek esetében a görbék nagyobbak, a jel csökkenése, a gátlás mértéke is nagyobb, mint a karboxifelületek alkalmazásánál, ugyanakkor a karboxifelületek a korábbi mérésekhez hasonlóan stabilabb, reprodukálhatóbb válaszokat adtak.

5.4.2.4.3. Zearalenonspecifikus szenzor szelektivitásának vizsgálata

Vizsgáltuk, hogy a különböző zearalenonszármazékok, a különböző szintetikus közti termékek mekkora keresztreakciót adnak a kifejlesztett szenzorral. A zearalenonra kapott szenzorválaszt 100%-nak véve vizsgáltuk, hogy azonos koncentrációban a különböző származékok mekkora jelet adnak a zearalenon jeléhez képest. Az 5.5. táblázat alapján megállapítottuk, hogy a zearalenon szelektíven meghatározható a vizsgált származékok között, az OWLS detektáláson alapuló immunszenzorral mért eredmények, valamint az ELISA referencia módszerrel mérhető adatok között nincs szignifikáns különbség, a két módszer szelektivitása közel azonos.

Vagujilat	CR OWLS szenzorral	CR ELISA módszerrel
vegyulet	(%)	(%)
zearalenon	100	100
α-zearalenol	25,2	28,2
α-zearalanol	12,8	7,1
β-zearalanol	2,7	1,1

5.5. táblázat Különböző vegyületek keresztreakciójának nagysága (CR) versengő immunszenzorral és ELISA módszerrel

5.4.2.4.4. A kifejlesztett zearalenon szenzor alkalmazása kukorica minták mérése

Kukorica-vetőmagőrleményből készített, mesterségesen szennyezett (*spike*) mintákkal vizsgáltuk a ZON-szelektív immunszenzor alkalmasságát a minták elemzésére, az eredményeket az ELISA referencia módszerrel hasonlítottuk össze.





5.24. ábra Különböző hígítású kukoricaminták zearalenontartalmának kalibrációs görbéje (10 μg/ml ZON-BSA rögzítve, 2000x hígított szérum)

A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.2. fejezetben leírtak szerint készített acetonitril–víz-kivonatot készítettünk, majd a mintákat tovább hígítottuk TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4), és vizsgáltuk, hogy milyen hígításban tudjuk megfelelő érzékenységgel mérni a zearalenon koncentrációját. A vizsgálat során tanulmányoztuk, hogy miként befolyásolja a kimutatást a minta mátrixhatása, másrészt pedig ellenőriztük, hogy a két analitikai módszer – kimutatási koncentrációtartományukon belül – azonos, s a bevitt névleges zearalenonkoncentrációnak megfelelő koncentrációt mutat-e. Az 5.24. ábrán bemutatott eredmények szerint a mintákat 100x, 1000x, illetve 10000x hígítva csökkent a minták mátrixhatása, és ennek következtében nőtt a jelek közötti különbség, bár a hígabb minták esetében kisebb koncentrációban volt a zearalenon jelen.

A mesterségesen szennyezett kukoricamintákból egy sorozatot a kalibrációs görbe felvételéhez használtuk, míg a további mintákat ismeretlenként vizsgáltuk, és meghatároztuk a ZON visszanyerésének százalékát, az eredményeket az 5.6. táblázatban foglaltuk össze. A minta-előkészítés során a visszanyerés minden minta esetén meghaladta a 70%-ot, bizonyítva, hogy az eljárás megfelelő a kukoricaminták vizsgálatához, a minták zavaró mátrixhatását a minták 10000x hígításával sikeresen csökkentettük.

A kukoricaminták OWLS szenzorral mért gátlási középérték (IC₅₀) 0,05 pg/ml volt, míg az ELISA mérésnél ez az érték 2,04 \pm 0,66 ng/ml-nek adódott. Az ELISA vizsgálatok tapasztalatai szerint kukoricamintákból az acetonitriles extraktumot 1:10 hígításban alkalmazva a zearalenont 0,1 ng/ml koncentráció felett tudtuk kimutatni.

Az 5.6. táblázatban az ismeretlenként kezelt minták OWLS technikával és ELISA módszerrel mért eredményeit hasonlítottuk össze. A mérési eredmények összevetéséből megállapíthatjuk, hogy a két módszer jól megfelel egymásnak, mindkét eljárás alkalmas a kukoricaminták zearalenontartalmának meghatározására a jelenleg megengedett határértékeknek megfelelően, azonban az OWLS szenzorral kb. 1,5 nagyságrenddel kisebb zearalenon kimutatására is lehetőség van.

dc_457_12

Minta	Zearalenon- koncentráció (<i>spike</i> , µg/kg)	OWLS módszerrel mért eredmény (µg/kg)	Visszanyerés (%)	ELISA módszerrel mért eredmény (µg/kg)	Visszanyerés (%)
Α	10	9,74±1,24	97	10,70±2,06	107
В	5	4,2±0,87	84	3,53±0,029	70
С	1	0,99±0,23	99	1,27±0,46	127
D	0,5	0,67±0,18	134	0,196±0,028	39
Е	0,1	0,088±0,012	88	0,108±0,017	108
F	0,05	0,052±0,009	104	< 0,1	
G	0,01	0,0081±0,0015	81	< 0,1	
Н	0,005	0,0062±0,0017	124	< 0,1	

5.6. táblázat Kukoricaőrleményhez adott (*spike*) zearalenon visszanyerésének meghatározása, OWLS és ELISA módszerrel mért koncentrációk összehasonlítása (független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

Összefoglalásként elmondható, hogy sikeresen fejlesztettük ki jelölésmentes versengő immunszenzort zearalenon meghatározására. A zearalenonból haptént, majd BSA és ConA fehérjékhez kötve konjugátumokat készítettünk. A ConA-t tartalmazó konjugátummal antitestet termeltettünk, majd a megfelelően tisztított biomolekulákkal immunszenzort alakítottunk ki. Az aminocsoportokat hordozó felületen készített szenzorral 10⁻²-10¹ pg/ml ZON-koncentráció között találtuk a dinamikus méréstartományt, míg a detektálás alsó határa 5x10⁻³ pg/ml ZON adódott. A karboxilcsoportokat tartalmazó szenzorral nyert értékűnek immunszenzor dinamikus méréstartománya 10⁻²-10² pg/ml közé esett, a detektálás alsó határa 2x10⁻³ pg/ml ZON. Az optimalizált mérési eljárással mesterségesen szennyezett (spike) kukoricamintákat mérve a gátlási középérték (IC50) 0,053±0,013 pg/ml értékűnek adódott, míg az ELISA mérésnél meghatározható IC₅₀ értéke 2,04±0,66 ng/ml volt. A kukoricaminták immunszenzorral mért eredményei valamint az ELISA referenciamódszerrel mért értékek között független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten nincs szignifikáns különbség.

5.4.3. Immunszenzor fejlesztése aflatoxin meghatározására

A módosított felületű szenzorokra alapozva eljárást dolgoztunk ki az *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxin B1 toxin versengő és nem versengő immunanalitikai kimutatására. Méréseinkhez monoklonális antitestet (1G7-1E2) alkalmaztunk. Eredményeinket az Adányi *és mtsai* (2007) tudományos publikációban foglaltuk össze.

5.4.3.1. Direkt és versengő immunszenzor működési paramétereinek meghatározására

A korábbi fejezetekben (ld. 5.4.1., 5.4.2. fejezet) ismertetett optimalizálási eljárással meghatároztuk mind a direkt, mind pedig a versengő immunszenzor működési paramétereit. A nem versengő szenzor esetében a toxin detektálására a mérendő aflatoxin B1 mikotoxinra specifikus antitestet rögzítettük a szenzor felszínén (5 µg/ml).

Az aflatoxin a rögzített antitestmolekulákhoz kötődve, közvetlenül detektálható volt, a lineáris méréstartomány 0,1-10 µg/ml, a detektálás alsó határa 0,05 µg/ml.

A versengő immunszenzor kialakítása során a hullámvezető felületén a kimutatni kívánt aflatoxin B1-molekula BSA fehérjével képzett konjugátumát glutáraldehiddel (2,5%) rögzítettük a már korábban ismertetett módon. A konjugátum rögzítésének vizsgálatakor az 5 μ g/ml aflatoxin-BSA-konjugátummal kaptunk reprodukálható jeleket. A szérum koncentrációját vizsgálva az 500x és 1000x hígított szérumot találtuk megfelelőnek. Az optimalizált paramétereket alkalmazva a dinamikus méréstartomány 0,001-1 ng/ml (5.25. ábra), az IC₅₀ értéke 0,023±0,009 ng/ml, a kimutatási határ 0,0005 ng/ml értékűnek adódott. Ez a méréstartomány alacsonyabb, mint a referenciaeljárásnak tekinthető ELISA eljárás esetében (1-25 ng/ml) mért tartomány.



5.25. ábra Aflatoxin B1 kalibrációs görbéje versengő eljárással mérve (5 µg/ml aflatoxin-BSA-konjugátum, 1000x anti-aflatoxin szérum, szigmoidillesztés χ^2 /szabadsági fok:1,14; R²: 0,99; IC₅₀ 0,023±0,009 ng/ml)

5.4.3.2. Aflatoxin meghatározása gabonákból

Aflatoxinmentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel (*spike*) kalibrációs sort és "ismeretlen" mintákat készítettünk. A mintákat az OWLS immunszenzoros mérésen kívül referenciamódszerrel vizsgáltuk. A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.3. fejezetben leírtak szerint készített acetonitril–víz-kivonatot készítettünk, majd a mintákat tovább hígítottuk TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4). Az immunszenzorral vizsgáltuk a minták hígításának hatását, valamint referenciaméréseket végeztünk ELISA módszerrel. Az 5.7. táblázatban összefoglalt eredmények alapján a minta-előkészítés során minden esetben 75% feletti volt az aflatoxin B1 visszanyerése, ami megfelelő alapot biztosított a minták további vizsgálatához. Az 5.8. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy az ELISA módszerrel és az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség, a szenzor alkalmas gabonák aflatoxinszennyezettségének meghatározására.
dc_457_12

Minta	Aflatoxin B1	OWLS	Visszanyerés
Iviinta	µg/kg	µg/kg	%
Búza 1	0	0,10	-
Búza 2	0,5	0,38	76,4
Búza 3	1	0,83	82,9
Búza 4	2	2,12	106,2
Búza 5	5	5,43	108,6
Árpa 1	0	0,19	-
Árpa 2	0,5	0,52	104,8
Árpa 3	1	0,96	96,3
Árpa 4	2	2,16	108,2
Árpa 5	5	4,92	98,4

5.7. táblázat Gabonamintákhoz adott (*spike*) aflatoxin B1 visszanyerésének meghatározása

Minta	Aflatoxin B1	ELISA	OWLS
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Búza 1	2,20	2,40±0,28	2,29±0,61
Búza 2	5,50	5,30±0,57	6,53±1,04
Búza 3	0,55	0,30±0,14	0,58±0,18
Árpa 1	1,8	$1,60\pm0,28$	1,26±0,28
Árpa 2	4,5	4,20±0,71	3,08±0,57
Árpa 3	0,45	0,51±0,14	0,54±0,14
Árpa 4	0,9	0,84±0,14	0,84±0,17

5.8. táblázat Gabonaminták aflatoxin B1-tartalmának vizsgálata OWLS és ELISA eljárással (független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

5.4.3.3. Aflatoxin B1 meghatározása fűszerpaprikában

Fűszerpaprika-minták aflatoxin B1-tartalmát vizsgáltuk, mivel a külföldről származó fűszerek mikotoxinszennyezettsége jelentős élelmiszer-biztonsági problémát okozhat. A mátrixhatás kiküszöbölésére az aflatoxinstandardokat igazoltan tiszta paprikamintába mesterségesen szennyezve (*spike*) készítettünk kalibrációs görbét. A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.3. fejezetben leírtak szerint acetonitril–víz-kivonatot készítettünk, majd a mintákat tovább hígítottuk 42 mmol/l TRIS pufferrel (pH 7,4), majd az immunszenzorral vizsgáltuk a minták hígításának hatását a vizsgált mikotoxin kimutatásának eredményére. Az 1000x és 10000x hígított minták vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az 1000x hígított mintákkal nagyobb jelkülönbséget mértünk a vakmintához képest, ezért a továbbiakban a vizsgálandó paprikamintákat ennek megfelelően készítettük elő (5.26. ábra). Az ismeretlen mintákra kapott eredményeket referenciamérésekkel hasonlítottuk össze, és igazoltuk, hogy az OWLS alapú immunszenzorral meghatározható a paprikaminták aflatoxin B1-tartalma (5.27 ábra).



dc 457 12

5.26. ábra Aflatoxin B1 mikotoxinnal mesterségesen szennyezett paprikaminták indirekt immunszenzorral mért kalibrációs görbéje



5.27. ábra Paprikaminták aflatoxinkoncentrációjának összehasonlítása ELISA módszerrel és immunszenzorral meghatározva (független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

Összefoglalva az eredményeket, versengő immunszenzort fejlesztettük ki aflatoxin B1 mikotoxin meghatározására búza-, árpa- és fűszerpaprika-mintákból. Az optimalizált mérési eljárást alkalmazva a dinamikus méréstartomány a 0,001-1 ng/ml tartományban volt, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,023±0,009 ng/ml (χ^2 /szabadsági fok:1,14; R²: 0,99), a detektálás alsó határa 0,0005 ng/ml értékűnek adódott. A búza-, árpa- és fűszerpaprika-minták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.

5.4.4. Immunszenzor fejlesztése ochratoxin meghatározására

A *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó gombafajok által termelt mikotoxin, az ochratoxin A meghatározására immunszenzoros kimutatási eljárást dolgoztunk ki anti-ochratoxin A monoklonális antitest (AF-12) alkalmazásával. Eredményeinket az Adányi *és mtsai* (2007) tudományos publikációban foglaltuk össze.

5.4.4.1. Direkt és versengő immunszenzor működési paramétereinek meghatározása

A korábbi fejezetekben (ld. 5.4.1., 5.4.2. fejezet) ismertetett optimalizálási eljárással meghatároztuk mind a direkt, mind pedig a versengő immunszenzor működési paramétereit. A direkt szenzor esetében a toxin detektálására a mérendő ochratoxin A toxinra specifikus antitestet rögzítettük az aminocsoportokat hordozó OWLS szenzor felületén glutáraldehiddel (2,5%). Vizsgáltuk a rögzítésnél alkalmazott antitest koncentrációjának hatását, és megállapítottuk, hogy a 2,5 μ g/ml koncentrációjú antitestet rögzítve kaptunk megfelelő jeleket, a szenzor pedig kb. 30 minta egymás utáni mérésére bizonyult stabilnak. A lineáris méréstartomány 10-1000 ng/ml (R²=0,97), a detektálás alsó határa 5 ng/ml volt.

Ochratoxin mérésére alkalmas versengő immunszenzor kifejlesztése során a szenzor felületén a kimutatandó ochratoxin A-molekula BSA fehérjével képzett konjugátumát rögzítettük. Vizsgáltuk ochratoxin-BSA-konjugátum az koncentrációjának hatását a rögzítésre, és megállapítottuk, hogy 10 µg/ml konjugátum rögzítése a megfelelő, mind a szenzor érzékenysége, mind pedig a stabilitás szempontjából. Méréseinkhez 1,0 µg/ml és 2,5 µg/ml hígított szérum alkalmazását találtuk megfelelőnek. Az antigénstandardot TRIS (42 mmol/l, pH 7,4) pufferoldatban 0,001-1000 ng/ml koncentrációtartományban mértük, az optimalizált paramétereket alkalmazva 0,5-10 ng/ml tartományban kapunk lineáris válaszjeleket, az IC₅₀ érték 2,01±0,47 ng/ml, a detektálás alsó határa 0,1 ng/ml volt (5.28. ábra). Az élelmiszerek megengedhető ochratoxin A-szintjére nemzetközileg elfogadott egységes határértékek még nincsenek, néhány országban ezt 5-50 µg/kg értékben határozták meg, tehát az általunk kifejlesztett eljárás kimutatási határa megfelel az elvárásoknak.



5.28. ábra Ochratoxinmérés kalibrációs görbéje versengő (10 µg/ml ochratoxin-BSAkonjugátum, 2,5 µg/ml anti-ochratoxin A-szérum, szigmoidillesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,093; R²=0,983; IC₅₀ értéke 2,01±0,47 ng/ml)

5.4.4.2. Ochratoxin meghatározása gabonákból

Ochratoxinmentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel (*spike*) kalibrációs sort készítettünk, és meghatároztuk a minták ochratoxin A-tartalmát, amelyeket a ELISA referenciamódszerrel is vizsgáltunk. A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.4. fejezetben leírtak szerint készített acetonitril –víz-kivonatot

készítettünk, majd a mintákat tovább hígítottuk TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4), és immunszenzorral vizsgáltuk a minták hígításának hatását a meghatározásra, az eredményeket ELISA módszerrel ellenőriztük. Az 5.9. táblázatban a minták visszanyerési eredményei láthatók. Megállapítható, hogy mind a búza-, mind pedig a rozslisztből 75% fölött nyertük vissza az ochartoxin A mikotoxint. A minta-előkészítés megfelelt a követelményeknek.

Minto	Ochratoxin A	OWLS	Visszanyerés
winita	(µg/kg)	(µg/kg)	(%)
Búza 1	0	0,11	-
Búza 2	1	0,77	77,3
Búza 3	3	2,61	87,1
Búza 4	5	4,20	83,8
Búza 5	10	10,23	102,3
Búza 6	25	27,37	109,5
Árpa 1	0	0,39	-
Árpa 2	1	0,81	80,9
Árpa 3	3	2,67	88,9
Árpa 4	5	5,50	110,0
Árpa 5	10	10,90	109,0
Árpa 6	25	27,33	109,3

5.9. táblázat Gabonamintákhoz adott (*spike*) ochratoxin visszanyerésének meghatározása

	Ochratoxin A-koncentráció				
Minta Ho	$(\mu g/kg)$				
	Hozzáadott (spike)	ELISA módszerrel mérve	OWLS immunszenzor		
	koncentráció		módszerrel mérve		
Búza 1	2,0	1,80±0,28	0,99±0,35		
Búza 2	5,0	5,2±0,14	3,64±0,86		
Búza 3	1,0	0,9±0,14	1,15±0,15		
Búza 4	10,0	9,4±0,42	8,39±1,18		
Árpa 1	5,0	4,7±0,28	2,99±0,58		
Árpa 2	1,0	$0,8{\pm}0,08$	1,37±0,32		
Árpa 3	10,0	11,1±1,56	9,38±0,50		
Árpa 4	2,0	1,8±0,14	1,51±0,14		

5.10. táblázat Gabonaminták ochratoxintartalmának vizsgálata OWLS és ELISA eljárással (független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten az eredmények között nincs szignifikáns különbség)

Az 5.10. táblázatban az ELISA módszerrel és immunszenzorral mért eredményeket foglaltuk össze, a minták ochratoxin A-koncentrációja a két technikával mérve jól megfelel egymásnak, a kifejlesztett immunszenzor alkalmas gabonák ochratoxin A-szennyezettségének gyors meghatározására.

5.4.4.3. Borminták ochratoxintartalma

Vörösborminták esetleges ochratoxintartalmának meghatározására kalibrációs görbét készítettünk borba mesterségesen szennyezett (*spike*) ochratoxinstandardokkal. Az 5.29. ábra 3 különböző vörösborhoz adott standarddal készített kalibrációs görbéket mutatja be, minden bort 1000x hígítva, legalább 3 szenzoron mérve. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a különböző borok mátrixhatása nem tér el egymástól, nem befolyásolják az ochratoxin meghatározását. Eredményeink alapján a borokban levő ochratoxinszennyezés gyors kimutatására alkalmas az OWLS alapú immunszenzoros eljárás.



5.29. ábra Ochratoxin A mikotoxinnal mesterségese szennyezett (*spike*) borminták indirekt immunszenzorral mért kalibrációs görbéje (3 szenzor átlaga)

Összefoglalásként megállapítható, hogy versengő immunszenzort fejlesztettük ki ochratoxin A meghatározására búza-, árpa- és vörösbormintákból. Az optimalizált mérési eljárást alkalmazva a dinamikus méréstartományt 0,5-10 ng/ml között kaptuk, a gátlási középérték (IC₅₀) 2,01±0,47 ng/ml (χ^2 /szabadsági fok=0,093; R²=0,983), a detektálás alsó határát 0,1 ng/ml értékűnek találtuk. A búza-, árpa- és vörösborminták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.

5.4.5. Immunszenzor fejlesztése deoxinivalenol meghatározására

A búzán a szemek üszkösödését, kukoricában a kalász rothadását okozó, a *F. graminearum* és a *F. culmorum* gombák termelte DON kimutatására nagyérzékenységű, szelektív immunszenzoros mérési módszer kifejlesztetésére került sor. Az eljárást és az eredményeket a Majer-Baranyi *és mtsai* (2011) tudományos közleményben ismertettük.

5.4.5.1. DON konjugátumok szintézise

Kétféle konjugátumot készítettünk OVA és BSA alkalmazásával. A konjugáláshoz mind a fehérjéket, mind a DON mikotoxint előkezeltük. Az előkészítéséhez a fehérjék 1-1 mg mennyiségéhez 0,24 ml desztillált vizet és 0,06 ml nátrium-perjodátot (0,1 M, 10 mmol/l nátrium-foszfátban) adagoltunk, az elegyet 20 percig rázattuk, majd dializáló zsákban hűvös helyen 1 napig 1 mmol/l nátrium-acetáttal szemben dializáltuk.

Az antigén előkészítésekor 3 mg DON mikotoxinhoz 30 µl acetonitrilt és 30 µl ecetsavanhidridet (4%, acetonitrilben), valamint katalizátorként 4-dimetil-aminopiridint adtunk, és 1 óráig kevertettük. Az egy óra elteltével 50 µl metanollal 5 percig kevertettük. Az előkészített fehérjékhez 36,6 µl előkezelt DON mikotoxint adtunk, és két óráig kevertettük, majd 20 µl 4%-os nátrium-borohidriddel még két órát kevertettük, végül a kész konjugátumokat gélszűrőn tisztítottuk. A tisztított DON-BSA-konjugátum 0,256 mg/ml fehérjét tartalmazott, míg a DON-OVA-konjugátum fehérjetartalma 5,31 mg/ml értékűnek adódott Bradford (1976) módszere alapján mérve.

A fehérjefrakciók ellenőrzésére a fehérjekonjugátumokat izoelektromos pont alapján szeparáltuk karbamidot tartalmazó poliakrilamid-gélben (4,35%, 7,2 mol/l karbamid), amely pH 3-10 tartományban alkalmas amfolitot tartalmazott a pH-gradiens biztosítására. A fókuszálás befejezése után a fehérjéket triklór-ecetsavban (15% w/v) rázatva fixáltuk, majd Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel detektáltuk. A futtatási kép alapján a standard mintáktól jól elkülönül a BSA-konjugátum és az OVAkonjugátum, tehát ezek a frakciók valóban a fehérje-DON konjugátumot tartalmazták.

