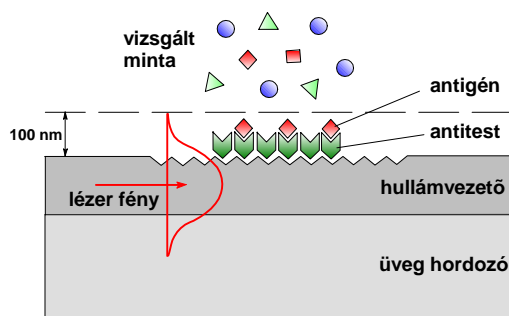


A pályázat keretében olyan immunszenzor kifejlesztését tűztük ki célul, amely az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) alkalmazásával lehetőséget nyújt penészgombák által termelt toxinok kimutatására. Az új mérés technika biztosítja az egészségre ártalmas mérgező anyagok gyors, szelektív, jelölésmentes meghatározását.

Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) ismertetése

Az OWLS olyan szenzortechnika, amely kiválóan alkalmas az optikai hullámvezető felületén, mint határfelületen molekuláris szinten végbemenő affinitáson alapuló folyamatok valósidejű, jelölésmentes vizsgálatára. Az optikai hullámvezetés jelenségét felhasználó technika alkalmazásának alapja egy integrált optikai hullámvezető szenzor, röviden chip, amely két eltérő törésmutatójú rétegből áll. A felső vékony (160-200 nm) hullámvezető rétegben finom (2400-3600 osztás/mm sűrűségű) optikai rács kerül kialakításra.

Az OWLS technikánál az optikai rács segítségével lineárisan polarizált (632,8 nm hullámhosszúságú He-Ne) lézer fényt csatolnak be a vékony hullámvezető rétegbe. A becsatolás egy pontosan definiált beesési szögnél lejátszódó rezonancia jelenség, amely függ a hullámvezető, valamint a hullámvezető felületén lévő anyag törésmutatójától. A becsatolt fény a hullámvezetőben irányított fényterjedéssel, teljes visszaverődések sorozatával terjed, és a hullámvezető réteg végén elhelyezett fotódiókkal detektálható. A fény beesési szögének folyamatos változtatásával egy ún. intenzitás spektrum vehető fel, amely a hullámvezetőbe becsatolt fény intenzitását mutatja a beesési szög függvényében. A becsatolási szögek nagy pontossággal mérhetők, így belőlük a megkötődött molekulák rétegvastagsága, tömege, a felület borítottsága (ng fehérje/cm² dimenzió) nagy érzékenységgel számítható. A hullámvezető felületén megfelelően funkcionális rétegeket kialakítva a mérendő immunanyagra érzékeny molekulapár rögzítésével biztosítható a szenzor nagyfokú specifitása (1. ábra).



1. ábra OWLS mérés immunanalitikai alkalmazása

Szenzorok előkészítése a biomolekulák rögzítésére

Korábbi kutatásaink során az OWLS technikához alkalmazott szenzor felszínét amino- és epoxi-csoportokkal módosítottuk, hogy az immunreakcióhoz szükséges biológiai molekulát rögzíthessük. Jelen munkánk első feladatául karboxil-csoportokat tartalmazó chip felületén történő rögzítés lehetőségét vizsgáltuk, összehasonlítva a karboxi-szilán illetve a karboxi-metil-dextrán réteget hordozó szenzorokkal mért eredményeket.

Az amino-csoportokat hordozó szenzor felületen szukcinanhidrides kezeléssel alakítottunk ki karboxil-csoportokat, majd a fehérje típusú molekulákat EDC/NHS alkalmazásával rögzítettük. A kialakított rétegeket ill. a rögzítési eljárásokat antitest-antigén modell-molekulapárral (marha szérum albumin, BSA - anti-BSA IgG antitest) vizsgáltuk a stabilitás és rögzítési kapacitás megállapítása céljából. Vizsgálatainkhoz a szenzort FIA (Flow Injection Analyzer) rendszerbe csatlakoztattuk.

A modell vegyületekkel mért jelek a 0,5%-os vizes oldat alkalmazásakor voltak a legstabilabbak a többszörös injektálás után is. A kezelés időtartamának vizsgálata során megállapítottuk, hogy 1 óra szükséges a stabil réteg kialakulásához. Ezt követően a szárítást 75°C-on 15 percig végeztük. A karboxilálás után szárított chipet légmentesen lezárva tároltuk, 48 és 96 óra után vizsgálva nem tapasztaltunk jelentős csökkenést a jelekben, tehát az előkészített szenzorok néhány napig tárolhatók.

