

**ZAKLJUČNO POROČILO**  
**O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA**  
**NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA**  
**PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«**

**I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta**

1. Naziv težišča v okviru CRP:

5.3.1 Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja/ Trajnostno kmetijstvo, gozdarstvo in varna hrana/ posebni proizvodi in podpora sledljivosti

2. Šifra projekta:

V4-0315

3. Naslov projekta:

Razvoj biomarkerjev in multifunkcionalnega biosenzorja za sledenje virov kontaminacije v živilstvu

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Razvoj biomarkerjev in multifunkcionalnega biosenzorja za sledenje virov kontaminacije v živilstvu

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Development of biomarkers and a multifunctional biosensor for detection of contaminants in food

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Listeria, Campylobacter, biomarker, površinska plazmonska resonanca, biosenzor

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Listeria, Campylobacter, Biomarker, Surface Plasmon Resonance, biosensor

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

1027/ Institut za varovanje zdravja RS, Ljubljana

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

07030

Sonja Smole Možina

Datum: 10.10.2008

Prof. dr. Andreja Kocijančič  
rektorica

Podpis vodje projekta:

Prof. dr. Sonja Smole Možina

*Sonja Smole*



Podpis in žig izvajalca:

Po pooblastilu:  
prof. dr. Franc Štampar  
DEKAN

*[Signature]*

**Naslov projekta: Razvoj biomarkerjev in multifunkcionalnega biosenzorja za sledenje virov kontaminacije v živilstvu (V4-0315)**

**Povzetek:**

Cilja projekta sta bila analiza tarčnih sekvenc in razvoj molekularnih markerjev za odkrivanje kontaminacije z mikroorganizmi ali njihovimi produkti ter razvoj detektorja na osnovi tehnologije resonance površinskih plazmonov (SPR) za hkratno izvedbo preiskave prisotnosti različnih kontaminantov v preiskovanih vzorcih. V okviru analize molekularno genetskih markerjev smo preučevali in razširili znanje o različnih tarčnih zaporedjih bakterijskih rodov *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus* in *Yersinia*, bodisi genov, povezanih s patogenostjo (npr. gena *femB* *S. aureus* ali gena *ail* *Y. enterocolitica*), ali z bakterijsko odpornostjo (npr. mutacije genov antibiotične odpornosti in efluksa pri bakterijah *Campylobacter*). Delo je potekalo v sodelovanju BF in IVZ in omogoča boljše izkoriščenost obstoječe opreme za molekularno diagnostiko obeh RO. Drugi del projekta je vključeval razvoj novega multifunkcionalnega SPR biosenzorja za detekcijo več analitov (mikotoksinov) v tekočih vzorcih (voda, živila). Izdelan je bil aparat, ki omogoča merjenje več (10) biomolekularnih interakcij sočasno, obdelavo in shranjevanje meritev v uporabniku prijaznem programskem okolju, s spodnjo mejo detekcije (LOD)  $1 \cdot 10^{-5}$  spremembe lomnega količnika tekočega medija. Izdelane so bile tudi tehnične rešitve za pripravo kompleksnih detekcijskih površin – mikrotekočinski sistem za mestno specifično uvajanje imobilizacijskih reagentov in vzorcev na SPR detekcijsko površino. Vzporedno so bile izvedene raziskave in optimizacije metode detekcije mikotoksinov na principu imunološkega testa na komercialnem SPR sistemu.

**Title of the project: Development of biomarkers and a multifunctional biosensor for detection of contaminants in food (V4-0315)**

**Abstract:**

The aim of the project was the analysis of target sequences for a development of the appropriate molecular markers for detection of microbial contaminants or their products and also a development of a biosensor on the basis of surface plasmon resonance technology (SPR) for simultaneous detection of different contaminants in food or other environmental samples. In the frame of studies of molecular-genetic markers we included and improved the knowledge about different target sequences of bacterial food-borne pathogens *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus* and *Yersinia*. The genes involved in pathogenicity (i.e. *femB* in *S. aureus* or *ail* in *Y. enterocolitica*), as well as the genes involved in bacterial resistance (antibiotic resistance and efflux in *Campylobacter*) were included. A cooperation of both involved RO was established and enable better applicability of current equipment for microbial molecular diagnostics (PCR and Real-time PCR cyclers) in both institutions (research and analytical laboratories). The second part of the project included a development of a new SPR biosensor configuration for detection of multiple analytes (mycotoxins) in liquid samples (water, food products and others). A new SPR detector was built for simultaneous detection of up to 10 biomolecular interactions, with signal processing and storage userfriendly software and limit of detection  $1 \cdot 10^{-5}$  refractive index change in liquid media. Technical solutions were made for preparation of complex detection surfaces – a microfluidic system for site-specific introduction of immobilization reagents and samples on SPR detection surfaces. In addition research and optimization of methods for detection of mycotoxins based on immunoassay principle was done with the commercial SPR system.