5.4.5.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése

A DON-OVA-konjugátummal az 4.2.3. fejezetben ismertetett immunizációs eljárással termeltettük a poliklonális ellenanyagot, majd a szérum tisztítása (ld. 4.2.4. fejezet), liofilizálása után a szérumokat ELISA rendszerben ellenőriztük (ld. 4.2.5.1. fejezet). Megállapítottuk a szérumtitereket, a célvegyületek kötődésének erősségét, valamint a versengő ELISA rendszerben elérhető kimutatási érzékenységet. A termeltetett nyúlszérumok antigénnel szembeni aktivitását indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk (színreakció: torma-peroxidázzal jelölt anti-nyúl kecske IgG konjugátum, hidrogén-peroxid szubsztrát és OPD kromogén 492 nm-en mérve). A szérumtitrálás eredménye alapján az anti-DON szérumokat 200x illetve 500x hígítva alkalmasnak találtuk a DON ELISA mérési eljárással történő szelektív meghatározására. A két szérum fehérjetartalma (A, B) 127,0 mg/ml és 116,2 mg/ml volt, míg a tisztított szérumoké (C, D) 31,8 mg/ml és 39,2 mg/ml volt. Az ellenőrző ELISA mérés alapján a két szérum hasonló eredményt adott, de a B szérum nagyobb érzékenységet mutatott, ezért az abból tisztított D szérummal dolgoztunk a továbbiakban.

5.4.5.3. DON meghatározása direkt módszerrel

A DON direkt módon történő vizsgálatához az aminocsoportokat hordozó szenzor felületén glutáraldehiddel rögzítettük az antitestet különböző hígításban. Mintaként 0,1-1000 ng/ml koncentrációjú DON-standardokat adagoltunk. Vizsgálataink során a legjobb eredményeket abban az esetben értük el, amikor a rögzítéshez 8 μ g/ml koncentrációjú antitestoldatot alkalmaztunk. A kalibrációs görbe alapján a DON koncentrációjától függő jeleket csak a 0,1-100 ng/ml koncentrációtartományban kaptunk, ami az élelmiszerekből történő DON kimutatását nem teszi lehetővé.

5.4.5.4. DON meghatározása versengő módszerrel

A méréseket 120 µl/perc áramlási sebességgel, 24 °C-on termosztálva, 3 perc inkubációs idő elteltével végeztük. A DON-szelektív versengő immunszenzorok kialakításakor a szenzor felületén 512 ng/ml DON-BSA-konjugátumot rögzítettük glutáraldehiddel (2,5%), és különböző koncentrációjú (63,6; 15,9; 8,0; 6,4; 3,2; 2,5; 1,6 µg/ml) antitestoldatot injektáltunk (5.30. ábra). Amint az ábra alapján megállapítható, a nagy hígításban injektált szérumokra (3,2; 2,5; 1,6 µg/ml) mért jelek közel azonosak (21,46±0,48; 18,13±0,60; 17,05±0,89 egység), a görbék alakja bizonytalan. A tömény

szérum (63,6 μg/ml) által adott válasz alapján túl nagy jeleket (68,4±0,8 egység) mértünk. Az optimális szérumkoncentrációt 8 μg/ml értékűnek találtuk.



5.30. ábra Szenzorjelek az anti-deoxinivalenol szérum hígításának függvényében (512 ng/ml DON-BSA; 120 μl/perc; 24 °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, G: 1,6 μg/ml)



5.31. ábra A DON-BSA-konjugátum koncentrációjának hatása a DON válaszjelére (8 μg/ml szérum; 120 μl/perc; 24 °C; 3 perc inkubációs idő)

Korábbi vizsgálataink már igazolták, hogy a szenzor felületén rögzített antigénkonjugátum mennyisége jelentősen befolyásolja a szenzorral mérhető jelek nagyságát és a mérés érzékenységét. A rögzítéshez 128, 256 és 512 ng/ml koncentrációjú DON-BSA-konjugátum oldatot injektáltunk a mérőcellába a szenzor felületére, és a 16 µg/ml töménységű szérumot alkalmaztuk a standardoldatok (0,1; 1; 10 ng/ml) mérésére (1:1 arányban elegyítve). A rögzítéshez 128 ng/ml DON-BSAkonjugátumot alkalmazva 21,7±1,2, 16,7±1,2 és 10,1±0,7 egység nagyságú jeleket mértünk, míg a 256 ng/ml koncentrációjú konjugátum rögzítése esetén a jelek ugyan csak kismértékben nőttek (23,3±0,7; 18,0±0,5, 12,7±0,5 egység), de a stabilitásuk lényegesen javult, szórásuk csökkent. Ugyanakkor 512 ng/ml koncentrációjú konjugátumot rögzítve a jelek ugyan nagyobbak lettek (29,4±0,3; 25,8±0,2 és 24,5±0,2

egység), azonban a jelek közötti különbségek szignifikánsan csökkentek. Az 5.31. ábra mutatja a DON-BSA-konjugátum koncentrációjának hatását a DON meghatározására a jelek csökkenését a vakoldathoz képest. Az eredmények alapján a további mérésekhez a rögzített DON-BSA-konjugátum koncentrációját 256 ng/ml értékűnek választottuk.



5.32. ábra DON indirekt mérésének kalibrációs görbéje (256 ng/ml DON-BSA, 8,0 μ g/ml antitest, statisztikai paraméterek: χ^2 /szabadsági fok= 1,57; r² = 0,99; IC₅₀ értéke 0,15±0,08 ng/ml)

A DON meghatározására alkalmas immunszenzor működési paramétereinek meghatározása után kalibrációs görbét készítettünk 0,001-100 ng/ml koncentrációtartományban, és meghatároztuk a dinamikus mérési tartományt (5.32. ábra). Az eredményeink alapján az indirekt mérési elven működő jelölésmentes immunszenzor dinamikus méréstartománya 0,005-50 ng/ml DON tartománynak, a LOD 0,001 ng/ml, míg a gátlási középérték (IC₅₀) 0,15±0,08 ng/ml értékűnek adódott. Ez a méréstartomány két nagyságrenddel kisebb, mint a direkt szenzor esetében, és közel egy nagyságrenddel kisebb, mint a hasonló immunszenzorok SPR detektálással (Mak *et al.* 2010; Actis *et al.* 2010).

5.4.5.5. A DON immunszenzor tesztelése, búzalisztminták mérése

DON-mentes búzalisztmintából mesterséges szennyezéssel (*spike*) standardokat és "ismeretlen" mintát készítettünk. A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.5. fejezetben leírtak szerint készített acetonitril–víz-kivonatot készítettünk, majd a mintákat tovább hígítottuk TRIS pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4), és immunszenzorral vizsgáltuk a minták mátrixhatását. A DON mikotoxinnal mesterségesen szennyezett mintákat 1000x, 10000x és 100000x hígítva injektáltuk az érzékenyített hullámvezető szenzorra, és megállapítottuk, hogy a minták mátrixhatása a 10000x hígításnál már nem zavarta a mérést. Ugyanakkor a jelek megfelelően stabilak és reprodukálhatóak voltak. A mesterségesen szennyezett mintákkal nyert kalibrációs görbe alapján a lineáris méréstartomány a lisztmintára számolva 0,01-10 mg/kg, míg az IC₅₀ értéke 0,13±0,04 mg/kg értékűnek adódott, ami megfelel a követelményeknek (max. 0,2 mg/kg DON lehet gyermekeknek szánt gabona alapú termékekben, 1,75 mg/kg DON lehet a feldolgozatlan durumbúzában, (Commission Regulation (EC) No 1881/2006) (5.33. ábra). Az 5.11. táblázatban az "ismeretlen" minták mérési, visszanyerési eredményeit foglaltuk össze, és megállapítottuk, hogy a búzalisztből a DON mikotoxint a mintaelőkészítés során 90% fölött nyertük vissza, a minta-előkészítés és az immunszenzorral végzett meghatározás megfelelt a követelményeknek.



5.33. Búzaliszt mintákban lévő DON kalibrációs görbéje (256 ng/ml DON-BSA; 8,0 μ g/ml antitest, statisztikai paraméterek: χ^2 /szabadság fok= 1,90; r² = 0,98)

Hozzáadott DON (mg/kg)	Mért DON (mg/kg)	Visszanyerés (%)
0,005	$0,006\pm0,002$	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

5.11. táblázat Búzaliszt mintákban lévő DON visszanyerési eredményei

Összefoglalásként megállapítható, hogy sikeresen fejlesztettünk ki DONtartalmának meghatározására szelektív immunszenzoros mérési eljárást. A DON mikotoxinból nátrium-perjodátos kezelés után konjugátumot készítettünk OVA és BSA alkalmazásával. A DON-OVA konjugátum segítségével poliklonális antitestet készítettünk. A biomolekulák alkalmazásával fejlesztettük ki a versengő immunszenzort. A DON-standardokat vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,005-50 ng/ml, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,15±0,08 ng/ml (χ^2 /szabadsági fok=1,57; r²=0,99), a kimutatás alsó határa 0,001 ng/ml értékűnek adódott. A deoxinivalenollal adalékolt búzalisztmintákkal nyert kalibrációs görbe alapján a dinamikus méréstartomány a lisztmintára számolva 0,01-10 mg/kg volt, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,13±0,04 mg/kg értékűnek adódott, ami megfelel az előírásokban foglalt követelményeknek.

5.4.6. Hisztamin meghatározására szolgáló immunszenzor fejlesztése

A fermentált zöldséglevekben megjelenő biogén aminok meghatározására alkalmas immunszenzort fejlesztettünk ki. Az optimalizált mérési eljárásról és a zöldséglevek mérési eredményeiről az Adányi és mtsai (2012) publikációban számoltunk be.

5.4.6.1. Hisztamin-BSA-konjugátum készítése

A versengő mérés kifejlesztéséhez szükség volt a szenzor felületén rögzíthető hisztaminkonjugátum elkészítésére. Mivel a kereskedelmi anti-hisztamin antitestet hisztamin-KLH-konjugátum ellen termeltették, így a hisztamin-BSA-konjugátum alkalmasnak ígérkezett a rögzítéshez. A BSA fehérjét szukcináltuk úgy, hogy a fehérjében kialakított karboxilcsoporthoz konjugáltuk a hisztamin antigént. Ezért 10 mg (16,7 µmol) BSA-t oldottunk 10 ml dikálium-hidrogén-foszfát-oldatban (0,2 M). Egy külön edényben 10 mg (100 µmol) borostyánkősav-anhidridet oldottunk 1 ml nátrium-hidroxid-oldatban (3 M), majd ezt az oldatot lassan, keverés közben a fehérjeoldathoz adtuk és 5 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. A keletkező oldatot desztillált vízzel szemben 2 napig dializáltuk, a desztillált vizet rendszeresen cseréltük, majd a terméket liofilizáltuk (11,3 mg termék).



5.34. ábra Hisztamin-BSA-konjugátum poliakrilamid-gélelektroforézissel kapott képe (1. BSA, 2. szukcinált BSA, 3. hisztamin-BSA, 4. 1-2 keverék, 5. 2-3 keverék, 6. 1-3 keverék, 7. standard)

A szukcinált BSA 10 mg mennyiségét (0,16 µmol) 1,5 ml dimetil-formamidban oldottuk, és argongáz alatt 5,4 mg (72 µmol) NHS és 13,8 mg (72 µmol) EDC reagenseket adtunk hozzá. Az oldatot 2 órán át kevertettük szobahőfokon, majd szűrtük. 6,9 mg (62 µmol) hisztamint 0,35 ml dimetil-formamidban oldottuk, a 4 °C-ra hűtött és kevertetett reakciókeverékhez adtuk, majd további 24 órán át kevertettük (4 °C). Hét ml desztillált vizet adtunk a keverékhez és 1 napig desztillált vízzel szemben dializáltuk, a vizet rendszeresen cserélve. A keletkezett terméket poliakrilamid-gélen izoelektromos fókuszálással vizsgáltuk (6 mol/l karbamid és Ampholine, pH 3-10 jelenlétében, 5.34. ábra). A tisztított termékként a hisztamin-BSA-konjugátum számított mennyiségének 82%-át sikerült kinyernünk, a termék összfehérje-tartalma 23,4 mg/ml értékűnek adódott Bradford módszerével mérve (Bradford, 1976).

5.4.6.2. Direkt immunszenzor kifejlesztése hisztamin meghatározására

A nem versengő eljárás során az anti-hisztamin antitestet rögzítettük a szenzor felületén, és közvetlenül mértük a standard oldatokban a hisztamin koncentrációját. A rögzítéshez szükséges antitest mennyiségét vizsgálva megállapítottuk, hogy a törzsoldatot 100x hígítva kaptunk stabil, reprodukálható jeleket. A hisztamin meghatározására alkalmas direkt immunszenzor méréstartománya 0,05-10,0 µg/ml volt, ami nem elégítette ki az élelmiszerekben levő hisztamin kimutatásának követelményeit (5.35. ábra).



5.35. ábra Hisztamin meghatározására alkalmas direkt immunszenzor kalibrációs görbéje (anti-hisztamin antitest 100x hígítva)

5.4.6.3. Versengő immunszenzor kifejlesztése hisztamin meghatározására

A versengő immunszenzor mérési protokolljának kidolgozása során a hisztamin-BSA konjugátumát rögzítettük a szenzor felületén, majd az antitestet feleslegben tartalmazó oldatot elegyítettük az antigénstandarddal, megfelelő ideig inkubáltuk, majd injektáltuk a rendszerbe és mértük a feleslegben maradt, az antigének által nem kötött antitestek mennyiségét. Vizsgáltuk a glutáraldehiddel rögzített hisztamin-BSAkonjugátum mennyiségének hatását a jelek nagyságára, stabilitására és a 10 µg/ml koncentrációjú oldat alkalmazása bizonyult megfelelőnek. Az antitest hígítási sorát (100x, 500x, 1000x, 2000x és 5000x) vizsgálva az anti-hisztamin antitest 1000x hígítását alkalmaztuk a további mérésekhez (~20 egység). A 10^{-3} - 10^2 pg/ml méréstartományban vizsgáltuk a hisztamin standard oldatokra nyert jelek nagyságát, és megállapítottuk, hogy a kifejlesztett eljárással a dinamikus méréstartomány 10^{-2} -1 pg/ml, a gátlási középérték IC₅₀ 0,08±0,02 pg/ml értékűnek (szigmoidillesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,19;), a kimutatás alsó határa 0,005 pg/ml értékűnek adódott.

5.4.6.4. Az immunszenzor szubsztrátspecifitása, fermentált zöldséglevekben lévő hisztamin koncentrációjának meghatározása

Vizsgáltuk, hogy a hisztamin meghatározására alkalmas immunszenzor a különböző biogén aminokkal mekkora jelet ad, és megállapítottuk, hogy a hisztamin szelektíven határozható meg az immunszenzorral, ha a különböző biogén aminok hasonló koncentrációban vannak jelen, mint a hisztamin. A hisztamin jelét 100%-nak véve, az azonos koncentrációjú putreszcinre 13,6%-os, kadaverinre 1,9%-os, agmatinra 4,3%-os keresztreakciót mértünk.

A különböző fermentált zöldséglevek hisztamintartalmát a kifejlesztett immunszenzorral vizsgáltuk (ld. 4.3.6. fejezet). Az előkészített mintákat 100x, 1000x és 10000x hígítottuk TRIS (42 mmol/l, pH 7,4) pufferrel. és mértük a hisztamintartalmukat. A 1:100 arányban hígított, hisztamint nem tartalmazó mintával a standard oldat jelénél lényegesen nagyobb, ~30-35 egység nagyságú jeleket kaptunk a mátrixhatás miatt. A jelek stabilak és jól kiértékelhetőek voltak, azonban csak 15-20 mintát lehetett egymás után mérni a szenzorral. Az 1000x hígított mintákkal továbbra is jól kiértékelhető jeleket kaptunk, és egy szenzorral 25-30 mintát mértünk egymás után. A minták 10000x hígításával azok hisztamintartalma már a mérési tartomány alsó határának közelébe került, a jelek szórása igen nagy. Az eredményeket értékelve megállapítottuk. hogy 1000x hígított minták mérésével lehetett az а hisztaminkoncentrációt meghatározni. A minták hisztamintartalmát a pufferes standardokkal felvett kalibráció alapján határoztuk meg, a minták mátrixhatása a szűrés és a hígítás után nem okozott eltérést. Az immunszenzorral mért eredményeket a 4.2.5.3. fejezetben ismertetett HPLC eljárással meghatározott értékekkel hasonlítottuk össze. Az immunszenzorral mért értékek néhány minta esetében magasabbnak adódtak, mint a HPLC eljárással meghatározott hisztaminkoncentráció (pl. savanyú káposzta, kovászos uborka, tárolt csalamádé).



5.36. ábra Zöldségléminták biogénamin-tartalmának összehasonlítása (A, B: savanyú káposzta, C: kovászos uborka, D: csalamádé friss, E: csalamádé tárolt, F,G,H: fermentált sárgarépalé)

Tovább vizsgálva ezeknek a mintáknak a biogén amin-összetételét a HPLC eljárással nyert adatok alapján megállapítható, hogy a mintákban a hisztamin koncentrációjánál jóval nagyobb mennyiségben vannak jelen azok a biogén aminok, amelyek az immunszenzorral jelet adnak (putreszcin, kadaverin, agmatin). Ha ezeknek a biogén aminoknak a HPLC-vel meghatározott koncentrációját a specifitásuk %-ának arányában vettük figyelembe a kiértékelésnél (normált HPLC értékek), akkor igen jó egyezést (R²=0,97) kaptunk a fermentált zöldséglevek különböző technikával mért hisztaminkoncentrációja között (5.36. ábra). Mérési eredményeink szerint, ha az egyes biogén aminok a hisztaminnál lényegesen nagyobb koncentrációban vannak jelen a mintákban, jelentősen befolyásolják a szenzorral mért eredményeket. Ennek ellenére a szenzor gyors mérésre alkalmas, csak az adott határértéket meghaladó koncentrációt mutató mintákat kell a további vizsgálatokba bevonni.

Összefoglalásként megállapítható, *jelölésmentes* hogy érzékeny, fejlesztettünk immunszenzort ki fermentált zöldséglevek hisztaminkoncentrációjának gyors meghatározására. A versengő immunszenzor kialakításához elkészítettük a célvegyület-BSA konjugátumát és rögzítettük a szenzor felületén. A kifejlesztett eljárással a dinamikus méréstartomány 10⁻²-1 pg/ml közé esett, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,08±0,02 pg/ml (szigmoidillesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,19), a kimutatás alsó határa 0,005 pg/ml értékűnek adódott. Fermentált zöldséglevekben lévő hisztamin koncentrációjának meghatározása során megállapítható, hogy ha az egyes biogén aminok (putreszcin, kadaverin, agmatin) a hisztaminnál lénvegesen nagyobb koncentrációban vannak jelen, akkor ezek befolyásolják a szenzorral mért eredményeket. Ha az adott biogén aminoknak a HPLC módszerrel meghatározott koncentrációját az immunszenzorral mért keresztreakció %-ának arányában vettük figyelembe (normált HPLC értékek), akkor igen jó egyezést (R^2 =0,97) kaptunk a fermentált zöldséglevek különböző technikával mért biogén aminkoncentrációja között. Annak ellenére, hogy az immunszenzorral mért hisztaminkoncentrációt a különböző biogén aminok nagy koncentrációban való jelenléte befolyásolja, a szenzor gyors mérésre alkalmas, csak az adott határértéket meghaladó koncentrációt mutató mintákat kell a további vizsgálatokba bevonni.

5.4.7. Immunszenzor fejlesztése vitellogenin (Vtg) meghatározására

A környezetet szennyező szermaradványok egy része az élőlények hormonális rendszerét károsító, ún. endokrin zavaró (ED) vegyületek közé tartozik, amelyek különböző mechanizmusokon keresztül megzavarhatják az egyes állatok hormonháztartását. Ennek a hatásnak a gyors, átfogó vizsgálatára alkalmas biomarker vegyületnek bizonyult a nemi működést befolyásoló vitellogenin fehérje, ezért immunszenzort fejlesztettünk hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és kétéltű (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) Vtg kimutatására. Az eredményeket az Adányi *és mtsai* (2013c), valamint a Székács *és mtsai* (2009) tudományos közleményekben ismertettük.

5.4.7.1. Ponty és béka lipovitellin (Lpv) tisztítása

Irodalmi adatok alapján (Hara et al. 2007; Vincent 2001; Volz and Chandler 2004; Holbech et al. 2001) 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. A Lpv tisztításához a nőstény ponty és keleti unka petefészkét izotóniás foszfátpufferben (pH 7,4) mostuk, 0,5 mol/l NaCl-oldatban homogenizáltuk (0,5 g/ml, 12 h, 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) adagolásával kicsaptuk, a csapadékot ismét centrifugáltuk és ammónium-szulfát-oldattal mostuk, hogy az elszíneződést eltávolítsuk. A fehérjéket 0,2 mol/l NaCl-oldatban visszaoldottuk, DEAE-cellulóz-oszlopon gélszűréssel tovább tisztítottuk (0,1 mol/l TRIS puffer, pH 7,8, 0-300 mmol/l NaCl gradiens). Az Lpv-preparátumok tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltuk (Hajós and Idei, 2001). Az SDS-PAGE gélek alapján a pontyból és a békából tisztított Lpv különbözött egymástól, mivel az Lpv fajspecifikus fehérje. A ponty-Lpv vizsgálatakor 110-120, 96 és 85 kDa fehérjefrakciókat különböztethettünk 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). Az Lpv-frakciók tehát a különböző fajokra eltérő méretűek, a fajra specifikusak, elkülöníthetőek egymástól. A tisztított Lpv-készítményeket 37%-os ammónium-szulfát-oldatban 4 °C-on csapadékként tároltuk. Mindkét Lpv-preparátum koncentrációjára 3 mg/ml fehérjét mértünk.

5.4.7.2. Poliklonális ellenanyag előállítása, szérumok jellemzése

A homogenizált Lpv-preparátumoldatokból 1 ml térfogatnyit centrifugáltunk, majd a fehérjét 0,2 mol/l NaCl-oldatban visszaoldottuk, úgy hogy 1 mg/ml oldatot kapjunk. Ezekkel az antigénoldatokkal immunizáltunk nyulakat a 4.2.3. fejezetben ismertetett eljárással, majd a szérum tisztítása (ld. 4.2.4. fejezet), liofilizálása után a szérumokat ELISA rendszerben ellenőriztük (ld. 4.2.5.1. fejezet).

A ponty-anti-Lpv szérumot ELISA eljárással ellenőrizve az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a két immunizált nyúlból származó származó szérumok aktivitása ugyan eltér egymástól, de mindkét nyúlból származó szérum, valamint a tisztított szérumok is alkalmasak a vitellogenin meghatározására. A kiválasztott szérum összes fehérjetartalma 43 mg/ml értékűnek adódott.



5.37. ábra Béka-Lpv-specifitású immunszérum hígítási görbéje

A béka-anti-Lpv szérumok jellemzésére a nyers szérummintát és a tisztított szérumot az előzőekhez hasonlóan ELISA eljárással vizsgáltuk. Az eredmények alapján (5.37. ábra) megállapítottuk, hogy a B nyúlból származó szérum 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.