Immobilizálási kísérleteink során vizsgáltuk az alkalmazott reagensek koncentrációjának (0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 1 M EDC, illetve NHS), és a kezelés időtartamának hatását. Vizsgálatainkat közvetlenül az átfolyó küvetében, illetve inkubációs küvetében rácseppentve is elvégeztük. Kísérleteink során a legstabilabb jeleket a 0,5 M EDC és 0,5 M NHS 1:1 arányú keverékének alkalmazásakor kaptuk. A reakciót célszerű volt az inkubációs küvetében végezni, mivel így 15 perc reakcióidő után kaptunk stabil jeleket.

A karboxil-csoportokkal módosított szenzor vizsgálata után háromdimenziós karboximetil-dextrán (CMD) mátrixot hordozó szenzorokat vizsgáltunk. Két eltérő dextrán réteget tartalmazó szenzorral végeztük a kísérleteket, az első pórusaiba kb. 60 kD méretű molekula fér be, a másodikon kialakított pórusok kisebbek, kb. 6 kD méretűek.

A méréseket mind az antitest, mind pedig az antigén rögzítésével elvégeztük. Ha a BSA antigént rögzítettük a szenzor felületén, akkor a nagyobb pórusú rétegben lényegesen több molekula rögzült, ugyanakkor a mérendő antitestre ezzel a szenzorral kaptuk a legkisebb jeleket, feltehetően a sztérikus hatások miatt. A legnagyobb szenzor válaszokat a kétdimenziós szenzorral kaptuk. Feltételezésünk szerint a kisebb pórusméretű dextrán rétegnél is csak a felszínen rögzíthető a BSA molekula, nem érvényesül a térszerkezet előnye. Az anti-BSA rögzítésekor azonban mind az immobilizáláskor, mind pedig az antigén mérésekor a kisebb pórusú dextrán rétegen kaptuk a legnagyobb jeleket, feltehetően azért, mert a réteg térszerkezete miatt több antitest kötődött, mint a kétdimenziós szenzoron, és a rögzített antitest molekulákat az antigén is akadálytalanul elérte.

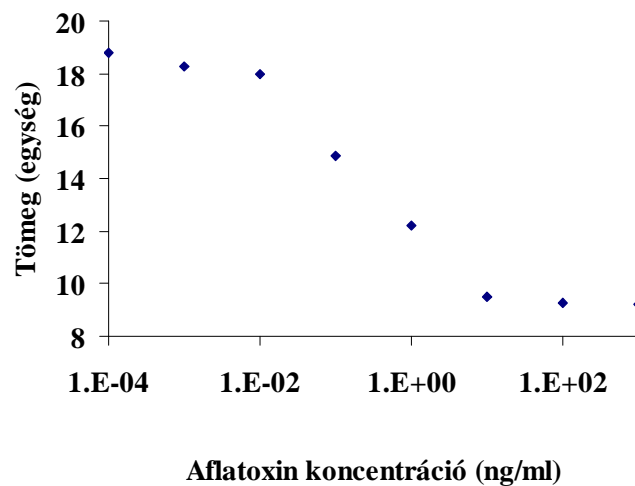
Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a karboxil-csoportokat hordozó szenzorokon megfelelően rögzíthetőek a méréshez szükséges biomolekulák. A direkt immunreakciók méréséhez a kisebb pórusú dextrán réteg a legmegfelelőbb, az indirekt mérésekhez azonban a kétdimenziós szenzor az alkalmas a sztérikus hatások miatt.

Aflatoxin mérésére alkalmas immunszenzor kifejlesztése

Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) alkalmazásával immunszenzorokat fejlesztettünk ki penészgombák által termelt toxinok jelölésmentes kimutatására. A módosított felületű szenzorokra alapozva eljárást dolgoztunk ki az *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxin B1 toxin kompetitív és nem kompetitív immunanalitikai kimutatására. Méréseinkhez poliklonális antitestet (Sigma) alkalmaztunk. A nem-kompetitív (direkt) szenzor esetében a toxin detektálására a mérendő aflatoxin B1-re specifikus antitestet rögzítettük. Az aflatoxin a rögzített antitest molekulákhoz kötődve, közvetlenül detektálható. A lineáris méréstartomány 0,1-10 µg/ml, a kimutatási határ 0,05 µg/ml volt. Mivel a mérendő aflatoxin B1 molekula tömege igen kicsi (312,3 D) a rögzített antitest méretéhez képest (kb.180 kD), a mért jel pedig a tömegváltozással arányos, ezért a mérés érzékenysége nem megfelelő.