5.4.7.3. Direkt immunszenzor kifejlesztése vitellogenin meghatározására

A direkt immunszenzorok fejlesztésekor az aminocsoportokat hordozó szenzorra 2,5%-os glutáraldehiddel rögzítettük az anti-Lpv-szérumot. A ponty-Lpv vizsgálatához különböző hígítású szérumot (215; 86; 43; 21,5; 8,6 μ g/ml) rögzítettünk az aminoszilanizált szenzor felületén, és a Lpv-standardokra adott válaszjel nagysága és stabilitása alapján a 43 μ g/ml fehérjekoncentrációjú szérum injektálása esetén kaptunk megfelelő eredményeket. A lineáris méréstartomány 0,6 és 12 μ g/ml Lpv között volt, a mérési jelek pedig 5,22±0,45 és 18,71±0,9 egység között változtak a standardok

koncentrációjának megfelelően. A Lpv kimutatási határa 0,3 µg/ml értékűnek adódott, ami megfelel a Kim *és mtsai* (2008) hasonló mérési meghatározott eredményeinek.

A béka-Lpv direkt immunszenzorral történő meghatározásához az antitestet előzetes kísérletek alapján 17,6; 8,8; 3,52; 1,76 és 0.88 µg/ml koncentrációjú oldatot injektálva rögzítettünk a szenzor felületén, és vizsgáltuk a béka-Lpv-standardokra adott válaszjel nagyságát. A vizsgálataink során az 1,76 µg/ml fehérjét tartalmazó szérumot alkalmazva kaptunk jól értékelhető görbéket. A dinamikus méréstartomány (5.38. ábra) 0,6 és 12 µg/ml Lpv közé esett, a kimutatási határa 0,3 µg/ml.



5.38. ábra Béka-Lpv kalibrációs görbéje direkt immunszenzorral mérve (szigmoidillesztés, χ²/szabadsági fok=0,95; R²=0,99)

5.4.7.4. Versengő immunszenzor kifejlesztése vitellogenin meghatározására

Az OWLS szenzor felületén glutáraldehiddel rögzítettük a ponty-Lpv fehérjét (6 μ g/ml), majd sósavval történő regenerálás után különböző hígítású szérumot injektáltunk (430,0; 215,0; 86,0; 64,1; 43,0; 21,5 μ g/ml). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy 64,1 és 86,0 μ g/ml koncentrációjú szérumokkal megfelelő nagyságú és stabilitású jeleket mérhettünk (28,83±0,76 és 27,34±0,83 egység). A továbbiakban 64,1 μ g/ml töménységű szérumot alkalmaztunk a ponty-Lpv koncentrációjának meghatározására. Különböző hígítású ponty-Lpv fehérjét (1, 3, 5, 10, 15 μ g/ml) rögzítve az aminoszilanizált szenzor felületén optimális jeleket a 3 μ g/ml vagy 5 μ g/ml koncentrációjú Lpv-oldattal érzékenyített szenzorral mértünk (28,45±0,61 és 29,67±0,79 egység).

A béka-Lpv rögzítéséhez, az antitest megfelelő koncentrációjának meghatározásához is elvégeztük optimálási kísérleteket. Ennek alapján az antitest megfelelő koncentrációja 2,22 μ g/ml értékűnek adódott, a mért jel pedig \approx 21 egység, míg a rögzítéshez 0,1 μ g/ml béka-Lpv fehérjét alkalmaztunk.

A versengő mérések során a megfelelően hígított szérumoldatot elegyítettük a standard- vagy a mintaoldattal, megfelelő ideig inkubáltuk, és a cellába injektálva mértük a szabadon maradt antitestek mennyiségét. Az inkubálás körülményeit vizsgálva megállapítottuk, hogy 3 percig változnak a jelek, az ennél hosszabb inkubálási idő nem befolyásolja a jelek nagyságát. Az inkubálás hőmérsékletét vizsgálva (20-38 °C között) kiderült, hogy a hőmérséklet növelése kisebb jeleket eredményezett. A szobahőmérsékleten végzett mérés során nagyobb a mért jelek közötti különbség a 3-300 ng/ml Lpv méréstartományban, mint 38 °C-on termosztálva (5.39. ábra). A 30, 60 és 150 ng/ml Lpv-standardokat 21 °C-on inkubálva, a referenciaantitest jeléhez képest

7,33±0,06, 10,84±0,03 és 12,18±0,04 egység csökkenést mértünk, míg ezeket a mintákat 38 °C-on inkubálva a jelcsökkenésre 5,22±0,76, 4,57±0,48 valamint 5,84±0,85 egységet kaptunk. Béka-Lpv mérése során hasonló tendenciát figyelhettünk meg, mindkét esetben 20 °C-on végeztük a minták inkubálását és mérését is.



5.39. ábra Ponty-Lpv versengő eljárással különböző hőmérsékleten készített kalibrációs görbéje (3 μg/ml Lpv rögzítve, 64,1 μg/ml antitest)

Az optimális mérési paraméterek alkalmazásával kalibrációs görbét készítettünk ponty-Lpv fehérjére 0,3-300 ng/ml méréstartományban. A dinamikus méréstartomány 3 és 150 ng/ml Lpv között volt, a kimutatás alsó határa pedig 0,7 ng/ml. A versengő mérés érzékenysége 2 nagyságrenddel kisebb, mint a direkt módszerrel mérve. A szigmoid görbe alapján a gátlási középérték (IC₅₀) értéke 21,18 \pm 2,86 ng/ml, a görbe meredeksége 0,99 \pm 0,12 értékűnek adódott.

A béka-Lpv fehérjét vizsgálva 0,001-1000 ng/ml méréstartományban készítettünk kalibrációs görbét, a dinamikus méréstartomány 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott. Az Lpv kimutatásának alsó határára 0,1 ng/ml, míg a gátlási középértékre (IC₅₀) 1,04 \pm 0,14 ng/ml értéket kaptunk.

5.4.7.5. Az anti-vitellogenin szérum szubsztrátspecifitása

Vizsgáltuk mind a ponty-Lpv, mind a béka-Lpv ellen termeltetett antitest szubsztrátspecifitását. A ponty-Lpv fehérjével érzékenyített immunszenzorral összehasonlítottuk, hogy 0,1, 1 és 10 ng/ml ponty- illetve béka-Lpv fehérjét tartalmazó oldatok mekkora jelcsökkenést okoznak. Míg a pontyminták hatására 1,25 \pm 0,41, 6,63 \pm 0,15 és 9,69 \pm 0,28 egység csökkenést mértünk, addig a békastandardok esetében lényegesen kisebb, 0,27 \pm 0,36, 0,83 \pm 0,20 és 1,84 \pm 0,15 egység csökkenést észleltünk. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a ponty-Lpv szelektíven mérhető a kifejlesztett OWLS immunszenzorral.

A béka-Lpv rögzítésével készített immunszenzorral béka-, illetve ponty-Lpv fehérjét tartalmazó standardokat (0,1, 1, 10 és 100 ng/ml) vizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy a ponty-Lpv a béka-Lpv jeléhez képest $17,7\pm5,2\%$, $12,7\pm6,1\%$, $3,3\pm1,3\%$ és 4,9 $\pm1,0\%$, jelcsökkenést eredményezett, tehát a béka-Lpv ellen termeltetett antitest is szelektíven köti a fajspecifikus antigén fehérjét (5.40. ábra).



dc 457 12

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

5.4.7.6. Valós minták mátrixhatása, Vtg meghatározása biológiai mintákból

Az immunszenzorok fejlesztéséhez pufferben oldott standardokat alkalmaztunk. Célszerű volt a továbbiakban a biológiai minták okozta mátrixhatást, illetve annak eliminálási lehetőségét megvizsgálni.

A ponty-Lpv vizsgálatához ökológiai tenyészetből származó hím hal vérszérumát mesterségesen szennyeztük (spike) 0,01-1000 ng/ml tartományban Lpv fehérjével, és ezeket a mintákat használtuk standardként, további mintákat készítve vizsgáltuk a visszanverés arányát (ld. 4.3.7. fejezet). Az 1, 10 és 100 ng/ml Lpv fehérjét tartalmazó vérmintákból a visszamérést 140%, 89% és 84%-nak találtuk. Vizsgáltuk további hím és nőstény pontyok vérszérumában a Vtg-szintet, eredményeink alapján a hím egyedek Vtg-szintje 0,5±0,3, illetve 5,7±1,8 µg/ml Vtg-nek adódott, addig a nőstény egyedekben 246,1±19,6, 367,5±54,7 és 465,4±46,9 µg/ml Vtg-t mértünk az immunszenzorral. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak a Scott és mtsai (2006) által közölt értékekkel, akik tőkehal Vtg-szintjét vizsgálták. A pontyok májában levő Vtg koncentrációját is mértük a 4.3.7. fejezetben leírt előkészítés után. Úgy találtuk, hogy a minták mátrixhatása lényegesen nagyobb volt, mint a vérszérumok esetében. A hím pontyok májában 1,8±0,7 µg/g Vtg-t mértünk, míg a nőstény egyedekben 33,1±6,7 µg/g Vtg-t mutattunk ki. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a kifejlesztett immunszenzor alkalmas a Vtg-koncentráció hím pontyok vérében történő mérésére. A mérési eredményekből megfelelő információt kaphatunk a víz endokrin zavaró vegyületekkel való szennyezettségéről. Mint korábban említettük, a hím egyedek vérében lévő Vtg-koncentráció növekedése vizes élőhelyük endokrin zavaró vegyületekkel való szennyezésére utal. Annak ellenére, hogy a szennyezés eredetét nem tudjuk meghatározni, az új szenzor alkalmas lehet a vizek esetleges szennyezettségének gyors jelzésére.





5.41. ábra A békamájkivonatba mesterségesen szennyezett Lpv mérésének kalibrációs görbéje (a minták hígítása: 1000x, 5000x és 10000x; IC₅₀ 0,46; 0,031; 0,055 ng/ml)

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

a 1:5000 hígításban mérve

b 1:1500 hígításban mérve

c mátrixhatás

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

A béka szöveti minták vizsgálatánál tekintettel kellett lenni arra, hogy a vizsgált vöröshasú unka fiatal egyedei igen kicsik, ezért nem lehetett csak vérmintából dolgozni, hanem a szív és vér együtt került feldolgozásra a minta készítése során a 4.3.7. fejezetben leírt eljárással. A mátrixhatás kiküszöbölése érdekében a kontrollált körülmények között tenyésztett hím egyedekből készített szív- és vérkészítménybe mesterségesen szennyeztük (spike) az Lpv-standardokat és vizsgáltuk az optimális méréstartományt (5.41. ábra). A mintákat 1000x hígítva kisebb jeleket kaptunk és a méréstartomány is szűkebb volt, mint nagyobb hígítás alkalmazásakor. Az 5000x minták megfelelő jeleket kaptunk 0.001-1 hígított mérésekor ng/ml koncentrációtartományban, míg a 10000x hígított minták már túlságosan hígnak bizonyultak. Nőstény és hím egyedek máj-, szív- és vér- illetve ivarmirigypreparátumából vizsgáltuk a természetes Vtg-szintet, a legmagasabb értékeket a várakozásnak megfelelően a petefészekből és a petéből mértünk (754,5±73,5 és

1030,0±298,5 µg/g, 5.12. táblázat). Az eredményeket ELISA módszerrel hasonlítottuk össze.

Összefoglalva eredményeket, az elért versengő immunszenzort fejlesztettünk ki OWLS detektálással hal (ponty, Cyprinus carpio), és béka (vöröshasú unka, Bombina bombina) Vtg fehérjéjének kimutatására. A Vtg fehérjével az azonos fajban 95% keresztreakciót mutató Lpv fehérje tisztítását nőstény ponty és keleti unka petefészkéből végeztük. A tisztított Lpv fehérjékkel nyulakat immunizálva antitesteket termeltettünk. A tisztított Lpv fehérjék és az antitestek alkalmazásával alakítottuk ki az immunszenzorokat. A ponty-Lpv dinamikus méréstartománya 3 és 150 ng/ml Lpv közé esett, a gátlási középérték (IC₅₀) 21,18 \pm 2,86 ng/ml, a kimutatás alsó határa 0,7 ng/ml értékűnek adódott. A béka-Lpv fehérjét vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott. Az Lpv kimutatásának alsó határára 0,1 ng/ml, míg a gátlási középértékre (IC₅₀) 1,04±0,14 ng/ml értéket kaptunk. Ökológiai tenyésztésből származó hím és nőstény pontyok vérszérumában vizsgáltuk a Vtg-szintet, eredményeink alapján a hím egyedek Vtg-szintje 0,5±0,3, illetve 5,7±1,8 µg/ml, a nőstény egyedekben 246,1±19,6, 367,5±54,7 és 465,4±46,9 μg/ml Vtg fehérjét mértünk az immunszenzorral. Nőstény és hím békaegyedek máj-, szív- és vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltuk a természetes Vtg-szintet. A minták közül a legnagyobb koncentrációt – a várakozásnak megfelelően – a petefészekben és a petében találtuk (754,5±73,5 és 1030,0±298,5 µg/g). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, 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 monitorozni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek endokrin zavaró hatású szermaradványokkal való szennyezettségét.

5.5. Mikrobák vizsgálata és mikrobiális szenzorok fejlesztése OWLS és EC-OWLS technika alkalmazásával

A bioszenzoros fejlesztések terén nagy figyelem irányult a mikróbák kimutatására, valamint a baktériumok rögzítésével kialakított mikrobiális szenzorok alkalmazására is. Munkám következő részében a mikrobiális szenzorfejlesztések során elért eredményekről, valamint az egyes baktériumok szelektív meghatározására kialakított szenzorokról számoltam be. Az élő sejtek rögzítését OWLS és EC-OWLS technikára alapozva is vizsgáltuk, gátláson alapuló szenzorokat alakítottunk ki kémiai zavaró vegyületek LAB-sejtekre gyakorolt hatásának kimutatására, *E. coli*-sejtek szelektív kimutatására immunszenzort, valamint bioszilika alapú rögzítési eljárással gátlási szenzort dolgoztunk ki szermaradványok gyors kimutatására.

5.5.1. Kémiai stresszfaktorok hatásának vizsgálata *Lactobacillus plantarum* 2142-sejteken

Fermentált savanyúságok készítéséhez különböző LAB-törzseket alkalmaznak, azonban a sejtek optimális működésének biztosítása érdekében vizsgálni kell, hogy az alkalmazott sejtek hogyan tolerálják a fermentáció során keletkező szerves savakat, hidrogén-peroxidot. E hatások tanulmányozására szenzort fejlesztettünk ki, amelyben az élő LAB-sejteket rögzítettük a szenzor felületére, ügyelve arra, hogy a rögzítés során a

sejteket ne károsítsuk agresszív ágensek használatával. Eredményeinket az Adányi és *mtsai* (2006a) valamint a Németh és *mtsai* (2007) közleményekben ismertettük.

5.5.1.1. LAB-sejtek rögzítése a feszültség függvényében

Az EC-OWLS alkalmazására vonatkozó előkísérletekkel meghatároztuk az áramlási sebesség és az injektált minta mennyiségének hatását az áramló rendszer működésére, és az eredmények alapján kísérleteink során 200 µl/perc áramlási sebességet alkalmaztunk, injektáláskor 200 µl mintát juttattunk a mérőrendszerbe. A Lactobacillus plantarum 2142-törzset alkalmaztuk a vizsgálatok során, és elsőként a polarizációs potenciálnak az élő sejtek rögzítésére gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Mintaként 10⁸ TKE/ml baktériumot szuszpendáltunk 100x hígított JA-oldatban, és ezt injektáltuk. A baktériumsejtek az injektálást követően az elektrokémiai átfolyó cellába kerültek, ahol az ITO-szenzor felszínén adszorbeálódtak. Az adszorpciót a polarizációs potenciál befolyásolta. Megközelítőleg 6 perccel az injektálás után a jel stabilizálódott, a rögzített sejtek relatív tömegét az alkalmazott polarizációs feszültség függvényében állapítottuk meg, majd regeneráltuk a szenzort (polarizációs feszültség lekapcsolásával és 0,1 mol/l sósav injektálásával). A potenciált Pt-referenciaelektróddal szemben 0 és 1,2 V között változtattuk. Az 5.42. ábra mutatja, hogy ha növeltük a polarizációs feszültséget az ITO-cellában, akkor nőtt az immobilizált sejtek relatív tömege, több sejt kötődött a szenzor felszínén. A legnagyobb jelet 0,8 és 1 V feszültség mellett mértük. Ha tovább növeltük a feszültséget, a jelek kismértékben csökkentek. A további mérésekhez 1 V polarizáló feszültséget alkalmaztunk.



5.42. ábra Az OWLS jel és az elektródpotenciál közötti függvénykapcsolat LAB-sejtek injektálása esetén (10⁸ TKE/ml)

5.5.1.2. Az OWLS jel és az elektródpotenciál közötti LAB-sejtek kalibrációs görbéje, élő és hőkezeléssel elpusztított LAB-sejtek adszorpciója

Az optimálisnak talált 1 V polarizációs feszültség alkalmazásával kalibrációs görbét készítettünk 10^3-10^8 TKE/ml sejtet tartalmazó oldat mérésével (100x hígított JAszirupban, 3 párhuzamos mérés). Az 5.43. ábra mutatja, hogy a 10^3-10^4 TKE/ml töménységű minták esetében csak kis jeleket mértünk (2-3 egység). A dinamikus méréstartomány 10^4-10^8 TKE/ml értékűnek adódott, a töményebb minták esetében a szenzor felülete már telítődött (~80 egység).





5.43. ábra LAB-sejtek kalibrációs görbéje 1 V polarizációs potenciálon



5.44. ábra Élő és hőkezeléssel elpusztított LAB-sejtek jele a koncentráció függvényében (1 V polarizációs potenciálon)

Vizsgáltuk, hogy az EC-OWLS technikával különbséget tudunk-e tenni az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek között. A hőkezelést az MRS tápoldatban 24 órán keresztül szaporított sejtekkel 100 °C-on 15 percig végeztük, majd centrifugálás után JA-oldatban (100x) reszuszpendáltuk a sejteket. Az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtekből azonos hígítással készítettünk oldatot (10⁸ TKE/ml), majd a két oldatot különböző arányban összekevertük (0, 25, 50, 75, 90, 95, 99, 100% élő sejtek), és a mintákat mértük az EC-OWLS átfolyó rendszerben. Az eredmények szerint a hőkezeléssel elpusztított sejtek csak kis jeleket adtak (16,8±0,9 egység), nem tudtak a polarizáló feszültség hatására sem adszorbeálódni a szenzor felszínén, míg az azonos töménységű, de növekvő arányban élő sejtekkel már 64,2±3,4 egység nagyságú jelet mértünk.

5.5.1.3. Hidrogén-peroxid hatása a LAB-sejtekre

A baktériumsejtek az injektálást követően az elektrokémiai átfolyó cellában az ITO-szenzor felszínén időben stabil jelet adtak, az adszorbeálódott sejtek nem mosódtak le a JA-oldat folyamatos áramlásának hatására sem. Az adszorbeálódott sejteket ezután savaknak és hidrogén-peroxidnak tettük ki, és vizsgáltuk a baktériumokra gyakorolt

hatásukat. Minden minta mérését regenerálási lépés követett, amikor a polarizáló potenciált kikapcsoltuk, és 0,1 mol/l HCl-val kimostuk a rendszert.



5.45. ábra LAB-sejtek jele hidrogén-peroxid jelenlétében (10⁸ TKE/ml, 1 V)



5.46. ábra Hidrogén-peroxid különbség-görbéje LAB-sejtek jelenlétében $(10^8 \text{ TKE/ml}, 1 \text{ V})$

Annak ellenére, hogy az alkalmazott polarizációs potenciál hatására az átfolyó hidrogén-peroxid egy része oxidálódik, a gátló hatás a folyamatos áramlás miatt követhető. A LAB-sejteket (200 μ l, 10⁸ TKE/ml) injektáltuk és 1 V polarizáló feszültséggel rögzítettük az ITO-szenzor felszínén. Az injektálást követő kb. 6 perc múlva a mérési jel stabilizálódott, csak kis emelkedést, alapvonal-eltolódást tapasztaltunk. Ezután a JA-oldatot külön-külön mérésben 0,009; 0,09; 0,9 és 9,0 mmol/l hidrogén-peroxidot tartalmazó JA-oldatra cseréltük, és 40 percig áramoltattuk a rögzített sejteket tartalmazó mérőcellában (5.45. ábra). A cellában a sejtekkel a JA-oldat folyamatos áramlása mellett végzett referenciamérés alapján feltételeztük, hogy a mérési idő alatt sejtszaporodás nem megy végbe, nem tapasztaltunk jelnövekedést. A korábbi mérések alapján feltételezhető, hogy ha a sejtek a stressz hatására elpusztultak volna, akkor jelentős jelcsökkenést detektálnánk. A H₂O₂ és az oxidálódása során keletkező oxigén hatása igen bonyolult, azonban a sejtek jelenlétében kapott görbékből

levonva a sejt nélkül mért H_2O_2 jelét megkaptuk a sejtek jelenlétében végbemenő változások különbséggörbéjét (5.46. ábra).

Amikor a LAB-sejteket 0,009 vagy 0,09 mmol/l hidrogén-peroxiddal kezeltük, enyhe csökkenést tapasztaltunk a mért jelben a sejtek immobilizálása után folyamatosan mért alapvonalhoz képest, és ez a tendencia végig megmaradt a mérés során. Irodalmi adatok szerint a LAB-sejtek megfelelő körülmények között termelhetnek hidrogénperoxidot, a H_2O_2 feldúsulása azonban gátlást okoz (Keané, 1973). A LAB-sejtek 0,03 mmol/l hidrogén-peroxidot is termelhetnek, azonban ilyenkor működésbe lépnek a sejtekben lévő peroxidáz enzimek, bontják a reaktív oxigéngyököket, ezért nem okoz toxikus elváltozásokat a sejtekben. A baktériumsejtek tehát megóvják saját magukat az alacsony H_2O_2 -koncentráció esetén (Baráth *et al.* 2004).

A 0,9 mmol/l H₂O₂ áramoltatásakor már kissé eltérő hatást tapasztaltunk a sejteknél, intenzívebben reagáltak a sejtek a stressz hatására, mivel a kezdeti jelcsökkenés után, kb. 10 perces kezelés hatására a jel egy minimumérték után folyamatosan növekedett. A legnagyobb változást a 9.0 mmol/l H₂O₂ okozta, a jel nagysága már a kezelés elejétől növekedett, és az egész kezelés alatt magas maradt. A jelnövekedést a különbség-görbén is tapasztaltuk, aminek oka az lehetett, hogy a L. plantarum 2142-sejtekben a peroxidázok a töményebb hidrogén-peroxidot már nem tudják oxidálni, ezért feltehetően vízmolekulák akkumulálódnak a sejtekben a hatás csökkentésére. A jel határozott tömegnövekedést jelez, amit csak a citoplazmában növekvő mennyiségű vízzel tudunk magyarázni, a sejtek megduzzadnak. Bár a hidrogén-peroxid ebben a koncentrációban már a sejtmembrán sérülését okozhatta, de vizsgálataink szerint ez a kb. 40 perces kitettség még nem okozott irreverzíbilis folyamatokat. Minden kezelés után a sejteket kimostuk a rendszerből, és hagyományos mikrobiológiai módszerekkel vizsgáltuk, hogy maradt-e élő sejt a kezelések után. A kimosott sejteket MRS-táplevesben 24 óráig 37 °C-on inkubálva minden esetben tapasztaltunk szaporodást, bizonyítva, hogy voltak sejtek, amelyek túlélték a különböző koncentrációjú hidrogén-peroxiddal történő kezeléseket.

5.5.1.4. Ecetsav hatása a LAB-sejtekre

Az ecetsav antibakteriális hatású szer, irodalmi adatok szerint a tejsavval szinergikus hatása van, a tejsav csökkenti a pH-t, növelve az ecetsav toxicitását (Adams and Hall 1988). Ezért 10⁸ TKE/ml LAB-sejtet injektáltunk a sejtek rögzítéséhez, majd vizsgáltuk az ecetsav hatását úgy, hogy a szenzort tartalmazó átfolyó küvettába 0,02, 0,1, 0,5, 1 és 5 mol/l ecetsavat tartalmazó 100x hígított JA-oldatot áramoltattunk egy órán keresztül. Az 5.47 ábrán összefoglalt eredmények szerint a relatív tömeg a kezdeti nagyobb lépés után minden esetben növekedést mutatott, a növekvő ecetsav-koncentrációk esetén a görbék laposabbak lettek. Az adott koncentrációjú ecetsav mérésére kapott görbékből a sejt nélkül mért ecetsav jelét levonva, megkaptuk a sejtek jelenlétében végbemenő változások különbséggörbéjét, amiből megállapítható, hogy a 40 perces kezelés nem mutatott jelentős eltérést a 0,1 és az 5 mol/l ecetsav esetében (5.48. ábra). Az 5 mol/l ecetsav hatására sem következett be a sejtek pusztulása, a sejteket kimosva a kezelés után, 24 órás szaporítással MRS-táplevesben minden esetben tapasztaltunk szaporodást, bizonyítva, hogy voltak sejtek, amelyek túlélték a kezelést.

dc 457 12



5.47 ábra LAB-sejtek jele ecetsav jelenlétében (10⁸ TKE/ml, 1 V)



5.48. ábra Ecetsav különbséggörbéje LAB-sejtek jelenlétében (10⁸ TKE/ml, 1 V)

5.5.1.5. Tejsav hatása a LAB-sejtekre

A tejsav a fermentáció fő terméke, tartósító hatású. Savas pH-n a disszociálatlan molekulák átdiffundálnak a sejtmembránon, befolyásolják a szubsztráttranszportot (Smulders *et al.* 1986; Lindgren and Dobrogosz 1990), míg kevésbé savas pH-n a molekulák disszociálnak, és nem jutnak át a sejtfalon (Russel 1992).

Ezért 10⁸ TKE/ml LAB-sejtet injektáltunk a rögzítéshez, majd vizsgáltuk az tejsav hatását úgy, hogy az átfolyó küvettába 0,02, 0,1, 0,5, 2,5 és 5 mol/l tejsavat tartalmazó 100x hígított JA-oldatot áramoltattunk 40 percen keresztül. Az 5.49. ábrán összefoglalt eredmények szerint a relatív tömeg enyhe növekedést mutatott 500 mmol/l tejsav-koncentrációig, a nagyobb koncentrációk esetén a jelek kismértékben csökkentek. A tejsav mérésére kapott görbékből a sejt nélkül mért tejsavjeleket levonva, a különbséggörbék (5.50. ábra) alapján megállapítottuk, hogy míg a 0,5 és a 2,5 mol/l tejsav hatására nem történt eltérés, addig az 5 mol/l koncentrációjú oldattal már jelcsökkenés figyelhető meg. Ugyanakkor az 5 mol/l tejsav hatására sem következett be a sejtek pusztulása, a sejteket kimosva a kezelés után, 24 órás szaporítással MRS-táplevesben minden esetben tapasztaltunk szaporodást, bizonyítva, hogy voltak sejtek, amelyek túlélték a kezelést.

dc_457_12



5.49. ábra LAB-sejtek jele tejsav jelenlétében (10^8 TKE/ml, 1 V)



5.50. ábra Tejsav különbséggörbéje LAB-sejtek jelenlétében (10⁸ TKE/ml, 1 V)

5.5.1.6. Referenciavizsgálatok

Az eredmények jobb megértéséhez és az EC-OWLS technikával mért eredmények összehasonlításához az új eljárást a hagyományos mikro-assay módszerrel vetettük össze, és vizsgáltuk a sejtek szaporodását a kémiai hatások függvényében.

L. plantarum 2142-sejtszuszpenziót (100 µl, 10⁹ TKE/ml) adtunk 9,9 ml 0,09 és 9,0 mmol/l hidrogén-peroxidot, 0,1 és 5 mol/l tejsavat, valamint 0,1 és 5 mol/l ecetsavat tartalmazó JA-oldathoz. Kontrollként JA-oldatban LAB-sejtekkel ellenőriztük a szaporodás kinetikáját. A sejteket tartalmazó csöveket 30 °C-on inkubáltuk és 0, 4, 24 és 28 h inkubálás után mintát vettünk az EC-OWLS mérésekhez. A mintákat 10x hígítottuk és injektáltuk az EC-OWLS műszerbe. Az aktuális sejtszámot a kalibrációs görbe alapján számítottuk ki. Referenciaként mikro-assay-ben is vizsgáltuk a *L. plantarum* 2142-sejtek szaporodását a különböző stresszfaktorok jelenlétében (ld. 4.2.5.4. fejezet). A két módszerrel mért eredményeket hasonlítottuk össze. Az EC-OWLS és a mikro-assay módszerrel mért sejtszám- illetve OD-értékeket az 5.51. és az 5.52. ábrákon foglaltuk össze. A kezeletlen minták esetében EC-OWLS módszerrel vizsgálva úgy találtuk, hogy az inkubációs idő alatt a sejtszám 2 nagyságrenddel nőtt. Ez megfelelt az elvárásoknak, mivel a JA-oldat tápanyagban gazdag közeg a sejtek szaporodásához. A mikro-assay is hasonló sejtszámnövekedést mutatott.

dc_457_12



5.51. ábra Különböző kémiai kezelések hatásának nyomonkövetése EC-OWLS módszerrel A: 100x hígított IA-oldat B: 9 mmol/l H2O2, C:0.09 mmol/l H2O2; D: 5 mol/l teisav

(A: 100x hígított JA-oldat, B: 9 mmol/l H₂O₂, C:0,09 mmol/l H₂O₂; D: 5 mol/l tejsav, E: 0,1 mol/l tejsav; F: 5 mol/l ecetsav, G: 0,1 mol/l ecetsav)





A 9 mmol/l hidrogén-peroxidot tartalmazó oldat gátolta ugyan a sejtek szaporodását, azonban a 24 órás adatok enyhe növekedést mutattak. A 0,09 mmol/l hidrogén-peroxid jelenléte nem gátolta a LAB-sejtek növekedését, a referenciaértékekhez hasonló eredményeket kaptunk mindkét eljárással.

Az 5 mol/l tejsav gátolta a sejtek szaporodását mindkét módszer eredményei szerint. Az EC-OWLS eljárással mért eredmények szerint az első órákban csökkent a sejtek száma, majd a vizsgálat második szakaszában már lassú sejtnövekedés tapasztalható. A referenciamódszerrel ez a tendencia nem jelent meg, de az inkubáció végén a sejtnövekedés ugyancsak mérhető. Ennek egy feltételezhető oka, hogy a sejtek egy része elpusztult, és ezt okozta az EC-OWLS jelek csökkenését.

Ecetsav (5 M) hatására a sejtkoncentráció minden esetben elmaradt a referenciaértékektől, de ez esetben is a kiindulási értéknél nagyobb koncentrációt

mértünk. A hígabb ecetsavoldat jelenlétében mindkét módszerrel a referenciaértékekhez hasonló növekedést tapasztaltunk.

A fenti kísérlet igazolja, hogy a vizsgált stresszfaktorok közül a legnagyobb hatása a 9 mmol/l hidrogén-peroxidnak és az 5 mol/l tejsavnak van a *L. plantarum* 2142-sejtek szaporodásra, ami egybevág az EC-OWLS mérés eredményeivel. Ugyanakkor a referenciavizsgálatokhoz 24 órás inkubáció szükséges, az EC-OWLS módszerrel lényegesen rövidebb idő alatt kaptuk meg az eredményeket.

Összefoglalva az eredményeket, EC-OWLS technika alkalmazásával polarizáló potenciál (1 V) hatására natív L. plantarum 2142-sejtek rögzítését sikerült megvalósítani a szenzorcellában. A vizsgálatok bizonyították, hogy az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek megkülönböztethetőek, ha a minták azonos koncentrációjú sejtet tartalmaznak. Az élő LAB-sejtek elektrokémiai cellában való rögzítése lehetővé tette a kémiai stresszt okozó vegyületek hatásának tanulmányozását. A különböző kémiai kezelések LAB-sejtek szaporodására kifejtett hatására **EC-OWLS** módszerrel kapott eredményeket referenciamódszerként mikro-assay eljárással hasonlítottuk össze. Az EC-OWLS mérések eredményei igazolták, hogy a L. plantarum 2142-sejtek szaporodásra a vizsgált stresszfaktorok közül legnagyobb hatása a 9 mmol/l hidrogén-peroxidnak és az 5 mol/l tejsavnak van.

5.5.2. Escherichia coli sejtek mennyiségének meghatározása immunszenzorral

E. coli B200 baktérium szelektív meghatározására immunszenzort fejlesztettünk ki és vizsgáltuk az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek mérésekor kapott jelek nagyságát OWLS detektálással. Az eredményeket az Adányi *és mtsai* (2006b), Szendrő *és mtsai* (2008), valamint a Szendrő és mtsai (2012) tudományos cikkekben ismertettük.

rögzítésével aminoszilanizált Anti-*E.coli* antitest az STO-szenzoron immunszenzort fejlesztettünk ki. Az előkísérletek alapján az aminoszilanizált szenzor felszínére 100x hígított antitestet rögzítettük glutáraldehiddel (2,5%). Az antitest és a sejtek méréséhez 16,6 mmol/l (pH 7,4) foszfátpuffert alkalmaztunk. A kalibrációs görbe készítéséhez 10^3 - 10^9 TKE/ml élő sejtet tartalmazó oldatot injektáltunk. A 10^3 - 10^5 TKE/ml töménységű minták esetében csak kis jeleket mértünk (4-8 egység). A lineáris méréstartomány 10⁵-10⁹ TKE/ml értékűnek adódott, a 10⁹ TKE/ml töménységű E. coli minta esetében a jel nagysága 21,3±3,6 egység volt. Korábban az EC-OWLS mérésekkel különbséget tudtunk tenni az élő és a hőkezeléssel elpusztított LAB-sejtek között (ld. 5.5.1.2. fejezet), most vizsgáltuk, hogy az immunszenzorral találunk-e hasonló különbséget. A hőkezelést a megfelelően hígított mintákkal végeztük, és egymás után mértük az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejteket. Az immunszenzorral a hőkezeléssel elpusztított sejtekre szignifikánsan nagyobb jelet kaptunk, mint az élő sejteket tartalmazó mintákra. A dinamikus méréstartomány szélesebb, 10³-10⁹ TKE/ml között volt, a 10^9 TKE/ml minta esetében a jel nagysága $33,8\pm4,5$ egység. Az 5.53. ábra a 10⁸ és 10⁹ TKE/ml töménységű élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek szenzorválaszát mutatia.

Az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtekből azonos hígítással készítettünk oldatot (10^8 TKE/ml), majd a két oldatot különböző arányban elegyítettük (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100% élő sejtek), és a mintákat az immunszenzorral mértük. Az eredmények szerint az élő sejtek csak kis jeleket adtak ($8,0\pm0,6$ egység), míg az azonos töménységű, de növekvő arányban hőkezeléssel elpusztított sejteket tartalmazó minták jele arányosan növekedett (5.54. ábra).

dc 457 12



5.53. ábra Élő és hőkezeléssel elpusztított E. coli B200-sejtek immunszenzoros jele



5.54. ábra *E. coli* immunszenzoros jele az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek arányának függvényében (10⁸ TKE/ml *E. coli* B200)

Összefoglalva immunszenzort dolgoztunk ki *E. coli*-sejtek koncentrációjának meghatározására. Különbséget találtunk az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek szenzoros jele között, a hőkezeléssel elpusztított sejtek szignifikánsan nagyobb jelet adtak azonos koncentrációban, mint az élő sejtek. Az élő sejtekkel a dinamikus méréstartomány 10^5 - 10^9 TKE/ml értékűnek adódott, a 10^9 TKE/ml töménységű minta esetében a jel nagysága $21,3\pm3,6$ egység. A hőkezeléssel elpusztított sejtek esetében a dinamikus méréstartományt 10^3 - 10^9 TKE/ml között találtuk, a 10^9 TKE/ml minta esetében a jel nagysága $33,8\pm4,5$ egység.

5.5.3. Bioszilika alapú immobilizálás valós idejű bioszenzorok fejlesztésére

Munkánk során szilícium-oxid-tartalmú szenzor felületén vizsgáltuk szilikatein enzim és tetra-etoxi-szilán (TEOS) jelenlétében a bioszilikaréteg kialakulását, majd a szilikateinnnel módosított baktériumsejtek kíméletes körülmények között történő rögzítését. Az új eljárással rögzített *E. coli* BL21AI-sejteket mikrobiális szenzorként alkalmazva tanulmányoztuk a különböző szermaradvány és antibiotikum kimutatásának lehetőségét.

Korábbi eredmények igazolták, hogy az EC-OWLS technika alkalmas az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek megkülönböztetésére, valamint a sejteket ITO-szenzor felületén rögzítve különböző stresszfaktorok mikrobákra gyakorolt hatásának tanulmányozására. Ennek a munkának mintegy folytatásaként új típusú mikrobiális bioszenzorokat fejlesztettünk, a módosított *E. coli* BL21AI sejteket szilikatein enzimmel katalizált bioszilika segítségével rögzítettünk. A rögzített sejtekkel felszíni vizekben és élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok koncentrációját vizsgáltuk a gátló hatás alapján. Az eredményeket az Adányi *és mtsai* (2013a, 2013b) tudományos közleményekben ismertettük.

5.5.3.1. Bioszilika képződésének tanulmányozása

A bioszilika alapú sejtrögzítés fejlesztésének első lépéseként a szilikatein enzim katalizálta reakciót tanulmányoztuk, igazolni kívántuk a bioszilika kialakulását az STO-szenzor felületén.

5.5.3.1.1. Az STO-szenzor felületmódosításának hatása

Feltételezésünk szerint a szilikatein enzim jelenlétében és megfelelő körülmények között a szilíciumot tartalmazó szenzor felületéhez kötődve polimerizálódik a TEOS monomer. Ezért a szenzor felszínének megfelelő előkészítése a mérések alapját képezi, vizsgáltuk az előkezelések szükségességét, illetve igazolni kívántuk, hogy nem csupán adszorpció játszódik le a szenzor felületén. Áramló rendszerben injektáltuk a szilikatein enzimet (SC, 4,8 μg/ml), majd háromszor egymás után a TEOS monomert (0,9 mmol/l).



5.55. ábra A szilikatein enzim és a poliszilika jele a felületmódosítás hatására a szilanizált STO-szenzoron EC-OWLS rendszerben

(SC 4,8 µg/ml; TEOS 0,9 mmol/l)

A rögzítési kísérleteket tisztított (de nem hidratált), hidratált, valamint APTS reagenssel szilanizált STO-szenzorokon végeztük el (5.55. ábra).

Az eredeti tisztított szenzor felületén az enzim ugyan adszorbeálódott, de bioszilika-réteg kialakulására, rögzítésére nem megfelelőek a körülmények, a három injektálás után a jelek összege mindössze 13 egységnek adódott. A szilanizált felület kevésbé alkalmas a bioszilika-réteg adszorpciójához, mindössze 10 egységet mértünk. A legjobb eredményt a hidratált szenzorok esetében kaptuk, közel 30 egységet mértünk a TEOS három injektálását követően. Ezzel a kísérlettel bizonyítottuk, hogy az STOszenzor felületéhez kapcsolódnak a képződött poliszilika-molekulák. Az eredmények

alapján megállapítottuk, hogy a hidratálás elengedhetetlen lépés a megfelelő bioszilikaréteg kialakításához, így a továbbiakban hidratált felületű szenzorokat alkalmaztunk.

5.5.3.1.2. Bioszilika-réteg kialakítása

Az enzimreakció optimális hőmérsékletének meghatározására vizsgáltuk a hidratált szenzor felületén létrejött bioszilika-réteg tömegét. A termosztát hőmérsékletét változtatva 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C és 30 °C-on végeztük el a méréseket. Alacsony, 5 °C-os hőmérsékleten az enzim adszorpciója és az enzimreakció is lassan ment végbe, az adszorbeálódott enzim, és a bioszilika jele is mindössze 10 egység körüli értéket mutatott. A hőmérséklet növelésével, 15 °C-on kaptuk a legnagyobb jeleket a bioszilika képződésére (60 egység), míg magasabb hőmérsékleten ismét kisebb jeleket kaptunk. Ezért a további mérésekhez 15 °C-ot alkalmaztunk.

A mérések során az áramlási sebesség határozza meg, hogy a minta mennyi ideig tartózkodik a szenzorcellában, ezért vizsgáltuk az áramlási sebesség hatását (0,035; 0,07; 0,12 és 0,16 ml/perc). A legnagyobb jelet 0,07 ml/perc áramlási sebességnél mértük (5.56. ábra). Ez az áramlási sebesség alkalmas a megfelelő bioszilika-réteg kialakulásához, így a további mérésekhez ezt az áramlási sebességet választottuk.



5.56. ábra Az áramlási sebesség hatása a poliszilika jelére a szilanizált STO-szenzoron EC-OWLS rendszerben (SC 4,8 μg/ml; TEOS 0,9 mmol/l)

5.5.3.1.3. A szenzor felületének regenerálása, a kialakított bioszilika-réteg stabilitása

A folyamatos mérések során az egyik alapkérdés, hogy a szenzoron kialakított bioszilika-réteg mennyire stabil, a szokásosan alkalmazott regenerálási eljárással lemosódik-e. Hogy ezekre a kérdésekre választ kapjunk, 4,8 µg/ml koncentrációjú szilikatein enzimet adszorbeáltunk a szenzoron (5.57. ábra A), majd 50 mmol/l HCl-oldatot áramoltatva lemostuk enzimet koncentrációjú az а hidratált szenzorfelületről. Ezt követően újra enzimet injektáltunk (B), amelynek a jele közel azonos volt az előzővel (50-60 egység), igazolva, hogy az elsőként injektált enzimet a várakozásunknak megfelelően eltávolítottuk a szenzor felületéről, s a második enzimminta is azonos jelet adott. A bioszilika-réteg kialakításához 0,9 mmol/l koncentrációjú TEOS-oldatot injektáltunk háromszor egymás után az enzim adszorbeálása után, majd ezt követően ismét sósavas lemosást alkalmaztunk. Az alapvonal alapján látható volt, hogy a sósavas lemosást követően a bioszilika-réteget nem távolítottuk el. Újbóli enzim injektálása (C) is bizonyítja, hogy a kialakult bioszilika nem távolítható el savas lemosással a szenzor felületéről, mindössze 20-25 egységnyi jelet kaptunk az enzim ismételt injektálására.



5.58. ábra Szilikatein képződése a szenzor felületén folyamatosan áramló rendszerben

Az 5.58. ábrán egy mérés diagramja látható. a mérést 15 °C-on, 0,07 ml/perc áramlási sebesség mellett TRIS pufferben (pH=7,4) végeztük. A szilikatein enzimet 2,4 µg/ml koncentrációban, a TEOS-t 0,9 mmol/l koncentrációban alkalmaztuk. A hidratált szenzor felületére első lépésben enzimet adszorbeáltunk, majd erre háromszor TEOS-t injektálva létrehoztuk a bioszilika-réteget. A TEOS-injektálások során 10-15 tömegegységnyi bioszilika keletkezett. A harmadik TEOS-injektálásnál látható, hogy a szenzor felülete telítődött, az injektált oldat egy része kimosódott a rendszerből, a szenzor felületén, vagy az enzimmolekulák közelében már nem maradt további alkalmas hely a bioszilika kötődéséhez.

5.5.3.1.4. A szilikatein koncentrációjának hatása a bioszilika kialakulására

A hidratált felületű STO szenzorra különböző koncentrációjú szilikatein enzimet (24; 4,8; 2,4 µg/ml) injektáltunk (5.59. ábra), és vizsgáltuk az enzim adszorpcióját,

valamint az enzimkoncentráció hatását a bioszilika-réteg kialakulására. Az enzim koncentrációja csak kis mértékben befolyásolta a rögzített enzim jelét, nem nőtt a jel szignifikánsan a töményebb oldat hatására, a szenzor telítetté vált már kis koncentráció alkalmazásánál is. Ugyanakkor, minél nagyobb koncentrációjú enzimoldatot injektáltunk, annál kevesebb bioszilika képződött a szenzor felületén, ha egymás után kétszer 0,9 mmol/l koncentrációjú TEOS reagenst injektáltunk. Az enzimet 24 µg/ml koncentrációban injektálva feltehetően térbeli gátlás lépett fel, mindössze 15 tömegegységnyi bioszilika keletkezett a szenzor felületén. A 2,4 µg/ml koncentrációjú enzimoldatot injektálva értük el a bioszilika jelének maximumát, 72 egységet, így a további mérésekhez ezt a koncentrációt alkalmaztuk.



5.59. ábra A szilikatein koncentrációjának hatása

5.5.3.1.5. A TEOS koncentrációjának hatása a bioszilika kialakulására a szenzor felszínén

A szenzorra 2,4 µg/ml hígítású enzimoldatot adszorbeáltatva vizsgáltuk a TEOS koncentrációjának hatását a szenzor jelére. A TEOS koncentrációját 0,09 és 4,5 mmol/l között növelve 15 °C-on vizsgáltuk a bioszilika képződését az STO-szenzorfelületén. Az 5.60. ábra alapján megállapítható, hogy a 4,5 mmol/l koncentrációjú TEOS már túl tömény, itt már enzimgátlás lépett fel. Ennek oka lehet egyrészt a TEOS monomer töménysége, azonban felmerülhet az enzimreakció során képződő etanol gátló hatása is az enzim aktivitására. A legnagyobb jeleket 0,9 mmol/l és 0,45 mmol/l TEOS injektálásával mértük, első esetben 32,4 és 26,9 egységet, a második esetben pedig 26,1 és 29,7 egységet.