A kimutatási határ jelentős csökkentése érdekében munkánk következő lépéseként kompetitív eljárást dolgoztunk ki. Ebben az esetben a hullámvezető felületén a kimutatandó aflatoxin B1 molekula BSA-val képzett konjugátumát rögzítettük ugyancsak a korábban ismert EDC/NHS eljárással. A mérés során a toxint tartalmazó standardokat, ill. mintákat ismert mennyiségű antitestet tartalmazó szérummal kevertük össze, és rövid inkubálási idő után mértük. A szabadon maradt szérum antitest molekulák kapcsolódtak a szenzor felületén kötött

antigén-konjugátummal, lényegesen nagyobb tömegváltozást előidézve, mint a direkt mérés esetében. A jel fordítottan arányos a mintákban levő toxin koncentrációjával. Az 5 µg/ml aflatoxin-BSA konjugátum rögzítésével kellően nagy jeleket kaptunk, a szenzor stabilitása is megfelelő volt. Méréseinkhez 500x és 1000x hígított szérum alkalmazását találtuk megfelelőnek. Az optimalizált paramétereket alkalmazva 0,01-10 ng/ml tartományban kapunk lineáris válaszjeleket (2. ábra), a kimutatási határ 0,02 ng/ml-nek adódott. Ez a méréstartomány alacsonyabb, mint a referencia eljárásnak tekinthető ELISA eljárás esetében (1-25 ng/ml) közölt érték.



2. ábra Aflatoxin mérés kalibrációs görbéje

Ochratoxin mérésére alkalmas immunszenzor kifejlesztése

A *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó gombafajok által termelt mikotoxin, az ochratoxin A meghatározására is immunszenzoros kimutatási eljárást dolgoztunk ki. Az ochratoxin jelenlétét főleg gabonában, gabonatermékekben, hüvelyesekben, kávéban, sörben, szőlőlében, mazsolában, borban, kakaóban, mogyorófélékben, és fűszerekben mutatták ki.

A nem-kompetitív (direkt) szenzor esetében a toxin detektálására a mérendő ochratoxin A-ra specifikus antitestet rögzítettük a karboxil-csoportokat hordozó OWLS szenzor felületén EDC/NHS alkalmazásával. Az ochratoxin a rögzített antitest molekulákhoz kötődve, közvetlenül detektálható. Vizsgáltuk a rögzítésnél alkalmazott antitest koncentrációjának hatását, és megállapítottuk, hogy a 2,5 µg/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, a kimutatási határ 5 ng/ml volt.

Munkánk következő lépéseként kompetitív eljárást dolgoztunk ki a kimutatási határ jelentős csökkentése érdekében. Ebben az esetben a szenzor felületén a kimutatandó ochratoxin A molekula BSA-val képzett konjugátumát rögzítettük ugyancsak a korábban ismertetett EDC/NHS eljárással. Vizsgáltuk az ochratoxin -BSA konjugátum koncentrációjának hatását a rögzítés során és megállapítottuk, hogy ebben az esetben 10 µg/ml konjugátum rögzítésével kaptunk kellően nagy jeleket, a szenzor stabilitása is megfelelő volt. Méréseinkhez 1,0 µg/ml és 2,5 µg/ml hígított szérum alkalmazását találtuk megfelelőnek. Az antigént 0,001-1000 ng/ml koncentrációtartományban vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy az optimalizált paramétereket alkalmazva 0,5-10 ng/ml tartományban kapunk lineáris válaszjeleket, a kimutatási határ 0,1 ng/ml-nek adódott. 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.