5.60. ábra TEOS koncentrációjának hatása a bioszilika kialakulására

5.5.3.2. Szilikatein enzim látszólagos Michaelis-konstansának meghatározása

Az adszorbeált szilikatein-réteg enzim aktivitásának vizsgálatát a korábban meghatározott optimális körülmények beállításával végeztük. A TEOS spontán polimerizációját a szenzoron közel azonos körülmények között kívántuk bemutatni, ezért az enzim helyett azonos koncentrációjú BSA-oldatot injektáltunk a szenzorra. A TEOS-oldat tartózkodási ideje az átfolyó cellában az injektált térfogat (200 µl) és az áramlási sebesség (0,07 ml/perc) ismeretében 2,86 percnek adódott egy injektálásra. Az egymás után injektált TEOS-minták jelét a növekvő tartózkodási időhöz rendelve összegeztük, így tudtuk a látszólagos reakciósebességet meghatározni. A méréseknél a TEOS-standardokat 0,045 mmol/l és 1,8 mmol/l közötti koncentrációban alkalmaztuk. A szilikatein enzim katalitikus hatására jelentősen nőtt a bioszilika képződésének sebessége a BSA-val mért értékekhez képest (5.61. ábra).



5.61. ábra A TEOS koncentrációjának hatása a keletkező bioszilika mennyiségére

A TEOS spontán polimerizálódik, adszorbeálódik a szenzor felszínén, azonban a keletkezett bioszilika jele széles határok között változott (2,8-9,4 egység) és független az injektált TEOS koncentrációjától. A reakció sebességet a tartózkodási idő függvényében a bioszilika képződésekor mért tömeg/felület egység értékeiből kiszámítva, és a TEOS koncentráció függvényében ábrázolva, meghatározható a

Michaelis-konstans (K_M) értéke. Mivel a maximális reakciósebesség meghatározása általában nehézségekbe ütközik, ezért a K_M értékek számítása bizonytalan. A Lineweaver–Burk-egyenlet alkalmazásával grafikusan határoztuk meg a K_M értékét, a kapott adatokat az 5.13. táblázatban foglaltuk össze. Ezek az értékek a szilikatein enzim látszólagos Michaelis-konstansát adják meg, az STO-szenzoron való immobilizálásról / polimerizációról az adott körülmények között adnak információt, ezért alkalmaztuk a mol/cm² mértékegységet. Az eredmények alapján beigazolódott, hogy a TEOS spontán polimerizációra hajlamos (5,09x10⁻¹² mol/cm², 15 °C).

A hőmérséklet jelentősen befolyásolta a polimerizációt és az immobilizációt. Különösen érdekes, hogy 25 °C-on a látszólagos K_M (1,02x10⁻¹¹ mol/cm²) kissé csökkent a 15 °C-on mért értékhez (1,62x10⁻¹¹ mol/cm²) képest. Ezt a jelenséget csak akkor tudnánk egyértelműen megmagyarázni, ha tudnánk a ténylegesen keletkezett és az immobilizált bioszilika mennyiségét, illetve annak arányát. Feltételezzük, hogy a K_M értéke ugyan nő a hőmérséklet növelésével, azonban az immobilizált bioszilika aránya csökkent, ami a látszólagos K_M értékének csökkenését jelenti. Az eredmények alapján a további kísérleteket minden esetben 15 °C-on végeztük.

	Hőmérséklet (°C)	Látszólagos K _M érték (mol/cm ²)
BSA	15	5,09E-12
Szilikatein enzim	5	8,20E-12
Szilikatein enzim	15	1,62E-11
Szilikatein enzim	25	1,02E-11

5.13. táblázat Szilikatein enzim látszólagos K_M értéke

5.5.3.3. Módosított E. coli-sejtek rögzítése, bioszenzor fejlesztése

Miután igazoltuk, hogy a szilikatein enzim jelenlétében a TEOS monomer polimerizálódik az STO-szenzor felszínén, megvizsgáltuk, hogy a módosított *E. coli* BL21AI-sejteket miként tudjuk rögzíteni a bioszilika segítségével a szenzor felületén. Immunszenzorral kimutattuk, hogy a sejtek felszínén megjelenik a szilikatein enzim, tehát termelődhet bioszilika.

5.6.3.3.1. Szilikatein kimutatása a módosított sejtekben OWLS alapú immunszenzorral

A mikrobiális szenzor fejlesztése során a módosított E. coli BL21AI-sejteket kívántuk a szenzor felületén bioszilika segítségével immobilizálni, ezért vizsgáltuk, hogy a szilikatein enzim jelenléte kimutatható-e a rekombináns E. coli-sejtek felületén. Ennek a vizsgálatnak az elvégzésére OWLS alapú immunszenzort fejlesztettünk ki a módosított E. coli-sejtekben a szilikatein kimutatására. Az immunmérésekhez az antiszilikatein antitestet a már korábban ismertetett glutáraldehides eljárással rögzítettük az STO-szenzor szükséges antitestkoncentráció meghatározásához felszínén. А antitesttitrálást végeztünk. Szilanizált chip felületére 2,4 µg/ml koncentrációjú szilikatein enzimet rögzítettünk glutáraldehiddel, majd erre a felületre 10000x - 500x hígítású szilikatein antitestet injektáltunk. Az immunreakció során az antitest kötődött a szenzoron rögzített szilikateinmolekulákhoz, és a koncentráció függvényében növekvő jeleket mértünk. A 2000x hígítás esetében 10-12 tömegegységet mértük, ez bizonyult a megfelelő antitestkoncentrációnak a további mérésekhez.

Az előző mérések alapján alkalmasnak talált 2000x hígítású anti-szilikatein antitestoldatot alkalmazva rögzítettük az antitesteket glutáraldehiddel (2,5%) a

szilanizált *chip* felületén. Erre az érzékenyített felületre injektáltunk 10^7 - 10^9 TKE/ml koncentrációjú rekombináns *E. coli*, illetve referenciaként *E. coli* B 200-sejteket. Az 5.62. ábra mutatja a két *E. coli*-törzs jele közötti különbséget, illetve bizonyítja a szilikatein enzim kifejeződését (expresszióját) a sejt felszínén. Míg az *E. coli* B200-törzs esetében mindössze 2-5 tömegegységnyi jelet kaptunk, addig a rekombináns törzs esetében 20-35 tömegegységnyi jelet mértünk az injektált mikroba koncentrációjától függően. Az eredmények alapján a sejtfal külsején megjelenő szilikatein enzimmel lehetővé válik a bioszilikával rögzített mikrobiális szenzor fejlesztése.



5.62. ábra A módosított *E. coli* BL21AI- és az *E. coli* B200-referenciasejtek immunválasza (2000x hígított anti-szilikatein antitest)

5.5.3.3.2. Az előkezelés hatása a sejtek rögzítésére

Miután bizonyítottuk, hogy a szilikatein enzim megjelenik a sejtek felszínén, vizsgáltuk, hogy a módosított sejtek milyen előkészítés után rögzíthetőek megfelelően. A módosított *E. coli*-sejtek (10^8 TKE/ml) egy részét elegyítettük 2,4 µg/ml koncentrációjú enzimoldattal, a másik részéhez 0,48 mmol/l TEOS-oldatot, míg a harmadik részéhez enzimet és TEOS-oldatokat is adtunk. Elegyítés után azonnal, 1 és 3 óra elteltével injektáltuk az oldatokat. A TEOS reagenssel kevert sejtek esetében a kialakuló bioszilika-rétegen a baktériumsejtek lényegesen nagyobb jelet adtak, mint a TEOS nélkül kezelt sejtek esetében, a jelek 1 illetve 3 óra elteltével már csak kis mértékben növekedtek. Azt is megállapítottuk, hogy az enzim adagolása nem növeli a jeleket, ezért azt nem is alkalmaztuk a továbbiakban.

Vizsgáltuk a sejtkoncentráció függvényében a mért jelek nagyságát, azaz a szenzor felületén való kötődést. A különböző koncentrációjú $(10^{6}-10^{9} \text{ TKE/ml})$ módosított *E. coli*-tenyészeteket 0,48 mmol/l TEOS-oldattal elegyítettük, majd 3 óra inkubálás után injektálva vizsgáltuk a sejtek jelét a hidratált szenzor felületén (5.63. ábra). A $10^{7}-10^{8} \text{ TKE/ml}$ koncentrációjú oldat injektálásával a jelek exponenciálisan növekedtek, majd 10^{8} TKE/ml sejtkoncentráció felett a jelek az adott körülmények között már nem nőttek tovább.

Az előző eredmények alapján feltételeztük, hogy ha a módosított *E. coli*-sejteket már a szaporítás során TEOS reagenssel előkezeljük (ld. 4.3.10. fejezet), stabilabb és nagyobb jelet kapunk a rögzítés során, és egyszerűbb lesz a rögzítési eljárás is. Az előkezelés után a jeleket még tovább növelhettük, ha a vivő puffer áramát kétszer 10 percre megállítottuk injektálás után, növelve a sejtek rögzítéséhez rendelkezésre álló reakcióidőt (5.64. ábra).





5.63. ábra A módosított *E. coli* BL21AI-sejtek jele a koncentráció függvényében $(\chi^2/szabadsági fok: 0,43; R^2: 0,99)$



5.64. ábra *E. coli* BL21AI-sejtek szenzorválasza az előkezeléstől függően $(2x10^9 \text{ TKE/ml})$

A TEOS reagenssel inkubált sejtekkel (SC+) mért jelekhez képest a mérés előtt TEOS reagenssel kezelt (SC- +TEOS) sejtek 10%-kal, a TEOS nélkül (SC-) inkubált sejtek pedig 25%-kal kisebb jelet adtak, és instabilak lettek, folyamatos kimosódás tapasztalható. Eredményeink szerint tehát a SC+ előkezelt módosított sejteket lehetett stabilan, reprodukálhatóan rögzíteni a szenzor felületén.

5.5.3.4. A módosított E. coli alkalmazásával kialakított gátlási szenzorok

Referenciaméréseket végeztünk hagyományos módszerrel (ld. 4.2.5.5. fejezet) a módosított sejtek és a *E. coli* B200-törzs biológiai tulajdonságának összehasonlítására. Vizsgáltuk a környezeti szennyező anyagoknak a sejtek szaporodására, illetve annak gátlására gyakorolt hatását a két sejtkultúra oldatában. A gátlási kísérletek során különböző vegyületek hatását vizsgáltuk, a hidrogén-peroxid és a klóramfenikol gátló hatását feltételeztük, a penicillin G hatása kérdéses volt, míg az igen toxikus karbofurán feltehetően nem hat a kolinészterázaktivitással nem rendelkező sejtekre. A referenciamérés eredménye alapján a hidrogén-peroxid (0,78-400 mg/l) hatása csak 400 mg/l koncentráció fölött mutatható ki mindkét törzs esetében. A klóramfenikol (0,78-100 mg/l) már 1,56 illetve 3,125 mg/l koncentrációnál kifejtette a gátló hatását, míg a
penicillin G (0,78-100 mg/l) gátlását csak a referenciatörzsnél tudtuk kimutatni. A karbofurán (0,001-10 mg/l) az alkalmazott koncentrációtartományban nem mutatott gátlást. A gátlást mutató kémcsövekből ismételten átoltottunk BHI táplevesbe 0,1 ml térfogatot és 37 °C-on 24 h inkubációval vizsgáltuk, hogy a sejtek életben maradtak-e. Minden esetben a gátló hatás megszűntével szaporodtak a sejtek, a vizsgált anyagok nem okozták a sejtek elpusztulását.

5.5.3.4.1. A hidrogén-peroxid hatása

Az 5.5.3.3.2. fejezetben ismertetett eljárással rögzített sejtekkel vizsgáltuk a különböző gátlószerek hatását úgy, hogy az alapvonal stabilizálódása után az adott gátló anyagot a pufferbe adagolva hosszabb ideig áramoltattuk azt a szenzoron át.

A módosított sejtek különböző töménységű hidrogén-peroxiddal szembeni toleranciáját tanulmányoztuk. A különböző előkezelések után rögzített sejtekkel $(2x10^9$ TKE/ml) az alapvonal stabilizálódása után vizsgáltuk a H₂O₂ (3 g/l) hatását. Az összehasonlítás kedvéért felvettük a 3 g/l koncentrációjú H₂O₂ jelét sejteket nem tartalmazó szenzorral is, hogy igazoljuk a sejtekre gyakorolt hatását. Különösen szembetűnő, hogy a SC+-sejteket tartalmazó szenzoron a H₂O₂ hatására a korábban stabilizálódott alapvonalhoz képest negatív jelet kaptunk. Ez azzal magyarázható, hogy feltehetően a H₂O₂ a sejtek falát támadta (5.65. ábra).



5.65. ábra Hidrogén-peroxid (3 g/l) hatása a különböző módon kezelt *E. coli* BL21AIsejtek szenzorjelére (2x10⁹ TKE/ml)

A hidrogén-peroxidot különböző töménységben alkalmazva a gátló hatás növekedett a koncentráció függvényében (5.66. ábra). A 30 mg/l H_2O_2 hatására még kismértékben növekedett a jel az idő függvényében, a 300 mg/l koncentrációjú H_2O_2 hatására már vízszintes jelet kaptunk, ami a referenciamérés alapvonalának kismértékű növekedéséhez képest már csökkenésnek számít. A 3 g/l töménységű H_2O_2 injektálása után 40 perccel 15, 20 és 28 egységgel kisebb jeleket kaptunk, egyértelműen jelezve a szer gátló hatását. A különböző szenzorokkal mért párhuzamos mérések eredményei jól megfeleltek egymásnak.



5.66. ábra Különböző töménységű hidrogén-peroxiddal kezelt módosított *E. coli* BL21AI-sejtek jele (SC+, 2x10⁹ TKE/ml)

5.5.3.4.2. Klóramfenikol hatása

Hasonló módon vizsgáltuk a klóramfenikol (CAP) hatását a rögzített módosított sejtekre (5.67. ábra). A 2 mg/l CAP referencia jeléhez (92 egység) viszonyítva szignifikáns eltérés tapasztalható, SC- +TEOS-sejtekre a jel 53 egység, míg SC+-sejteket rögzítve a jel 31 egységnek adódott 50 perc elteltével.



5.67. ábra Klóramfenikol (2 mg/l) hatása a különböző módon kezelt *E. coli* BL21AIsejtek szenzorjelére (10⁹ TKE/ml)

Különböző koncentrációjú CAP-oldatot (0,1, 1, 2 mg/ml) áramoltatva a rögzített *E. coli* BL21AI-sejteket tartalmazó mérőcellán keresztül (10⁹ TKE/ml), a görbék jelentősen különböztek egymástól, jelezve a sejtekre gyakorolt gátló hatást a CAP koncentrációjának függvényében (5.68. ábra).



5.68. ábra Különböző töménységű klóramfenikollal kezelt *E. coli* BL21AI (SC+) -sejtek jele (10⁹ TKE/ml)



5.69. ábra *E. coli* BL21AI-sejtek szenzorjele klóramfenikol egymás után többszöri injektálásával (2 mg/l CAP)

Amint azt a referenciamérésekkel igazoltuk, voltak sejtek, amelyek túlélték a kezelést, a sejtek életben maradtak, nem tapasztaltunk pusztulást, ezért a szenzorokon rögzített sejtekre egymás után többször injektáltunk mintát. Az 5.69. ábra a 2 mg/l CAP-oldat egymás utáni injektálására mért eredményeket mutatja be. A CAP-oldatot 30 percig áramoltattuk, majd 30 perc pufferes mosás után ismét 30 percig áramoltattuk ugyanazt a CAP-oldatot. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szenzoron több mérés is elvégezhető egymás után, az eredmények jól megfeleltek egymásnak, a jelek azonos nagyságúak és alakúak voltak, jelezve az őket ért ismételt gátló hatást. A CAP antibiotikum egyaránt gátolja a Gram+ és a Gram- baktériumok fehérjeszintézisét (Abdel-Sayed, 1987). Feltételezhetően a CAP intracellulárisan koncentrálódik a sejtben, a szerző a környezetben találhatónál lényegesen nagyobb koncentrációt mért *E. coli-* és *P. aeruginosa*-sejtekben egyaránt. Ez a jelenség lehet az általunk mért jelek növekedésének az oka.

5.5.3.4.3. A penicillin G hatása

A penicillin G β-laktám antibiotikum, rendszerint a Gram+ baktériumok ellen alkalmazzák, a sejtfalban gátolja a peptidoglükán-keresztkötések létrejöttét. Gram-

baktériumok nem vesztik el a sejtfalat, a sejtek alakja azonban változik, "gömbölyűbb" lesz. Feltételezés szerint ezt az alakváltozást követhetjük nyomon a szenzorral.

A SC- sejtekhez képest a SC-+TEOS-kezelés után csekély eltérést tapasztaltunk, míg a SC+ sejtekkel harmadára csökkentek a jelek (5.70. ábra). Különböző koncentrációjú penicillin G antibiotikumot (0,1, 1, 10 mg/l) alkalmazva a jelek jól elkülöníthetőek a koncentráció függvényében (5.71. ábra). A penicillin G növekvő koncentrációjának hatására nőnek a jelek, 50 perc után 0,1 mg/l hatására 11 egység, 1 mg/l hatására 22 egység, míg 10 mg/l penicillin G hatására 63 egység jelet kaptunk. A jel növekedése feltételezhetően a sejtek alakjának változására utalhat.



5.70. ábra Penicillin G (1 mg/l) hatása a különböző módon kezelt *E. coli* BL21AI-sejtek szenzorjelére (2x10⁹ TKE/ml)



5.71. ábra Különböző töménységű penicillin G antibiotikummal kezelt *E. coli* BL21AI (SC+) -sejtek jele (2x10⁹ TKE/ml)

5.5.3.4.4. A karbofurán hatása

A karbofurán (CF) egyike a legtoxikusabb karbamát típusú növényvédő szereknek, az acetil-kolinészteráz enzimek működését gátolja. A módosított *E. coli*-sejteket különböző koncentrációjú karbofuránnal (0,01, 0,1, 1, 10 mg/l CF) kezelve az 1 mg/l koncentrációjúnál töményebb oldat hatására csekély jelnövekedést tapasztaltunk (5.72. ábra). Ez a hatás annak ellenére mérhető, hogy az *E. coli*-sejteknek irodalmi adatok szerint nincs kolinészterázaktivitása. Ugyanakkor a detektálás alsó határa 1 mg/l

karbofurán, nem elégséges a felszíni vizeket esetlegesen szennyező karbofurán kimutatására.



5.72. ábra Különböző koncentrációjú karbofuránnal kezelt *E. coli* BL21AI (SC+) -sejtek jele (10⁹ TKE/ml)

Összefoglalásként megállapítható, hogy valós időben vizsgáltuk a bioszilika képződését szilikatein enzim és TEOS monomer jelenlétében az OWLS szenzor szilícium-oxid – titán oxid (STO) felületén. Meghatároztuk a szilikatein enzim látszólagos Michaelis-konstansát az STO-szenzoron való immobilizálásra / polimerizációra vonatkozóan. Az eredmények alapján beigazolódott, hogy a TEOS spontán polimerizációra hajlamos (5,09x10⁻¹² mol/cm², 15 °C). A hőmérséklet jelentősen befolyásolta a polimerizációt és az immobilizációt, különösen érdekesnek találtuk, hogy 25 °C-on a látszólagos K_M (1,02x10⁻¹¹ mol/cm²) kissé csökkent a 15 °C-on mért értékhez (1,62x10⁻¹¹ mol/cm²) képest. Az eredmények alapján a további kísérleteket minden esetben 15 °C-on végeztük.

Anti-szilikatein antitestet rögzítve immunszenzorral igazoltuk, hogy a szilikatein enzim jelenléte kimutatható a rekombináns *E. coli*-sejtek felületén.

TEOS reagenssel előkezelt *E. coli* BL21AI-sejteket alkalmazva vizsgáltuk a sejtkoncentráció függvényében a mért jelek nagyságát, azaz a szenzor felületén való kötődést. A 10^7 - 10^8 TKE/ml koncentrációjú oldat injektálásával a jelek exponenciálisan növekedtek, majd 10^8 TKE/ml sejtkoncentráció felett a jelek az adott körülmények között már nem nőttek tovább.

A módosított *E. coli* BL21AI alkalmazásával új típusú gátlási szenzorokat fejlesztettünk ki, a szenzorok alkalmazhatóságát szennyezőanyagok, szermaradványok kimutatásával igazoltuk.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az értekezésben összefoglalt eredmények, amelyek sokrétű hazai és nemzetközi együttműködések keretében jöttek létre, bizonyítják, hogy az OWLS technika igen sokoldalúan alkalmazható mind immunszenzorok, mind mikrobiális szenzorok fejlesztésére. A folyamatosan áramló mérő rendszer kialakítását követően az STO felületű szenzorok módosítására eljárásokat dolgoztunk ki, amelyek lehetővé tették az immunszenzorok kialakítását, az adott célvegyület meghatározásához szükséges biomolekulák rögzítését. Ezen szenzorokkal elsősorban kismolekulájú szennyezőanyagok (növényvédő szerek, mikotoxinok, biogén aminok) kimutatására, valamint a biomarkernak tekinthető vitellogenin fehérje meghatározására alkalmas eljárásokat dolgoztunk ki. Kísérleteink során ugyan minden esetben a szenzorfejlesztés volt a fő célunk, azonban minden új célvegyület meghatározására kialakított eljárás kidolgozása egyedi problémákat vetett fel. Megállapítható, hogy szelektivitás eredményeink megfelelnek versengő ELISA tekintetében а módszerek szelektivitásának, a kimutatási határ azonban több nagyságrenddel kisebb, mint a hasonló biológiai, biokémiai rendszert alkalmazó eljárásé, egyszerű minta-előkészítési eljárásokat alkalmazva gyors mérési / monitorozási lehetőség biztosítható.

Az elektrokémiai (EC)-OWLS méréstechnika lehetőségeit kihasználva mikrobiális szenzorokat fejlesztettünk probiotikus sejteket rögzítve az ITO szenzorok felületén és kémiai stresszfaktorok hatását vizsgáltuk.

Bioszilika képződésének segítségével *E. coli* BL21AI-sejtek újszerű rögzítésével fejlesztettünk ki inhibíciós szenzort szennyező anyagok sejtekre gyakorolt gátló hatásának vizsgálatára.

Az új mérési módszerek felhasználhatóságát lehetőség szerint valós minták vizsgálatával igazoltuk, és ezen eredményeket referencia eljárásokkal nyert adatokkal hasonlítottuk össze.

6.1. Immunszenzorok fejlesztése és analitikai alkalmazása

- 6.1.1. A szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében folyamatosan áramló injektálásos rendszert állítottunk össze. Biomolekulák rögzítésére alkalmas aminoés epoxicsoportokat tartalmazó szenzorfelületet alakítottunk ki a szilanizálási eljárás optimalizálásával laboratóriumi körülmények között. Vizsgáltuk a vákuumszilanizálással készített szenzorok alkalmazhatóságát a különböző rögzítési eljárások során. Az aminocsoportokat hordozó hullámvezetőn glutáraldehiddel (2,5%) közvetlenül rögzítettük a biomolekulákat, illetve borostyánkősav anhidriddel (0,2%) karboxilcsoporttá alakítva, az EDC/NHS reagensek összetételét optimalizálva (0,4 mol/l EDC / 0,1 mol/l NHS; 1:1) immobilizáltuk a fehérjemolekulákat. Az epoxicsoportokat hordozó szenzoron közvetlenül lúgos közegben (pH=9,5) rögzítettük a biomolekulákat.
- 6.1.2. Versengő immunszenzort fejlesztettük ki trifluralin növényvédőszer-maradvány meghatározására felszíni vizekből, valamint gyümölcslevekből. A trifluralin növényvédőszer-hatóanyag kimutatására a célvegyületből haptént, konjugátumokat és ellenanyagot készítettünk. Az optimalizált működési paraméterek mellett a TRIS puffer oldatban (42 mmol/l, pH 7,4) mért kalibrációs görbe alapján a szenzor gátlási középértéke (IC₅₀) 1,05x10⁻⁶±

 $0,52 \times 10^{-6}$ ng/ml értékűnek adódott, ami több nagyságrenddel kisebb, mint ELISA módszerrel (2,87±0,39 ng/ml) mérve. Felszíni víz és gyümölcslevek vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények megfeleltek az ELISA, illetve GS-MS referenciamódszerrel mért értékeknek a független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten.

- 6.1.3. Sikeresen fejlesztettük ki jelölésmentes kompetitív immunszenzort zearalenon meghatározására. Az aminocsoportokat hordozó felületen készített szenzorral 10⁻²-10¹ pg/ml ZON-koncentráció között találtuk a dinamikus méréstartományt, míg a detektálás alsó határa 5x10⁻³ pg/ml ZON értékűnek adódott. A karboxilcsoportokat tartalmazó szenzorral nyert immunszenzor dinamikus méréstartománya 10⁻²-10² pg/ml közé esett, a detektálás alsó határa 2x10⁻³ pg/ml ZON. Az optimalizált mérési eljárással mesterségesen szennyezett (*spike*) kukoricamintákat mérve a gátlási középérték (IC₅₀) 0,053±0,013 pg/ml értékűnek adódott, míg az ELISA mérésnél meghatározható IC₅₀ értéke 2,04±0,66 ng/ml volt. A kukoricaminták immunszenzorral mért eredményei valamint az ELISA referenciamódszerrel mért értékek között független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten nincs szignifikáns különbség.</p>
- 6.1.4. Versengő immunszenzort fejlesztettük ki aflatoxin B1 mikotoxin meghatározására búza, árpa- és fűszerpaprika-mintákból. Az optimalizált mérési eljárást alkalmazva a dinamikus méréstartomány a 0,001-1 ng/ml tartományban volt, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,023±0,009 ng/ml (χ²/szabadsági fok:1,14; R²: 0,99), a detektálás alsó határa 0,0005 ng/ml értékűnek adódott. A búza-, árpa- és fűszerpaprika-minták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.</p>
- 6.1.5. Kompetitív immunszenzort fejlesztettük ki ochratoxin A meghatározására búza-, árpa- és vörösbormintákból. Az optimalizált mérési eljárást alkalmazva a dinamikus méréstartományt 0,5-10 ng/ml között kaptuk, a gátlási középértéket (IC₅₀) 2,01±0,47 ng/ml (χ²/szabadsági fok=0,093; R²=0,983), a detektálás alsó határát 0,1 ng/ml értékűnek találtuk. A búza-, árpa- és vörösbor-minták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referencia-módszerrel mért értékeknek.</p>
- 6.1.6. Sikeresen dolgoztunk ki **deoxi**nivalenol-tartalmának meghatározására szelektív immunszenzoros mérési eljárást. A DON-standardokat vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,005-50 ng/ml, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,15±0,08 ng/ml (χ^2 /szabadsági fok= 1,57; r² = 0,99), a kimutatás alsó határa 0,001 ng/ml értékűnek adódott. A deoxinivalenollal adalékolt búzalisztmintákkal nyert kalibrációs görbe alapján a dinamikus méréstartomány a lisztmintára számolva 0,01-10 mg/kg volt, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,13±0,04 mg/kg értékűnek adódott értéke, ami megfelel az előírásokban foglalt követelményeknek.
- 6.1.7. Nagy érzékenységű, jelölésmentes immunszenzort fejlesztettünk ki fermentált zöldséglevek hisztaminkoncentrációjának gyors meghatározására. A kifejlesztett

eljárással a dinamikus méréstartomány 10⁻²-1 pg/ml közé esett, a gátlási középérték (IC₅₀) 0,08±0,02 pg/ml (szigmoid illesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,19), a kimutatás alsó határa 0.005 pg/ml adódott. Fermentált zöldséglevekben lévő hisztaminkoncentrációjának meghatározása során megállapítottuk, hogy ha az egyes biogén aminok (putreszcin, kadaverin, agmatin) a hisztaminnál lényegesen nagyobb koncentrációban vannak jelen, akkor ezek jelentősen befolyásolják a szenzorral mért eredményeket. Bebizonyítottuk, hogy ha az adott biogén HPLC módszerrel meghatározott koncentrációját aminoknak а az immunszenzorral mért keresztreakció %-ának arányában vettük figyelembe (normált HPLC értékek), akkor igen jó egyezést (R²=0.97) kaptunk a fermentált zöldséglevek különböző technikával mért biogén aminkoncentrációja között. Annak ellenére, hogy az immunszenzorral mért hisztaminkoncentrációt a különböző biogén aminok nagy koncentrációban való jelenléte befolyásolja, a szenzor alkalmas gyors mérésre, csak az adott határértéket meghaladó koncentrációt mutató mintákat kell további vizsgálatoknak alávetni.

- 6.1.8. Versengő immunszenzort fejlesztettünk ki OWLS detektálással hal (ponty, Cvprinus carpio) és béka (vöröshasú unka, Bombina bombina) vitellogenin fehérjéjének kimutatására. A pontylipovitellin dinamikus méréstartománya 3 és 150 ng/ml Lpv közé esett, a gátlási középérték (IC₅₀) 21,18 \pm 2,86 ng/ml, a kimutatás alsó határa 0,7 ng/ml értékűnek adódott. A békalipovitellint vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott. A lipovitellin kimutatásának alsó határára 0,1 mg/ml, míg a gátlási középértékre (IC₅₀) 1,04±0,14 ng/ml értéket kaptunk. Ökológiai tenyésztésű hím és nőstény pontyok vérszérumában vizsgáltuk a vitellogeninszintet, eredményeink alapján a hím egyedek vitellogeninszintie 0,5±0,3, illetve 5,7±1,8 µg/ml Vtg-nek adódott, addig a nőstény egyedekben 246,1±19,6, 367,5±54,7 és 465,4±46,9 µg/ml Vtg-t mértünk az immunszenzorral. Nőstény és hím békaegyedek máj-, szív- és vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltuk a természetes vitellogeninszintet. A minták közül a legnagyobb koncentrációt – a várakozásnak megfelelően – a petefészekben és a petében találtuk (754,5±73,5 és 1030,0±298,5 µg/g,). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az immunszenzoros mérési eljárás alkalmas hal (ponty, Cvprinus carpio) és béka (vöröshasú unka, Bombina bombina) vitellogenin fehérjéjének kimutatására, a hím egyedekben mérhető Vtg-szint alapján monitorozni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek endokrin zavaró hatású szermaradványokkal való szennyezettségét.
- 6.2. Mikrobiális szenzorok fejlesztése és alkalmazása
- 6.2.1. Összefoglalva az eredményeket, EC-OWLS technika alkalmazásával polarizáló potenciál (1 V) hatására natív L. plantarum 2142-sejtek rögzítését sikerült megvalósítani a szenzorcellában. A vizsgálatok bizonyították, hogy az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek megkülönböztethetőek, ha a minták azonos koncentrációjú sejtet tartalmaznak. Az élő LAB-sejtek elektrokémiai cellában való rögzítése lehetővé tette a kémiai stresszt okozó vegyületek hatásának tanulmányozását. A különböző kémiai kezelések LAB-sejtek szaporodására hatására **EC-OWLS** módszerrel kapott kifejtett eredményeket referenciamódszerként mikro-assay eljárással hasonlítottuk össze. Az EC-OWLS mérések eredményei igazolták, hogy a L. plantarum 2142-sejtek

szaporodásra a vizsgált stresszfaktorok közül legnagyobb hatása a 9 mmol/l hidrogén-peroxidnak és az 5 mol/l tejsavnak van.

- 6.2.2. Eljárást dolgoztunk ki *E. coli*-sejtek koncentrációjának gyors meghatározására. Különbséget találtunk az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek szenzoros jele között, a hőkezeléssel elpusztított sejtek szignifikánsan nagyobb jelet adtak azonos koncentrációban az élő sejteknél. Az élő sejtekkel a dinamikus méréstartomány 10⁵-10⁹ TKE/ml értékűnek adódott, a 10⁹ TKE/ml töménységű minta esetében a jel nagysága 21,3±3,6 egység. A hőkezeléssel elpusztított sejtek esetében a dinamikus méréstartományt 10³-10⁹ TKE/ml között találtuk, a 10⁹ TKE/ml minta esetében a jel nagysága 33,8±4,5 egység.
- 6.2.3. Bioszilika képződésének időbeli követését valósítottuk meg szilikatein enzim és TEOS monomer jelenlétében az OWLS szenzor szilícium-oxid titán-oxid (STO) felületén. Meghatároztuk a szilikatein enzim látszólagos Michaelis-konstansát az STO-szenzoron való immobilizálásra / polimerizációra vonatkozóan. Az eredmények alapján beigazolódott, hogy a TEOS spontán polimerizációra hajlamos (5,09x10⁻¹² mol/cm², 15 °C). A hőmérséklet jelentősen befolyásolta a polimerizációt és az immobilizációt, különösen érdekesnek találtuk, hogy 25 °C-on a látszólagos K_M (1,02x10⁻¹¹ mol/cm²) kissé csökkent a 15 °C-on mért értékhez (1,62x10⁻¹¹ mol/cm²) képest. Az eredmények alapján a további kísérleteket minden esetben 15 °C-on végeztük.

Anti-szilikatein antitestet rögzítve immunszenzorral igazoltuk, hogy a szilikatein enzim jelenléte kimutatható-e a rekombináns *E. coli*-sejtek felületén. Míg az *E. coli* B200-törzs esetében mindössze 2-5 tömegegységnyi jelet kaptunk, addig a rekombináns *E. coli* BL21AI-törzs esetében 20-35 tömegegységnyi jelet mértünk az injektált mikroba koncentrációjától függően.

TEOS reagenssel előkezelt *E. coli* BL21AI-sejteket alkalmazva vizsgáltuk a sejtkoncentráció függvényében a mért jelek nagyságát, azaz a szenzor felületén való kötődést. A 10^7 - 10^8 TKE/ml koncentrációjú oldat injektálásával a jelek exponenciálisan növekedtek, majd 10^8 TKE/ml sejtkoncentráció felett a jelek az adott körülmények között már nem nőttek tovább.

A módosított *E. coli* BL21AI alkalmazásával új típusú gátlási szenzorokat fejlesztettünk ki, majd a szenzorok gyakorlatban történő alkalmazhatóságát szennyezőanyagok, szermaradványok kimutatásával igazoltuk.

RÖVIDÍTÉSEK

AFM	atomerő-mikroszkóp
APTS	3-amino-propil-trietoxi-szilán
BSA	marhaszérum-albumin
CAP	klóramfenikol
CF	karbofurán
CMD	karboximetil-dextrán
ConA	konalbumin
CR	keresztreakció
CVD	kémiai gőzfázisú rétegleválasztás
DEAE	dietil-amino-etil
DNS	dezoxiribonukleinsav
DON	deoxinivalenol
EC-OWLS	elektrokémiai – optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia
ED	endokrin zavaró vegyületek
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EI	elektronütközéses
EIA	enzimjelzéses immunassay
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens eljárás
EQCM	elektrokémiai kvarckristály-mikromérleg
FIA	áramló oldatos elemzés
GC	gázkromatográfia
GOPS	3-glicidoxipropil-trimetoxi-szilán
HIV	emberi immunhiány-előidéző vírus
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HRP	tormaperoxidáz
HSA	humánszérum-albumin
ISE	ionszelektív elektród
ITO	indium-oxid – ón-oxid
IUPAC	Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója
JA	csicsókaszirup (Jerusalem artichoke, Helianthus tuberosus)
KLH	kürtőscsiga-hemocianin
K _M	Michaelis-konstans
LAB	Lactobacillus plantarum 2142-sejtek
LB	Luria-Bertani (LB) tápleves
LCD	folyadékkristályos képernyő
LC-MS-MS	folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria
LOD	detektálás alsó határa

Lpv	lipovitellin
MIP	molekuláris lenyomatú polimer
MRS	deMan Rogosa Sharpe tápleves
MS	tömegspectrometria
NADH	nikotin-adenin-dinukleotid (redukált forma)
NHS	N-hidroxi-szukcinimid
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NMWL	névleges molekulatömeg határérték
NTE és NTM	transzverz elektromos – és a transzverz mágneses fénymódusokhoz tartozó beesési szögekből számolt effektív törésmutatók
OLED	szerves polimer alapú világító dióda
OPD	1,2-fenilén-diamin
OPLC	túlnyomásos rétegkromatográfia
OVA	ovalbumin
OWLS	optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia
PBS	foszfát pufferolt sóoldat
PBST 0.2	Tween 20-at tartalmazó PBS
PCB	poliklórozott bifenil
PCR	polimeráz láncreakció
PVC	poli-(vinil-klorid)
QCM	kvarckristály-mikromérleg
RAPD	véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS
RASFF	Az EU tagországokban működő, az élelmiszerekre és a takarmányokra vonatkozó gyorsvészjelző rendszer
RIA	radioimmunassay
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció
SAM	önszerveződő monoréteg
SC	szilikatein enzim
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézis
SPE	szilárd fázisú extrakció
SPR	felületi plazmon rezonancia
STO	szilícium-oxid – titán-oxid
TE és TM	transzverz elektromos és transzverz mágneses fénymódus
TEOS	tetra-etoxi-szilán
TIR	teljes belső reflexió
TKE	telepképző-egységek száma
TLC	
	vékonyréteg-kromatográfia
TRIS	vékonyréteg-kromatográfia 2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol
TRIS Vtg	vékonyréteg-kromatográfia 2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol vitellogenin

IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Sayed, S. (1987) Expand+Transport of chloramphenicol into sensitive strains of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemoth 19(1), 7-20.
- Actis, P., Jejelowo, O.A., Pourmand, N. (2010) Ultrasensitive mycotoxin detection by STING sensors. Biosens. Bioelectron., 26, 333-337.
- Adams, M.R., Hall, C.J. (1988a) Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. Techn., 23, 287-292.
- Adams, M.R., Hall, C.J. (1988b) Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic acid, acetic acid and their mixtures. Int. J. Food Sci. Techn., 23, 287-292.
- Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013a) Biosilica-based immobilization strategy for label-free OWLS sensors. Sensor. Actuat. B-Chem, 177, 1-7.
- Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013b) Bacterial sensors based on biosilica immobilization for label-free OWLS detection. New Biotechnology Available online 4 February 2013 <u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413000095</u>
- 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. Biosens. Bioelectron., 22 (6) 797-802.
- Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Nagy, A., Németh, Gy., Szendrő, I., Székács A. (2013c) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensor for detection of carp vitellogenin. Sensor. Actuat. B-Chem., 176, 932-939.
- Adányi, N., Németh, E., Halász, A., Szendrő, I., Váradi, M. (2006) Application of electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy for studying the effect of different stress factors on lactic acid bacteria. Anal. Chim. Acta, 573, 41-47.
- Adányi, N., Székács, I., Szendrő, I., Székács, A. (2012) Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors. Food and Agricultural Immunology, DOI10.1080/09540105.2012.731686
- Adányi, N., Váradi, M., Kim, N., Szendrő, I. (2006) Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. Curr. Appl. Phys., 6 (2) 279-286.
- Ahluwalia, A., De Rossi, D., Ristori, C., Schirone, A., Serra, G. (1992) A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors. Biosens. Bioelectron., 7, 207-214.
- Ahn, S. DeCory, T.R., Durst, R.A. (2002) In. Proceedings of the Presentation at the Fifth Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis, Book of Abstracts, pp. 34.
- An, L., Hu, J., Yang, M. (2008) Evaluation of estrogenicity of sewage effluent and reclaimed water using vitellogenin as a biomarker. Environ. Toxicol. Chem., 27, 154-158.
- Asperger, A., Efer, J., Koal, T., Engewald, W. (2001) On the signal response of various pesticides in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 937, 65-72.
- Aydin, A., Erkan, M.E., Başkaya, R., Ciftcioglu G. (2007) Determination of Aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. Food Control, 18, 1015-1018.
- Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R. (2005) Microfluidic immunosensor systems. Biosens. Bioelectron., 20, 2488-2503.
- Baráth, Á., Halász, A., Németh, E., Zalán, Zs. (2004) Selection of LAB strains for fermented red beet juice production. Eur. Food Res. Technol., 218, 184-187.
- Barse, A.V., Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K., Jadhao, S.B. (2007) Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of *Cyprinus carpio* to diethyl phthalate. Pestic. Biochem. Phys., 88, 36-42.

- 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. Environ. Res., 101, 68-73.
- Berganza, J., Olabarria, G., García, R., Verdoy, D., Rebollo, A., Arana, S. (2007) DNA microdevice for electrochemical detection of *Escherichia coli* 0157H7 molecular markers. Biosens. Bioelectron., 22 (9-10) 2132-2137.
- Bernard, A., Bosshard, H.R. (1995) Real-time monitoring of antigen-antibody recognition on a metal oxide surface by an optical grating coupler sensor. Eur. J. Biochem., 230, 416-423.
- Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., Blust, R. (2009) Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). Ecotox. Environ. Safe., 72, 720-728.
- Bier, F.F., Schmid, R.D. (1994) Real time analysis of competitive binding using grating coupler immunosensors for pesticide detection. Biosens. Bioelectron., 9, 125-130.
- Blodgett, K.B., Langmuir I. (1937) Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. Phys. Rev., 51, 964-982.
- Bodmer, S., Imark, C., Kneubühl, M. (1999) Biogenic amines in foods Histamine and food processing. Inflamm. Res., 48, 296-300.
- Bongaers, E., Alenus, J., Horemans, F., Weustenraed, A., Lutsen, L., Vanderzande, D., Cleij, T.J., Troost, F.J., Brummer, R.J., Wagner, P. (2010) A MIP-based biomimetic sensor for the impedimetric detection of histamine in different pH environments. Phys. Status Solidi A., 207, 837-843.
- Börchers, T., Spener, F., Kruchinin, A.A., Vlasov, Y.G. (1997) Biosensor for DNA detection on the basis of integrated optical waveguide. In. Proceedings of The 11th European Conference on Solid State Transducers, EUROSENSORS XI., pp.1433-1436.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Brecht, A., Gauglitz, G. (1997) Label free optical immunoprobes for pesticide detection. Anal. Chim. Acta 347, 219-233.
- Brecht, A., Gauglitz, G., Polster, J. (1993). Interferometric immunoassay in a FIA-system a sensitive and rapid approach in label-free immunosensing. Biosens. Bioelectron., 8, 387-392.
- 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*). Environ. Toxicol. Chem., 28, 1699-1708.
- Broeders, J., Duchateau, S., Van Grinsven, B., Vanaken, W., Peeters, M., Cleij, T., Thoelen, R., Wagner, P., De Ceuninck, W. (2011) Miniaturised eight-channel impedance spectroscopy unit as sensor platform for biosensor applications. Phys. Status Solidi A., 208, 1357-1363.
- Brusatori, M.A., Van Tassel, P.R. (2003) Biosensing under an applied voltage using optical waveguide lightmode spectroscopy. Biosens. Bioelectron., 18, 1269-1277.
- Buckle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D., Lowe, C.R. (1993) The resonant mirror a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions, Part II Applications. Biosens. Bioelectron., 8, 355-363.
- Bulukin, E., Meucci, V., 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.
- Bürgel, S.C., Guillaume-Gentil, O., Zheng, L., Vörös, J., Bally, M. (2010) Zirconium ion mediated formation of liposome multilayers. Langmuir, 26 (13) 10995-11002.
- Byrd, R.A., Markham, J.K., Emmerson, J.L. (1995) Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits I. Trifluralin. Fundam. Appl. Toxicol., 26, 181-190.
- Carlson, M.A., Bargeron, C.B., Benson, R.C., Fraser, A.B., Phillips, T.E., Velky, J.T., Groopman, J.D., Strickland, P.T. (2000) An automated, handheld biosensor for aflatoxin. Biosens. Bioelectron., 14, 841-848.

- Carnes, E., Wilkins, E. (2005) The development of a new, rapid, amperometric immunosensor for the detection of low concentrations of bacteria Part II Optimization of the system for *Escherichia coli*. AM. J. Appl. Sci., 2, 607-613.
- Carsol, M.A., Mascini, M. (1999) Diamine oxidase and putrescine oxidase immobilized reactors in flow injection analysis a comparison in substrate specificity. Talanta, 50, 141-148.
- Cha, J.N., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S.C., Chmelka, B.F., Stucky, G.D., Morse, D.E. (1999) Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 361-365.
- Chang, L.W., Toth, G.P., Gordon, D.A., Graham, D.W., Meier, J.R., Knapp, C.W., de Noyelles, F.J., Campbell, S., Lattier, D.L. (2005) Responses of molecular indicators of exposure in mesocosms Common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicides alachlor and atrazine. Environ. Toxicol. Chem., 24, 190-197.
- Charles, M-H., Colin, B., Delaire, T., Jaffrezic, N., Mandrand, B., Martelet, C., Saby, C. (1993) Methodes d'immobilisation de biomolecules sur transducteur a base de silicium. Innov. Tech. Biol. Med., 14 (3) 324-334.
- Chevrier, D., Guesdon, J.L., Mazié, J.C., Avrameas, S. (1986) Enzyme immunoassay for the measurement of histamine. J. Immunol. Methods, 94, 119-125.
- Choi, J.W., Park, K.W., Lee, D.B., Lee, W., Lee, W.H. (2005) Cell immobilization using selfassembled synthetic oligopeptide and its application to biological toxicity detection using surface plasmon resonance. Biosens. Bioelectron., 20 (11) 2300-2305.
- Chowdhury, A.D., De, A., Chaudhuri, C. R., Bandyopadhyay, K., Sen, P. (2012) Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157:H7 Bacteria. Sensor. Actuat. B-Chem., 171-172, 916-923.
- Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, J.B., Chung, D.H. (2007) Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chem., 102, 385-391.
- Clarke, J.R., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Pitura, R.J., (1994) Quantification of ochratoxin A in swine kidneys by enzyme-linked immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure. J. Food Protect., 57, 991-995.
- Clerc, D., Lukosz, W. (1997) Direct immunosensing with an integrated-optical output grating coupler. Sensor. Actuat. B-Chem., 40, 53-58.
- Codex Alimentarius Commission (FAO/WHO Food standards), 21st Session 29 June -12 July 1995; Rome, Italy. Report of the twenty-first session of the Codex Committee on fish and fishery products 2-6 May 1994, Bergen, Norway. www.codexalimentarius.net/download/report/367/al95 18e.pdf (09.19.2011.)
- Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC), 38th Session 24-28 April 2006, The Hague, The Netherlands
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 503 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L3645-24.
- Communication from the Comission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community strategy for Endrocrine Disrupters a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Commission of the European Communities, COM (2001) 262.
- Cooper, I.R., Meikle, S.T., Standen, G., Hanlon, G.W., Santin., M. (2009) The rapid and specific real-time detection of Legionella pneumophila in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy. J. Microbiol. Meth., 78, 40-44.
- Corona-Izquierdo, F.P., Membrillo-Hernández, J. (2002) Biofilm formation in Escherichia coli is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). Res. Microbiology, 153, 181-185.
- Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J. (1993) The resonant mirror a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions, Part I Principle of operation and associated instrumentation. Biosens. Bioelectron., 8, 347-353.