Minta előkészítés, valós minták mérése

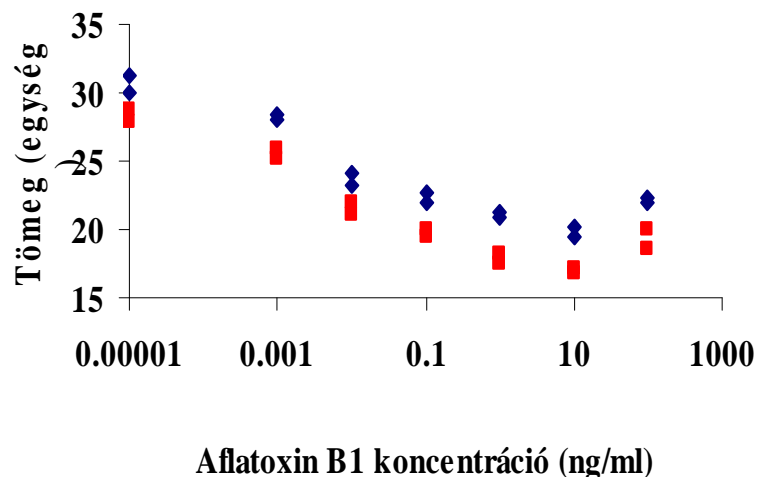
A valós minták vizsgálata során elsősorban a minták előkészítésének egyszerűsítését kellett vizsgálni. A mátrixhatás kiküszöbölésére a toxin standardokat igazoltan tiszta mintába spikolva készítettünk kalibrációs görbét. A minta előkészítése során vizsgáltuk a toxinok megfelelő kioldásának érdekében a metanol, illetve acetonitril alkalmazásának lehetőségét is.

A mintákat Labmill típusú darálóval 1/60 szitaméretet alkalmazva ledaráltuk, majd az így kapott őrleményeket különböző mennyiségű toxinnal spikoltuk (0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100ng/g). Az így kapott különböző toxintartalmú homogenizált mintákhoz 10 ml acetonitril-víz 6:4 arányú keverékéből, illetve metanol-víz 8:2 arányú keverékéből álló oldószert adagoltunk. A mintákat 10 percig folyamatosan kevertettük majd hagytuk leülepedni és a felülúszót Millipore Ultrafree-MC 50000 NMWL szűrőt tartalmazó Eppendorf cső felhasználásával 10000 rpm-val 10 percig centrifugáltuk.

Közvetlenül a mérés előtt a mintákat Tris pufferrel hígítottuk és vizsgáltuk, hogy a különböző típusú minták esetében milyen hígítás alkalmazásával kapunk megfelelően értékelhető jeleket. Mérési eredményeink alapján az acetonitril-víz eleggyel készített kivonat volt a vizsgálatokhoz alkalmas, a továbbiakban ezt alkalmaztuk.

Aflatoxin meghatározása gabonákból

Búza és árpa mintából kalibrációs sort készítettünk, és ennek segítségével mértük különböző minták aflatoxin tartalmát. Az eredményeket ELISA módszerrel ellenőriztük. Az 3. ábrán a búza mintával készített kalibráció görbét mutatjuk be. Az 1. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy az ELISA-val és az immunszenzorral mért eredmények jól megfelelnek egymásnak, a szenzor alkalmas gabonák aflatoxin szennyezettségének meghatározására.



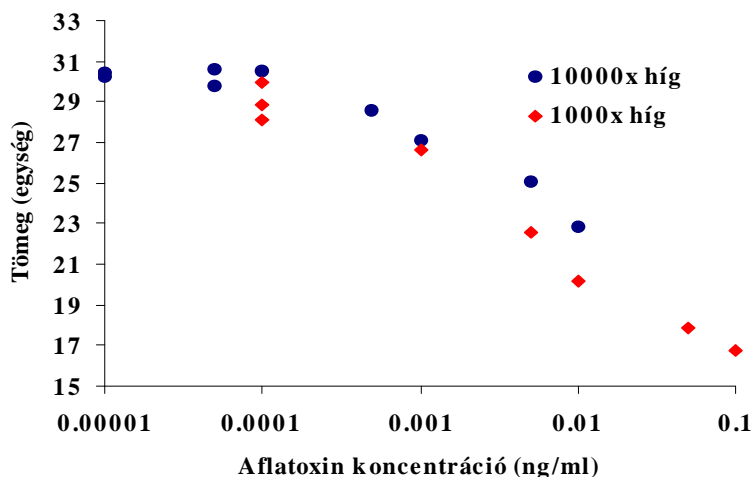
3. ábra Aflatoxin mérés kalibrációs görbéje búza mintán (eredeti koncentráció, mérés során 1000x hígítva)

Minta	Aflatoxin B1 konc. µg/kg	ELISA µg/kg	OWLS immunszenzor µg/kg
Búza 1	2,20	2,40	2,29
Búza 2	5,50	5,30	6,53
Búza 3	0,55	0,30	0,58
Búza 4	1,10	1,20	3,42
Árpa 1	1,80	1,60	1,26
Árpa 2	4,50	4,20	3,08
Árpa 3	0,45	0,51	0,54
Árpa 4	0,90	0,84	0,84

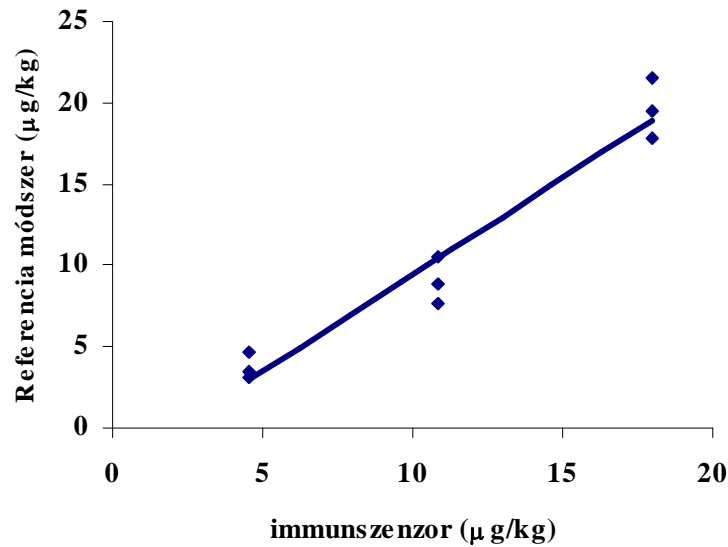
1. táblázat Gabonaminták aflatoxin tartalmának vizsgálata

Aflatoxin meghatározása fűszerekből

Fűszer paprika és bors minták aflatoxin tartalmát is meghatároztuk a kutatásunk során. A mátrixhatás kiküszöbölésére az aflatoxin standardokat ismét igazoltan tiszta mintába spikolva készítettünk kalibrációs görbét (4. ábra). Különböző arányban hígított minták vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az 1000x hígított mintákkal nagyobb jelkülönbséget tudtunk elérni a megfelelő méréstartományban, ezért a továbbiakban a vizsgálandó paprikamintákat ennek megfelelően készítettük elő. Az ismeretlen mintákra kapott eredményeinket referencia mérésekkel hasonlítottuk össze, és igazoltuk, hogy az OWLS alapú immunszenzorral megfelelően tudtuk meghatározni a paprikaminták aflatoxin tartalmát (5. ábra).

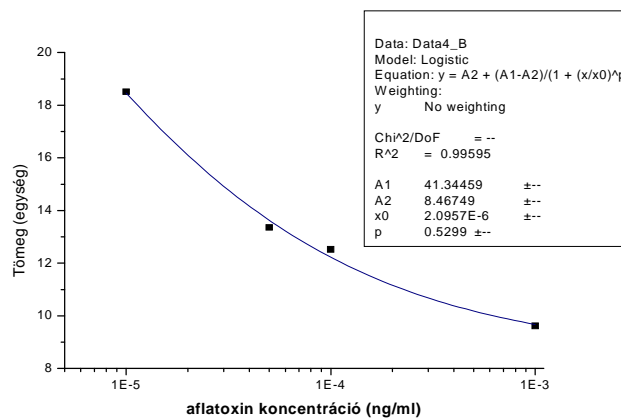


4. ábra Spikolt paprikaminták mérése indirekt immunszenzorral



5. ábra Paprikaminták aflatoxin koncentrációjának összehasonlítása referencia módszerrel és immunszenzorról meghatározva

Három különböző gyártótól származó kereskedelmi forgalomban kapható borsot vizsgáltunk, amelyeket különböző mennyiségű aflatoxinnal spikoltunk (HR, PR, HA). A HR minta felhasználásával (ellenőrzött minta) kalibrációs sort készítettünk, a másik két fajtát pedig visszamérésre használtuk. A spikolt borsmintákat 1000x és 10000x hígításban vizsgáltuk és összehasonlítottuk az egyes minták által adott válaszjelek nagyságát. Az 1000x hígítás töménynek bizonyult, ez a görbék alakján is jól megfigyelhető volt, ugyanakkor a 10000x hígítást alkalmazva a válaszjelek nagysága kisebb, de az egyes koncentrációk jobban elkülönülnek egymástól (6. ábra).