- Czitrovszky, A., Hámori, A., Kiss, Á., Pogány, L. (2003) Nagyfelbontású lézerinterferometrikus felületvizsgáló berendezés a nanotechnológia szolgálatában. Magyar Tudomány, 9, 1099-1105.
- Csúcs, G., Ramsden, J.J. (1998) Solubilization of planar bilayers with detergent. Biochim. Biophys. Acta, 1369 (2) 304-308.
- D'Mello, J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. (1999) Fusarium mycotoxins a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Anim. Feed Sci. Tech., 80, 183-205.
- Darain, F., Park, D.S., Park, J.S., Chang, S.C., Shim, Y.B. (2003) Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy. Biosens. Bioelectron., 19, 1245-1252.
- Darain, F., Park, D.S., Park, J.S., Chang, S.C., Shim, Y.B. (2004) A separation-free amperometric immunosensor for vitellogenin based on screen-printed carbon arrays modified with a conductive polymer. Biosens. Bioelectron., 20, 1780-1787.
- del Busto-Ramos, M., Budzik, M., Corvalan, C., Morgan, M., Turco, R., Nivens, D., Applegate, B. (2008) Development of an online biosensor for in situ monitoring of chlorine dioxide gas disinfection efficacy. Appl. Microbiol. Biot., 78 (4) 573-580.
- Divies, C. (1975) Remarques sur l'oxydation de l'ethanol par une 'electrode microbienne' d'*Acetobacter xylinium* | [Remarks on ethanol oxidation by an Acetobacter xylinum microbial electrode]. Collect Ann. Inst. Pastuer, Ann. Microbiol. (Paris), 126, 175-186.
- Dobolyi, Cs., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Baranyi, N., Szécsi, Á., Lustyik, Gy., Micsinai, A., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Kukolya, J. (2011) Aflatoxin-termelő Aspergillus Flavus törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. Növényvédelem, 47 (4), 125-133.
- Dobolyi, Cs., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szobopszlay, S., Krifaton, C., Kukolya, J. (2013) Occurence of aflatoxin producing Aspergillus Flavus isolates in maize kernel in Hungary. Acta Alimentaria, (Accepted)
- Dubrovsky, T.B., Demcheva, M.V., Savitsky, A.P., Mantrova, E.Y., Yaropolov, A.I., Savransky, V.V., Belovolova, L.V. (1993) Fluorescent and phosphorescent study of Langmuir-Blodgett antibody films for application to immunosensors. Biosens. Bioelectron., 8, 377-385.
- Eissa, A.S, Khan, S.A. (2006) Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. Food Hydrocolloid., 20, 543-547.
- Eltzov, E., Ben-Yosef, D.Z., Kushmaro, A., Marks, R. (2008) Detection of sub-inhibitory antibiotic concentrations via luminescent sensing bacteria and prediction of their mode of action. Sensor. Actuat. B-Chem., 129, 685-692.
- Ercole, C., Del Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., Lepidi, A. (2003) Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. Sensor. Actuat. B-Chem., 91, 163-168.
- Erdélyi, K., Frutos, A.G., Ramsden, J.J., Szendrő, I., Voirin, G. (2008) Grating-Based Optical Biosensors. In. Handbook of biosensors and biochips. (Marks, R.S., Cullen, D.C., Karube, I., Lowe, C.R. Weetall, H.H., Ed.) John Wiley and Sons Ltd., New York. DOI 10.1002/9780470061565.hbb056
- Falfushynska, H.I., Stolyar, O. (2009) Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. Ecotox. Environ. Safe., 72, 729-736.
- Fang, L.Y., Huang, E.A., Safarpour, M.M. (1998) Applications of capillary electrochromatography analysis for formulated pesticide products. J. Capillary Electrophor., 5, 115-123.
- Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L. (2003) Probiotics what are they? What are their effects on gut physiology? Best Pract. Res. Cl. Ga., 17, 711-724.
- Francis, P.C., Emmerson, J.L., Adams, E.R., Owen, N.V. (1991) Oncogenicity study of trifluralin in B6C3F1 mice. Food Chem. Toxicol., 29, 549-555.

- 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. Comp. Biochem. Phys. A, 134, 615-623.
- Gaag, van der 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.
- Galindo, E., Lagunas, F., Osuna, J., Soberon, X., Garcia, J.L. (1998) A microbial biosensor for 6aminopenicillanic acid. Enzym. Microb. Tech., 23, 331-334.
- Garimella, U.I., Stearman, G.K., Wells, M.J. (2000) Comparison among soil series and extraction methods for the analysis of trifluralin. J. Agr. Food Chem., 48, 5874-5880.
- Garipcan, B., Çağlayan, M.O., Demirel, G. (2011) New Generation Biosensors Based on Ellipsometry. (in: New Perspectives in Biosensors Technology and Applications Ed: Serra P.A.) Publisher InTech 197-214.
- Gathumbi, J.K., Usleber, E., Ngatia, T.A., Kangethe, E.K., Martlbauer, E. (2003) Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immonoassay in rapid detection of aflatoxin B1 in chicken liver tissues. Poultry Sci., 82, 585-590.
- Gauglitz, G., Proll, G. (2008) Strategies for Label-Free Optical Detection. Adv. Biochem. Eng. Biot., 109, 395-432.
- Geddes, N.J., Martin, A.S., Caruso, F., Urquhart, R.S., Furlong, D.N., Sambles, J.R., Than, K.A., Edgar, J.A. (1994) Immobilisation of IgG onto gold surfaces and its interaction with anti-IgG studied by surface plasmon resonance. J. of Immunol. Methods, 175, 149-160.
- Gergely, J. (1979) Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- Gfeller, K.Y., Nugaeva, N., Hegner, M. (2005) Rapid Biosensor for Detection of Antibiotic-Selective Growth of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microb., 71 (5) 2626-2631.
- Guilbault, G.G. (1976) Handbook of Enzimatic Methods of Analysis. Marcel Dekker, New York, pp. 490.
- Gunier, R.B., Harnly, M.E., Reynolds, R., Hertz, A., von Behren, J. (2001) Agricultural pesticide use in California: pesticide prioritization, use densities, and population distributions for a childhood cancer study. Environ. Health Persp., 109, 1018-1071.
- Güngördü, A., Ozmen, M. (2011) Assessment of seasonal and sex-related variability of biomarkers in carp (*Cyprinus carpio L.*) from Karakaya Dam Lake, Turkey. Environ. Toxicol. Phar., 31, 347-356.
- Gyss, C., Bourdillon, C. (1987) Enzymatic electrocatalysis as a strategy for electriochemical detection in heterogeneous immunoassay. Anal. Chem., 59, 2350-2355.
- Gyurcsányi, E.R. (2005) Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában. Magyar Kémiai Folyóirat, 111 (3) 133-142.
- Habeeb, A.F.S. (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Anal. Biochem., 14, 328-336.
- Hajós, Gy., Idei, M. (2001) Elektroforetikus és elektrokromatográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. Magyar Kémikusok Lapja, 56, 364-368.
- Hall, M., Eldridge, D.B., Saunder, R.D., Fairclough, D.L., Bateman, R.C., (1995) A rapid dipstick test for histamine in tuna. Food Biotechnol., 9, 39-57.
- Hammar, E., Berglund, A., Hedin, A., Norrman, A., Rustas, K., Ytterstrom, U., Akerblom, E. (1990) An immunoassay for histamine based on monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods, 128, 51-58.
- 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. Environ. Sci., 14 (2) 95-108.
- Harboe, N., Inglid, A. (1973) Immunization, isolation of immunoglobulin, estimation of antibody titer. Scand. J. Immunol., Suppl 1., 161-169.
- Hegedűs, Gy., Bélai, I., Székács, A., (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. Anal. Chim. Acta, 421, 121-133.

- Hennies, M., Wiesmann, M., Allner, B., Sauerwein, H. (2003) Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*) purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. Sci. Total Environ., 309, 93-103.
- Herbert, P., Cabrita, M.J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A. (2005) Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. J. Food Eng., 66, 315-322.
- Hild, E. (2011) Planar waveguides as chemical and biochemical sensors, <u>http://www.owls-sensors.com/pdf/theory.pdf</u> (2011. 10. 19.)
- Hinck, J.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Echols, K.R., Gale, R.W., Wieser, C., May, T.W., Ellersieck, M., Coyle, J.J., Tillitt, D.E. (2008) Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. Sci. Total Environ., 390, 538-557.
- Ho, J.A.A., Wauchope, R.D. (2002) A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1. Anal. Chem., 74, 1493-1496.
- Hoa, X.D., Kirk, A.G., Tabrizian, M. (2007) Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. Biosens. Bioelectron., 23, 151-160.
- Hock, B. (1997) Antibodies for immunosensors. A review. Anal. Chim. Acta, 347, 177-186.
- 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). Comp. Biochem. Phys. C 130(1), 119-131.
- Holford, T.R.J., Davis, F., Higson, S.P.J. (2012) Recent trends in antibody based sensors. Biosens. Bioelectron., 34, 12-24.
- Horemans, F., Alenus, J., Bongaers, E., Weustenraed, A., Thoelen, R., Duchateau, J., Lutsen, L., Vanderzande, D., Wagner, P., Cleij, T.J. (2010) MIP-based sensor platforms for the detection of histamine in the nano- and micromolar range in aqueous media. Sensor. Actuat. B-Chem., 148, 392-398.
- Huebner, H.J., Phillips, T.D. (2003) Clay-based affinity probes for selective cleanup and determination of aflatoxin B1 using nanostructured montmorillonite on quartz. J. AOAC Int., 86, 534-539.
- Hug, T.S., Prenosil, J.E., Morbidelli, M. (2001) Optical waveguide lightmode spectroscopy as a new method to study adhesion of anchorage-dependent cells as an indicator of metabolic state, Biosens. Bioelectron. 16, 865-874.
- Hui, J.Y., Taylor, S.L. (1983) High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. J. AOAC, 66, 853-857.
- Hunt, H.K., Soteropulos, C., Armani, A.M. (2010) Bioconjugation Strategies for Microtoroidal Optical Resonators. Sensors, 10, 9317-9336.
- Jansen, S.C., Dusseldorp, M., Bottema, K.C., Dubois, A.E.J. (2003) Intolerance to dietary biogenic amines a review. Ann. Allerg. Asthma Im., 91, 233-241.
- Jia, J., Tang, M., Chen, X., Qi, L., Dong, S. (2003) Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material. Biosens. Bioelectron., 18, 1023-1029.
- Jie, G., Zhang, J., Wang, D., Cheng, C., Chen, HY., Zhu, J.J. (2008) Electrochemiluminescence immunosensor based on CdSe nanocomposites. Anal. Chem., 80 (11) 4033-4039.
- Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G. (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. Anal. Biochem., 198, 268-277.
- Jönsson, U., Malmqvist, M., Rönnberg, I. (1985) Immobilization of immunoglobulins on silica surfaces. Biochem. J., 363-371.
- 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. Anal. Chim. Acta, 673, 173-178.
- Kalac, P., Spicka, J., Krizek, M., Steidlova, S., Pelikanova, T. (1999) Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. Food Chem., 67, 275-280.

- Karasali, H., Balayannis, G., Hourdakis, A., Ambrus, A.(2006) Development and singlelaboratory validation of a new gas chromatographic multi-pesticide method of analysis of commercial emulsifiable concentrate formulations containing alachlor, chlorpyrifos methyl, fenthion and trifluralin as active ingredients. J. Chromatogr. A, 1129, 300-303
- Karasinski, J., White, L., Zhang, Y., Wang, E., Andreescu, S., Sadik, O.A., Lavine, B.K., Vora, M. (2007) Detection and identification of bacteria using antibiotic susceptibility and a multi-array electrochemical sensor with pattern recognition. Biosens. and Bioelectron., 22, 2643.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (1987) Enzyme immobilization. In. Biotechnology vol. 7 (Rehm, J. H., Reed, G., Ed.), V.C.H., Weinheim, Germany, pp. 347-404.
- Kim, B.C., Gu, M.B. (2003) A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. Biosens. Bioelectron., 18, 1015-1021.
- Kim, N., Kim, D.K., Cho, Y.J., Moon, D.K., Kim, W.Y. (2008) Carp vitellogenin detection by an optical waveguide lightmode spectroscopy biosensor. Biosens. Bioelectron., 24, 391-396.
- Kim, Y.-H., Park, J.-S., Jung, H.-I. (2009) An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor. Sens. Actuat. B: Chem., 138, 270-277.
- Kiss, J., Sass-Kiss, A. 82005) Protection of originality of Tokaji Aszú AMines and organic acids in btrytzed wines by high performance liquid chromatography. J. Agr. Food Chem., 53, 10042-10050.
- Kong, S., Davison, A.J. (1980) The role of interactions between O₂, H₂O₂, ·OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. Arch. Biochem. Biophys., 204, 18-29.
- Korde, A., Pandey, U., Banerjee, S., Sarma, H.D., Hajare, S., Venkatesh, M., Sharma, A.K., Pillai, M.R.A. (2003) Development of a radioimmunoassay procedure for aflatoxin B1 measurement. J. Agric. Food Chem. 51, 843-846.
- Kovács, B., Nagy, G., Dombi, R., Tóth, K. (2003) Optical biosensor for urea with improved response time. Biosens. Bioelectron., 18, 111-118.
- Kößlinger, C., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H., Koch, S., Woias, P. (1992) A quartz crystal biosensor for measurement in liquids. Biosens. Bioelectron., 7, 397-404.
- Kroó, N. (2003) Felületi plazmonok és közeli tér mikroszkópia. Magyar Tudomány, 9, 1096-1099.
- Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A. (2006) Microbial biosensors. Anal. Chim. Acta, 568, 200-210.
- Letcher, R.J., Sanderson, J.T., Bokkers, A., Giesy, J.P., van den Berg, M. (2005) Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) heptocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. Toxicol. Appl. Pharm., 209, 95-104.
- 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.
- Li, Y., Kobayashi, M., Furui, K., Soh, N., Nakano, K., Imato, T. (2006) Surface plasmon resonance immunosensor for histamine based on an indirect competitive immunoreaction. Anal. Chim. Acta, 576, 77-83.
- Liang, R.-P., Wang, Z.-X., Zhang, L., Qiu, J.-D. (2012) A label-free amperometric immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on highly ordered porous multiwalled carbon nanotubes/silica nanoparticles array platform. Sensor. Actuat. B-Chem., 166–167, 569–575.
- Liau, Y.H., Scherer, N.F., Rhodes, K. (2001) Nanoscale electrical conductivity and surface spectroscopic studies of indium-tin oxide. J. Phys. Chem. B, 105, 3282-3288.
- Lieber, E.R., Taylor, S.L. (1978) Thinlayer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish. J. Chromatogr., 153, 143-152.
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensor. Actuat., 4, 299-304.
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1995) Biosensing with surface plasmon resonance how it all started. Biosens. Bioelectron., 10, i-ix.

- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., (1990) Antagonistic activities of lactic-acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev., 87, 149-164.
- Lipigorngoson, S, Limtrakul, P, Suttajit, M, Yoshizawa, T. (2003) In-house direct cELISA for determining aflatoxin B1 in Thai corn and peanuts. Food Addit Contam. 20, 838-845.
- Liu, G., Lin, Y.Y., Wang, J., Wu, H., Wai, C.M., Lin Y. (2007) Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip. Anal. Chem., 79 (20) 7644-7653.
- Liu, G., Su, W., Xu, Q., Long, M., Zhou, J., Song, S. (2004c) Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. Food Control, 15, 303-306.
- Liu, J., Olsson, G., Mattiasson, B. (2004a) Short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process. Part I. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor. Biosens. Bioelectron., 20 (3) 562-570.
- Liu, J., Olsson, G., Mattiasson, B. (2004b) Short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process; Part II instrumentation of integrated flow injection analysis (FIA) system for BODst estimation. Biosens. Bioelectron., 20 (3) 571-578.
- Loaiza, Ó.A., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J.M. (2007) DNA sensor based on an *Escherichia coli* lac Z gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. Talanta, 73 (5) 838-844.
- Lukosz, W. (1991) Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity and immunosensing. Biosens. Bioelectron., 6, 215-225.
- Lukosz, W. (1995) Integrated optical chemical and direct biochemical sensors. Sensor. Actuat. B-Chem., 29, 37-50.
- Lukosz, W. (1995) Integrated optical chemical and direct biochemical sensors. In. Proceedings of the 2nd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. Sensor. Actuat. B-Chem., 29, (1-3) 37-50.
- Lukosz, W., & Tiefenthaler, K. (1983) Directional switching in planar waveguides effected by adsorption-desorption processes, 2nd European Conference on Integrated Optics, Florence, Italy, LEE Conference Publication No. 227, London, 152-155.
- Lukosz, W., Tiefenthaler, K. (1985) Embossing technique for fabricating integrated optical components in hard inorganic waveguiding materials. Opt. Lett., 8, 537-539.

M.I. Keané, M.Sc. Thesis, N. U. I. (1973)

- Maintz, L., Novak, N. (2007) Histamine and histamine intolerance. Am. J. Clin. Nutr., 85, 1185-1196.
- Maintz, L., Yu, C.F., Rodríguez, E., Baurecht, H., Bieber, T., Illig, T., Weidinger, S., Novak, N. (2011) Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. Allergy, 66, 893-902.
- 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. Eur. Food Res. Technol., 233 (6) 1041-1047.
- 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. Biosens. Bioelectron., 25, 1635-1639.
- Malmsten, M. (1994) Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces. J. Colloid Interface Sci., , 166, 333-342.
- Matveev, S.V. (1994) Controlled modification of the quartz surface by amino groups. Biosens. Bioelectron., 9, 333-336.
- Maupas, H., Saby, C., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Soldatkin, A., P., Charles, M-H., Delaire, T., Mandrand, B. (1996) Impedance analysis of Si/SiO₂ heterostructures grafted with antibodies an approach for immunosensor development., Electroanal. Chem., 406, 53-58.
- Meitz, J.L., Karmas, E. (1987) Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster,

and shrimp as an indicator of decomposition. J. AOAC, 61, 139-145.

- Melamed, S., Elad, T., Belkin, S. (2012) Microbial sensor cell arrays Review Article. Curr. Opin. Biotech., 23 (1) 2-8.
- Mikula, P., Blahova, J., Kruzikova, K., Havelkova, M., Nemethova, D., Hulak, M., Svobodova, Z. (2009) Effects of the herbicide LASSO MTX (alachlor 42% W/V) on biometric parameters and liver biomarkers in the common carp (*Cyprinus carpio*). Pestic. Biochem. Phys., 93, 13-17.
- Mirabi-Semnakolaii, A., Daneshgar, P., Akbar Moosavi-Movahedi, A., Rezayat, M., Norouzi, P., Nemati, A., Farhadi, M. (2011) Sensitive determination of herbicide trifluralin on the surface of copper nanowire electrochemical sensor. Solid State Electrochem., 15 (9) 1953-1961.
- Modrá, H., Svobodová, Z. (2009) Incidence of animal poisoning cases in the Czech Republic current situation. Interdisc. Toxicol., 2, 48-51.
- Monaci, L., Palmisano, F., (2004) Determination of ochratoxin A in foods state-of-the-art and analytical challenges. Anal. Bioanal. Chem., 378, 96-103.
- Moody, D.E., Narloch, B.A., Shull, L.R., Hammock, B.D. (1991) The effect of structurally divergent herbicides on mouse liver xenobiotic-metabolizing enzymes (P-450-dependent mono-oxygenases, epoxide hydrolases and glutathione S-transferases) and carnitine acetyltransferase. Toxicol. Lett., 59, 175-185.
- Moore, J.D., Perez-Pardo, M.A., Popplewell, J.F., Spencer, S.J., Ray, S., Swann, M.J., Shard, A.G., Jones, W., Hills, A., Bracewell, D.G. (2011) Chemical and biological characterisation of a sensor surface for bioprocess monitoring. Biosens. Bioelectron. 26, 2940-2947.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., Conte, L.S. (2005) A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. Food Chem., 89, 355-361.
- Móricz, Á.M., Fatér, Zs., Otta, K.H., Tyihák, E., Mincsovics, E. (2007) Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in red paprika. Microchem. J., 85, 140-144.
- Muhammad-Tahir Z., Alocilja, E.C. (2004) A disposable biosensor for pathogen detection in fresh produce samples. Biosyst. Eng., 88, 145-151.
- Muhammad-Tahir, Z., Alocilja, E.C. (2003) A conductometric biosensor for biosecurity. Biosens. Bioelectron., 18, 813-819.
- Müller, W.E.G., Boreiko, A., Schlossmacher, U., Wang, X., Tahirc, M.N., Tremel, W., Brandt, D., Kaandorp, J.A., Schröder, H.C. (2007a) Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge Suberites domuncula Relevance to biomineralization and the formation of biogenic silica. Biomaterials, 28, 4501-4511.
- Müller, W.E.G., Schröder, H.C., Lorenz, B., Krasko, A., (2007b) Silicatein-mediated synthesis of amorphous silicates and siloxanes and their uses. US Patent No. US 7,169,589 B2
- Nabok, A.V., Erokhin, V., Erokhina, S., Szekacs, A., Mustafa, M.K., Al-Ammar, R. (2013) Extraction of mycotoxins from aqueous solutions using functionalized polyelectrolytecoated microparticles. BioNanoSci., 3, 79-84.
- Nasir, M.S., Jolley, M.E. (2003) Fluorescence polarization (FP) assay for the determination of grain mycotoxins (fumonisins, DON vomitoxin and aflatoxins). Comb. Chem. High Throughput Screen. 6, 267-273.
- Nellen, P.M., Lukosz, W. (1990) Integrated optical input grating couplers as chemo- and immunosensors. Sensor. Actuat. B-Chem, 1, 592-596.
- Németh, E., Adányi, N., Halász, A., Váradi, M., Szendrő, I. (2007) Real-time study of the effect of different stress factors on lactic acid bacteria by electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy. Biomol. Eng., 24 (6) 631-637.
- Newton, I. (1704) Opticks Book 3, Qu. 29 (Printed for Sam. Smith and Benj. Walford, Printers to the Royal Society, at the Prince's Arms in St. Paul's Church-yard, London.
- Niazi, J.H., Lee, S.J., Kim, Y. S., Gu, M.B. (2008) SsDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. Bioorg. Med. Chem., 16, 1254-1261.

- Odaci, D., Timur, S., Telefoncu, A. (2008) Bacterial sensors based on chitosan matrices. Sensor. Actuat. B-Chem., 134, 89-94.
- Odaci, D., Timur, S., Telefoncu, A. (2009) A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. Bioelectrochemistry, 75, 77-82.
- Oh, B.K., Kim, Y.K., Lee, W., Baea, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W. (2003) Immunosensor for detection of Legionella pneumophila using surface plasmon resonance. Biosens. Bioelectron., 18, 605-611.
- Oh, B.K., Kim, Y.K., Park, K.W., Lee, W.H., Choi, J.W. (2004) Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. Biosens. Bioelectron., 19 (11) 1497-1504.
- Oshima, K., Nakajima, H., Takahashi, S., Kera, Y., Shimomura, M., Miyauchi, S. (2005) Quartz crystal microbalance assay for determination of plasma vitellogenin. Sensor. Actuat. B-Chem., 105, 473-478.
- Ouerghi, O., Touhami, A., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Ben Ouada, H., Cosnier, S. (2002) Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization. Bioelectrochemistry. 56 (1-2) 131-133.
- Papadopoulou-Bouraoui, A., Vrabcheva, T., Valzacchi, S., Stroka, J., Anklam, E. (2004) Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzymelinked immunosorbent assay. Food Addit. Contam., 21, 607-617.
- Papp, E., Horváth, R. (2011) OPTIKAI HULLÁMVEZETŐK <u>http//virag.elte.hu/kurti/owgm1.html</u> (2011.10.03.)
- Park, I.S., Kim, W.Y., Kim, N. (2000) Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting Salmonella spp. Biosens. Bioelectron., 15, 167-172.
- 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. Comp. Biochem. Phys. C, 123, 113-125.
- Patel, P.D. (2002) (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. TrAC Trends Anal. Chem., 21, 96-115.
- Pearce L.E.(1969) Activity test for cheese starter cultures. N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 4 (1969) 246-247.
- Peitzsch, M., Kiesel, B., Harms, H., Maskow, T. (2008) Real time analysis of *Escherichia coli* biofilms using calorimetry. Chem. Eng. Proc., 47, 1000-1006.
- Pellegrini, G.E., Carpico, G., Coni, E. (2004) Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. Anal. Chim. Acta, 520, 13-18.
- Pena, R., Alcaraz, M.C., Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M. (2002) Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A., 967, 303-314.
- Perry, C.C., Li, X. (1992) Structural studies of gel phases (3) A near-infrared spectroscopic study of silica and silica-titania gel glasses. In. Chemical Processing of Advanced Materials, (Hench, L.L., West, J.K., Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York. pp. 131-141.
- Peterson, I.R. (1990) Langmuir-Blodgett films. Review article. J. Phys. D Appl. Phys., 23, 379-395.
- Petrik P. (2011) Ellipszometria Nanoszerkezetek optikai vizsgálata http://www.termeszetvilaga.hu/otka/petrik.html
- Petryayeva, E., Krull, U.J. (2011) Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing A review. Anal. Chim. Acta, 706, 8-24.
- Philp, J.C., Balmand, S., Hajto, E., Bailey, M.J., Wiles, S., Whiteley, A.S., Lilley, A.K., Hajto, J., Dunbar, S.A. (2003) Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. Anal. Chim. Acta, 487, 61-74.

- Piacham, T., Josell, Å., Arwin, H., Prachayasittikul, V., Ye, L. (2005) Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. Anal. Chim. Acta 536, 1-2, 22, 191-196.
- Piehler, J., Brandenburg, A., Brech, A., Wagner, E., Gauglitz, G. (1997) Characterization of grating couplers for affinity-based pesticide sensing. Appl. Optics, 36 (25) 6554-6562.
- Pietrzyk, A., Suriyanarayanan, S., Kutner, W., Chitta, R., D'Souza, F. (2009) Selective histamine piezoelectric chemosensor using a recognition film of the molecularla imprinted polymer of bis(bithiophene) derivatives. Anal. Chem., 81, 2633-2643.
- Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadravec, M., Jaki, V., Vulić. A. (2012) Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. Food Control, 28 (1) 94-98.
- Plowman, T.E., Reichert, W.M., Peters, C.R., Wang, H.K., Christensen, D.A., Herron, J.N. (1996) Femtomolar sensitivity using a channel-etched thin film waveguide fluoroimmunosensor. Biosens. Bioelectron., 11, 149-160.
- Polzius, R., Schneider, Th., Bier, F.F., Bilitewski, U., Koschinski, W. (1996) Optimization of biosensing using grating couplers immobilization on tantalum oxide waveguides. Biosens. Bioelectron., 11, 503-514.
- Premkumar, J.R., Rosen, R., Belkin, S., Lev, O. (2002) Sol-gel luminescence biosensors Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. Anal. Chim. Acta, 462, 1-23.
- Prieto-Simón, B., Noguer, T., Campàs, M. (2007) Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. TrAC-Trend Anal., Chem., 26, 689-702.
- Radi, A.-E., Muñoz-Berbel, X., Lates, V., Marty, J.-L. (2009) Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A. Biosens Bioelectron., 24, 1888-1892.
- Ramos, A.J., Labernia, N., Marin, S., Sanchis, V., Magan, N., (1998) Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of Aspergillus ochraceus on a barley extract medium and on barley grains. Int. J. Food Microbiol., 44, 133-140.
- Ramsden, J., Németh-Sallai, M., Vörös, J., Szendrő, I. (1997) Integrált optikai hullámvezető szenzor felületi adszorpció vizsgálatára. Fizikai Szemle, XLVII. Évf. (9) 281-285.
- Ramsden, J.J. (2000) The specificity of biomolecular particle adhesion. Colloid. Surface. A Physicochemical and Engineering Aspects, 173 (1-3) 237-249.
- Ramsden, J.J., Li, S.Y., Heinzle, E., Prenosil, J.E. (1995) Optical method for measurement of number and shape of attached cells in real time. Cytometry, 19, 97-102.
- Ramsden, J.J., Schneider, P. (1993) Membrane insertion and antibody recognition of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein An optical study. Biochemistry, 32, 523-529.
- Rastogi, S., Kumar, A., Mehra, N.K., Makhijani, S.D., Manoharan, A., Gangal, V., Kumar, R. (2003) Development and characterization of a novel immobilized microbialmembrane for rapid determination of biochemical oxygen demandload in industrial waste-waters. Biosens. Bioelectron., 18 (1) 23-29.
- Rotariu, L., Bala, C., Magearu, V. (2002) Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode. Anal. Chim. Acta, 458, 215-222.
- Rotariu, L., Bala, C., Magearu, V. (2004) New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. Anal. Chim. Acta, 513, 119-123.
- Rousseau, D.M., Candlish, A.G., Slegers, A., van Peteghem, C.H., Stimson, W.H. (1987) Detection of ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay. Appl. Environ. Microb., 53, 514-518.
- Roy, S.K., Kundu, S.K. (1979) Chemically modified porous silica gel as a bioadsorbent and a biocatalyst. Anal. Biochem., 98, 238-241.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A. (2005) Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (Thunnus obesus) during bulk storage in controlled atmospheres. Food Chem., 89, 347-354.

- Russel, J.B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH anion accumulation versus in coupling. J. Appl. Bacteriol., 73, 363-370.
- Safina, G. (2012) Application of surface plasmon resonance for the detection of carbohydrates, glycoconjugates, and measurement of the carbohydrate-specific interactions: A comparison with conventional analytical techniques. A critical review. Anal. Chim. Acta, 712, 9-29.
- Saito, K., Horie, M., Nose, N., Nakagomi, K., Nakazawa, H., (1992) Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. Anal. Sci., 8, 675-680.
- Sauerbrey, G.Z. (1959) The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. Z. Phys. 155, 206-222.
- Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Alegret, S., Fàbregas, E. (1999) Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode. Biosens. Bioelectron., 14, 67-75.
- Scheller, F.W., Wollenberger, U., Warsinke, A., Lisdat, F. (2001) Research and development in biosensors, Current Opinion in Biotechnology, 12(1), 35-40.
- Schlatter, D., Barner, R., Fattinger, Ch., Huber, W., Hübscher, J., Hurst, J., Koller, H., Mangold, C., Müller, F. (1993) The difference interferometer application as a direct affinity sensor. Biosens. Bioelectron., 8, 109-116.
- Schlossmacher, U., Wiens, M., Schroeder, H.C., Wang, X.H., Jochum, K.P., Muller, W.E.G. (2011) Silintaphin-1-interaction with silicatein during structure-guiding bio-silica formation. FEBS J., 278, 1145-1155.
- Schollenberger, M., Müller, H.M., Rüfle, M., Suchy, S., Planck, S., Drochner, W (2005) Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. Int. J. Food Microbiol., 97, 317-326.
- Schwelberger, H.G. (2009) Histamine intolerance Overestimated or underestimated? Inflamm. Res., 58, 51-52.
- Scott, A.P., Katsiadaki, I., Witthames, P.R., Hylland, K., Davies, I.M., Mcintosh, A.D., Thain, J. (2006) Vitellogenin in the blood plasma of male cod (Gadhus morhua) A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? Mar. Environ. Res., 61, 149-170.
- Scott, A.P., Katsiadaki, I., Witthames, P.R., Hylland, K., Davies, I.M., Mcintosh, A.D., Thain, J. (2006) Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadhus morhua*) A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? Marine Environ. Res., 61, 149-170.
- Scott, E.A., Nichols, M.D., Cordova, L.H., George, B.J., Jun, Y., Elbert, D.L. (2008) Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. Biomaterials, 29, (34) 4481-4493.
- Serra, B., Gamella, M., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2008) Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. Anal. Bioanal. Chem., 391, 1853-1860.
- Serrar, D., Brebant, R., Bruneau, S., Denoyel, G.A. (1995) The development of monoclonal antibody based ELISA for the determination of histamine in food application to fishery products and comparison with the HPLC assay. Food Chem., 54, 85-91.
- Shalaby, A.R. (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int., 29, 675-690.
- Shapiro, E., Baneyx, F. (2007) Stress-activated bioluminescent Escherichia coli sensors for antimicrobial agents detection. J. Biotechn., 132, 487-493.
- Sherma, J. (2000) Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis A review. J. Chromatogr. A., 880, 129-147.
- Silva, E., Mascini, M., Centi, S., Turner, A.P.F. (2007) Detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) in milk using a disposable immunomagnetic electrochemical sensor Anal. Lett., 40 (7), 1371-1385.
- Simon-Sarkadi, L., Gelencsér, É., Vida, A. (2003) Immunoassay method for detection of histamine in foods. Acta Aliment., 32 (1) 89-93.

- Simon-Sarkadi, L., Kovács, A., Mincsovics, E. (1997) Determination of biogenic amines by personal OPLC. JPC-J. Planar Chromat., 10, 59-60.
- Šípová, H., Homola, J. (2013) Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. Anal. Chim. Acta, 773, 9-23.
- Sippy, N., Luxton, R., Lewis, R.J., Cowell, D.C. (2003) Rapid electrochemical detection and identification of catalase positive micro-organisms. Biosens. Bioelectron., 18, 741-749.
- Smulders, F.J.M., Barendsen, P., van Logtestijn, J.G., Mossel D.A.A, van de Marel G.M. (1986) Review Lactic acid consideration in favour of its acceptance as a meat decontaminant. J. Food Technol., 21, 419-436.
- Sohár, P.; Varga, I. (2003) In. Élelmiszerbiztonság és táplálkozásegészségügy. (Rodler, I., Ed.), OKK OÉTI, Budapest. pp. 215-227.
- Solé, M., Porte, C., Barceló, D. (2000) Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 alpha-ethynylestradiol. Arch. Environ. Con. Tox., 38, 494-500.
- Speijers, G.J.A., Speijers, M.H.M. (2004) Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicol. Lett., Trichothecenes with a special focus on DON. 153 (1) 91-98.
- Spiller, E., Schöll, A., Alexy, R., Kümmerer, K., Urban, G.A. (2006) A sensitive microsystem as biosensor for cell growth monitoring and antibiotic testing. Sensors and Actuators A 130–131, 312–321.
- Spinke, J., Oranth, N., Fattinger, Ch., Koller, H., Mangold, C., Voegelin, D. (1997) The bidiffractive grating coupler application to immunosensing. Sensor. Actuat. B-Chem., 38-39, 256-260.
- Stadler, B., Limacher, M., Li, N., Vörös, J. (2010) Photobleaching induced damage of biomolecules Streptavidin as 'bio'-photoresist. Surf. Sci., 604 (11-12) 898-905.
- Stroka, J., Anklam, E. (2002) New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. TrAC-Trend Anal. Chem., 21 (2) 90-95.
- Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E., Reutter, M. (2003) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B1 in cattle feed collaborative study. J. AOAC Int., 86, 1179-1186.
- Subramanian, A. (2006) A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E. coli* O157H7. Biosens. Bioelectron., 21 (7) 998-1006.
- Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher R. (2010) Application of an LC-MS/MS based multimycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. Food Chem., 119, 408-416.
- Sumi, M., Kawashima, Y., Fukumaki, T., Ishibashi, H., Arizono, K., Iguchi, T., Shimizu, M. (2007) Comparison of serum vitellogenin, steroid hormone, gonad histopathology and bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) of two rivers and a lake in Japan potential for endocrine disruption. Environ. Sci., 14, 41-54.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Persp., 103, 173-178.
- Suri, R.C., Raje, M., Mishra, G.C. (1994) Determination of immunoglobulin M concentration by piezoelectric crystal immunobiosensor coated with protamine. Biosens. Bioelectron., 9, 325-332.
- Suzzi, G., Gardini, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages a review. Int. J. Food Microbiol., 88, 41-54.
- Székács, A., Adányi, N., Székács, I., Majer-Baranyi, K., Szendrő, I. (2009) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring. Appl. Optics, 48 (4) 151-158.
- Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) Development of a nonlabeled immunosensor for the herbicide trifluralin via OWLS detection. Anal. Chim. Acta, 487, 31-42.

- Szendrő, I. (2001) Art and Practice to Emboss Gratings into Sol-Gel Waveguides. In. Proceedings of SPIE Vol. 4284, 80-87. Functional Integration of Opto-Electro-Mechanical Devices and Systems, (Descour, M.R., Rantala, J.T., Eds.), San Jose, CA. USA.
- Szendrő, I., Erdélyi, K., Fábián, M., Puskás, Z., Adányi, N., Somogyi, K. (2008) Combination of the optical waveguide lightmode spectroscopy method with electrochemical measurements. Thin Solid Films, 516 (22) 8165-8169.
- Szendrő, I., Erdélyi, K., Puskás, Z., Fábián, M., Adányi, N., Somogyi, K. (2012) Development and experiments with conductive oxide nanofilm coated planar waveguide sensors. Nanopages, 7, (1) 17-24.
- Telegdi, J., Shaban, A., Beczner, J., Keresztes, Zs., Kálmán, E. (1998) Biofilm Formation Controlled by Quartz Crystal Nanobalance. Materials Science Forum 289-292, 77-82.
- Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (1999) Electrochemical Biosensors Recommended Definitions and Classification - IUPAC Report. Pure Appl. Chem., 71 (12) 2333-2348.
- Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., van der Lelie, D. (2001) A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. Environ. Pollut., 113, 19-26.
- Tiefenthaler, K. (1992) Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors. Advances in Biosensors, 2, 261-289.
- Tiefenthaler, K., Lukosz, W., (1989). Optical sensor for selective detection of substances and/or for the detection of refractive index changes in gaseous, liquid, solid and porous samples. US Patent No. 4,815,843
- Timur, S., Anik, U., Odaci, D., Gorton L. (2007) Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. Electrochem. Commun., 9 (7) 1810-1815.
- Timur, S., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A. (2003) Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on Pseudomonas putida. Talanta, 61 (2) 87-93.
- Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop, A., Frank, J.M. (2010)
- Climate change and food safety: A review. Food Res. Int., 43, 1745-1765.
- Tlili, S., Jebali, J., Banni, M., Haouas, Z., Mlayah, A., Helal, A.N., Boussetta, N. (2010) Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites. Environ. Monit. Assess., 168, 285-298.
- Tommasi De, E., Stefano De, L., Rea, I., Di Sarno, V., , Rotiroti, L., Arcari, P., Lamberti, A., Sanges, C., Rendina, I. (2008) Porous Silicon Based Resonant Mirrors for Biochemical Sensing. Sensors, 8(10), 6549-6556.
- Tóth, K., Nagy, G., Lan, B.T.T., Jeney, J., Choquette, S.J. (1997) Planar waveguide ion-selective sensors. Anal. Chim. Acta, 353, 1-10.
- Tothill, I.E. (2009) Biosensors for cancer markers diagnosis. Semin. Cell Dev. Biol., 20 (1) A Special Edition on Biosensors and Development of Pigment Cells and Pigment Patterns, 55-62.
- Tőzsér, J., Emri, T., Csősz, É., Tőzsér, J. (2011) Fehérjebiotechnológia. (Tőzsér, J., Ed.), Debreceni Egyetem, Debrecen
- Traore, S., Aaron, J.J. (1989) Analysis of trifluralin and other dinitroaniline herbicide residues by zero-order and derivative ultraviolet spectrophotometry, Analyst, 114, 609-613.
- Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2001) Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications. FRESENIUS J. Anal. Chem., 371 (1) 21-24.
- Tsai, Y.H., Kung, H.F., Lin, Q.L., Hwang, J.H., Cheng, S.H., Wei, C.I., Hwang, D.F. (2005) Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. Food Chem., 90, 635-641.
- Tsargorodskaya, A., Nabok, A.V., Ray, A.K. (2004) Ellipsometric study of the adsorption of bovine serum albumin into porous silicon. Nanotechnology, 15, 703-709.
- Tuantranont, A., Wisitsora-at, A., Sritongkham P., Jaruwongrungsee, K. (2011) A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review. Anal. Chim. Acta, 687, 114-128.

- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins A review. Anal. Chim. Acta, 632, 168-180.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawauchi, H., Swanson, P., (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes. Gen. Comp. Endocr., 84 (2) 291-299.
- Van Veld, P.A., Rutan, B.J., 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. Environ. Toxicol. Chem., 24, 3048-3052.
- Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. (2001) Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. Enzyme Microb. Tech., 29, 635-638.
- Veciana-Nogues, M.T., Hernandez-Jover, T., Marine-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (1995) Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. J. AOAC, 78, 1045-1050.
- Vianello, F., Signor, L., Pizzariello, A., Di Paolo, M.L., Scarpa, M., Hock, B., Giersch, T., Rigo, A. (1998) Continuous flow immunosensor for atrazine detection. Biosens. Bioelectron., 13 (1) 45-53.
- 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. Mar. Biotech., 3, 561-571.
- 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.
- Vörös, J. (1999) Integrált optikai hullámvezető szenzor alkalmazása a bioanyagkutatásban. Doktori értekezés, ELTE Biológiai Fizika Tanszék
- 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.
- Wang, J-H., Ruddock, L.W., Cass, A.E.G. (1994) Microscopic investigations of the interaction of proteins with surfaces. Biosens. Bioelectron., 9, 647-655.
- Washa, J.W, Debroy, C., Irudayaraj, J. (2006) Rapid detection of Salmonella enteritidis and Escherichia coli using surface plasmon resonance biosensor. J. Food Proc. Eng., 29 (4) 373-385.
- Watts, H.J., Lowe, C.R., Pollard-Knight, D.V. (1994) Optical biosensor for monitoring microbial cells. Anal. Chem., 66, 2465-2470.
- Watts, H.J., Yeung, D., Parkes, H. (1995) Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor. Anal. Chem., 67, 4283-4289.
- Weetall, H.H. (1993) Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. Appl. Biochem. Biotechn., 41, 157-188.
- Weetall, H.H., Filbert, A.M. (1974) Porous glass for affinity chromatography applications. Method. Enzym., 34, 59-72.
- Wen, X., Fei, J., Chen, X., Yi, L., Ge, F., Huan, M. (2008) Electrochemical analysis of trifluralin using a nanostructuring electrode with multi-walled carbon nanotubes. Environ. Pollut., 156, 1015-1020.
- Wex, H., Rawson, D.M., Zhang, T. (2006) Use of biosensor and impedance spectroscopy assays to investigate the influence of temperature on *E. coli* sensitivity to 3,5-dichlorophenol. Electrochim. Acta, 51, 5157-5162.
- 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. Toxicol. Mech. Method., 15, 293-306.
- Whitaker, T.B. (2003) Detecting mycotoxins in agricultural commodities. Mol. Biotechnol., 23, 61-71.
- Wijaya, E., Lenaerts, C., Maricot, S., Hastanin, J., Habraken, S., Vilcot, J.-P., Boukherroub, R., Szunerits, S. (2011) Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. Curr. Opin. Solid St. M. Sci., 15, 208-224.

- Wilchek, M., Bayer, E.A. (1988) The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. Anal. Biochem., 171, 1-32.
- Williams, R.A., Blanch, H.W. (1994) Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. Biosens. Bioelectron., 9, 159-167.
- 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. Anal. Lett., 22 (4) 803-816.
- Wong, Y.Y., Ng, S.P., Ng, M.H., Si, S.H., Yao, S.Z., Fung, Y.S. (2002) Immunosensor for the differentiation and detection of Salmonella species based on a quartz crystal microbalance. Biosens. Bioelectron., 17, 676-684.
- Wood, S.J. (1993) DNA-DNA hybridization in real time using BIAcore. Microchem. J., 47, 330-337.
- Xiao, H., Clarke, J.R., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. (1995) Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays. J. Agric. Food Chem., 43 (8) 2092-2097.
- Xiao, S.J., Textor, M., Spencer, N.D., Sigrist, H. (1998) Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. Langmuir, 14, 5507-5516.
- Xiao, S.J., Textor, M., Spencer, N.D., Wieland, M., Keller, B., Sigrist, H. (1997) Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. J. Mater. Sci., Materials in Medicine, 8, 867-872.
- Yakovleva, J., Davidsson, R., Lobanova, A., Bengtsson, M., Eremin, S., Laurell, T., Emnéus, J. (2002) Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. Anal. Chem., 74 (13) 2994-3004.
- Yakovleva, M.E., Moran, A.P., Safina, G.R., Wadström, T., Danielsson, B. (2011) Lectin typing of Campylobacter jejuni using a novel quartz crystal microbalance technique. Anal. Chim. Acta, 694, 1-5.
- Yang, H., Li, H., Jiang, X. (2008) Detection of foodborne pathogens using bioconjugated nanomaterials. Microfluid Nanofluid. 5, 571-583.
- Ye, J., Letcher, S.V., Rand, A.G. (1997) Piezoelectric biosensor for detection of Salmonella typhimurium. J. Food Sci., 62, 1067-1071.
- Yoldas, BE. (1980) Formation of titania-silica glasses by low temperature chemical polymerization. J. Non-Cryst. Solids, 38/39, 81-86.
- Yuan, J., Deng, D., Lauren, D.R., Aguilar, M.I., Wu, Y. (2009) Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages. Anal. Chim. Acta, 656, 63-71.
- Yulaev, M.F., Sitdikov, R.A., Dmitrieva, N.M., Yazynina, E.V., Zherdev, A.V., Dzantiev B.B. (2001) Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing. Sensor. Actuat. B-Chem., 75, 129-135.
- Zaman, M.Z., Abdulamir, A.S., Bakar, F.A., Selamat, J., Bakar, J. (2009) A review Micobiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. Am. J. Appl. Sci., 6, 1199-1211.