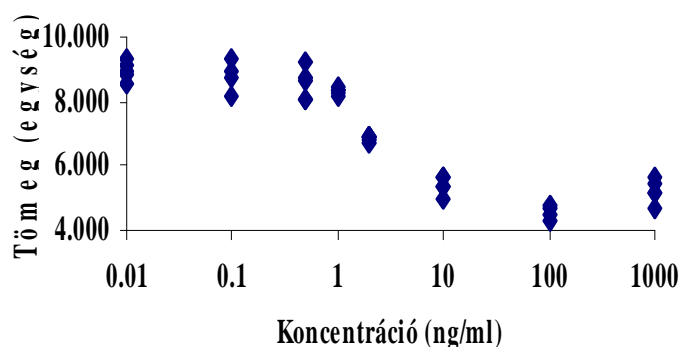


6. ábra 10000x hígított borssal felvett kalibráció

A mérések alapján a különböző gyártótól származó borsmintákkal is megfelelő eredményeket tudunk elérni, a spikolt mintákat a kalibrációval vissza lehetett számolni, az eredményeket nem befolyásolta a származási hely.

Ochratoxin meghatározása gabonákból

Búza és árpa mintából a korábbiakkal azonos módon kalibrációs sort készítettünk, és ennek segítségével mértük különböző minták ochratoxin tartalmát. Az eredményeket ismét ELISA módszerrel ellenőriztük. A 7. ábrán a búza mintával készített kalibrációs görbét mutatjuk be. Az 2. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy az ELISA-val és az immunszenzorral mért eredmények jól megfelelnek egymásnak, a szenzor alkalmas gabonák ochratoxin szennyezettségének meghatározására.



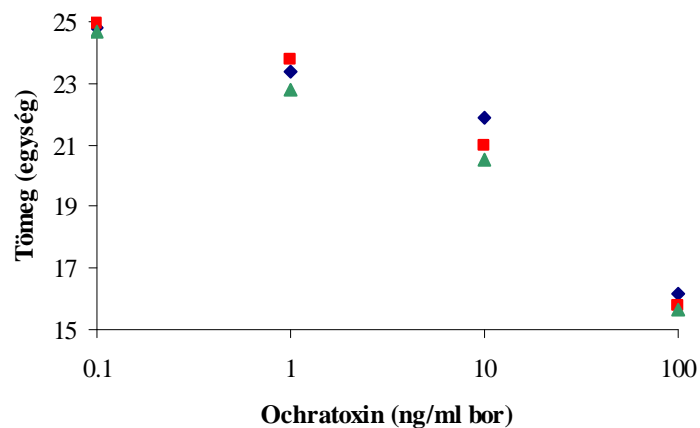
7. ábra Ochratoxin mérés kalibrációs görbéje búza mintán (eredeti koncentráció, mérés során 1000x hígítva)

Minta	Ochratoxin A konc. $\mu\text{g}/\text{kg}$	ELISA $\mu\text{g}/\text{kg}$	OWLS immunszenzor $\mu\text{g}/\text{kg}$
Búza 1	2,0	1,80	0,99
Búza 2	5,0	5,2	3,64
Búza 3	1,0	0,9	1,15
Búza 4	10,0	9,4	8,39
Árpa 1	5,0	4,7	2,99
Árpa 2	1,0	0,8	1,37
Árpa 3	2,0	1,8	1,51

2. táblázat Gabonaminták ochratoxin tartalmának vizsgálata

Borminták ochratoxin tartalma

Vörösbor minták esetleges ochratoxin tartalmának mérésére is készítettünk kalibrációs görbét borba spikolt ochratoxin standardokkal. A 8. ábra a kalibrációs görbét mutatja be, aminek alapján borok ochratoxin tartalmát vizsgáltuk. Eredményeink alapján a borokban levő ochratoxin szennyezés gyors kimutatására is alkalmas az eljárás.



8. ábra Ochratoxin A meghatározása borban

Összefoglalás

Kutatásunk során sikeresen módosítottuk az OWLS szenzor felszínét úgy, hogy biomolekulák rögzítésére alkalmas csoportokat hordozzon, kidolgoztuk a rögzítési eljárást. Aflatoxin és ochratoxin kimutatására alkalmas immunszenzort fejlesztettünk ki, amely nagyobb érzékenységgel, mint a referencia eljárásként szolgáló ELISA eljárás. Különböző élelmiszerek és alapanyagok vizsgálatával igazoltuk a kifejlesztett eljárások alkalmasságát valós minták meghatározására. A munka során az eredményeket tudományos cikkekben, előadásokon ismertettük, PhD dolgozat is készül belőle.