## II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

### 1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti  
 b) delno  
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

Pri razvoju multifunkcionalne konfiguracije detektorja na principu resonance površinskih plazmonov (Surface Plasmon Resonance – SPR), smo v projektu naleteli na tehnične težave glede zagotavljanja primerne občutljivosti aparata za merjenje medmolekulskih interakcij (primerna 2D resolucija prikaza detekcijske površine in občutljivost na spremembo lomnega količnika ( $\Delta n$ )). Optimizacija sistema je zato zahtevala dodatne tehnične posege in daljši čas dela, kot je bil predviden (večkratna sprememba v konfiguraciji aparata, optimizacija optičnega sistema in programske opreme za obdelavo podatkov). Zato je prišlo do zakasnitve v izdelavi tehničnega dela aparata do primernih merilnih lastnosti (avgust 2008). Zato dve aktivnosti, vezani na tehnično usposobljenost aparata, še nista bili izvedeni:  
-razvoj novih detekcijskih SPR površin na osnovi bimetalov za višjo občutljivost merjenja,  
-izdelava proteinskih biočipov - aplikacija izbranih vezavnih biomolekul (protiteles), selektivnih za preučevane biomolekularne markerje.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da  
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

## 2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela<sup>1</sup>:

Temeljni cilji v projektu so bili naslednji:

1. Analiza tarčnih sekvenc in s tem razvoj molekularnih markerjev za odkrivanje kontaminacije z mikrobnimi agensmi (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni/coli*, itd.), ali njihovimi produkti;
2. Razvoj hitrih, biomolekularnih testov – detektorja na osnovi tehnologije SPRM z vgrajenimi ustreznimi biomolekulami, selektivnimi na izbrane proteinske markerje. Izdelki bi uporabniku omogočali hkratno izvedbo kompleksne preiskave prisotnosti različnih kontaminantov v preiskovanih vzorcih.

Skladno s postavljenimi temeljnimi cilji projekta so bile v razdobju od 01.10.2006 do 30.09.2008 opravljene sledeče aktivnosti:

1. Študij tarčnih sekvenc in biomarkerskih molekul patogenih mikroorganizmov, prenosljivih s hrano (*Listeria monocytogene*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*):

V prvem delu smo uvedli glavne metodološke pristope, ki so bili predvideni za izvedbo prve stopnje projekta in so bili sledeči:

1. Teoretični izbor ciljnih sekvenc za izbor optimalnih oligonukleotidnih začetnikov iz literaturnih virov in lastnih predhodnih rezultatov o fenotipskih in genotipskih lastnostih tarčnih mikroorganizmov - patogenih bakterij, ki se prenašajo s hrano;
2. Obdelava izbranih sekvenc z računalniškim programom Primer Express (Applied Biosystem);
3. Preverjanje specifičnosti pomnožka z računalniško obdelavo in izvedbo RT-PCR: Preverjali smo specifičnost pomnožkov s programom Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) s primerjavo z znanimi sekvencami v dosegljivih bazah podatkov. Pripravili smo relativne standardne krivulje z izbranimi oligonukleotidnimi začetniki ter analizo morebitnega spajanja v paru preko analize tališne krivulje. Praktično smo preverili teoretične rezultate z izvedbo PCR v realnem času na večjem številu izolatov, pri čemer smo uporabili seve patogenih mikroorganizmov iz lastne zbirke.

Pri tem smo se najprej osredotočili na bakterije vrste *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* in *Bacillus cereus* (pri slednjem je bil cilj raziskave karakterizacija sinteze emetičnega toksina, kot osnova za nadaljnje raziskave molekularno-genetskih osnov sinteze toksina, ki je vzrok zastrupitev s hrano).

Delo smo nadaljevali z obema glavnima tarčnima organizmoma (*Listeria*, *Campylobacter*) na preučevanju uporabnosti barvil etidijevega mono-azida (EMA) in propidijevega monoazida (PMA) za zmanjšanje lažno pozitivnih rezultatov detekcije signala PCR iz mrtvih bakterijskih celic. Barvilo EMA naj bi selektivno vstopalo le v celice s poškodovano celično membrano, vendar se je izkazalo, da vpliva tudi na rast bakterij *Listeria* in *Campylobacter*, zato je ta reagent slab indikator živih oz. mrtvih celic. Barvilo PMA je dalo boljše rezultate, kar je razvidno iz primerjalnih analiz z drugimi metodami (klasično kultivacijsko tehniko oz. določanjem CFU ali fluorescentnim mikroskopiranjem-neposrednim štetjem bakterijskih celic), vendar le z nekaterimi testnimi organizmi. Zato smo preučevali vzroke in nadaljnje možnosti izboljšanja tehnike, ki vključuje tudi delovanje efluksnih črpalk bakterijske ovojnice, ki jih preučujemo pri bakterijah *Campylobacter*. Rezultati dela o kvantitativni detekciji bakterij in karakterizaciji efluksnih črpalk so bili septembra 2007 predstavljeni z dvema predavanjema na 3. Slovenskem kongresu o hrani in prehrani.

Metodiko molekularne identifikacije bakterij *Campylobacter* smo uporabili pri karakterizaciji izolatov iz vzorcev vode in piščančjega mesa. Delo je bilo s predavanjema predstavljeno na domačem in mednarodnem kongresu, v letu 2007 pa sta bila z rezultati molekularne detekcije in karakterizacije objavljena tudi dva originalna znanstvena članka v vodilnih revijah na področju živilske mikrobiologije.

V nadaljevanju smo vpeljali delo na biomarkerskih molekulah bakterij vrst *Staphylococcus aureus* in *Yersinia enterocolitica*. Bakterije *S. aureus* lahko tvorijo različne enterotoksine (poznanih je 19). Izbrali smo sekvence genov sea, seb, sec in sed, ki so v živilih najpogosteje odgovorni za tvorbo enterotoksinov. Kot markersko sekvenco za določanje bakterij *S. aureus* smo izbrali gen *femB* površinskega proteina B. V praktičnem delu smo optimizirali reakcije PCR v realnem času (določitev koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in koncentracije MgCl<sub>2</sub>) in razmere encimskih reakcij prilagodili univerzalnemu programu pomnoževanja DNK.

<sup>1</sup> Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

Delo je potekalo v sodelovanju s sodelujočo RO, Institutom za varovanje zdravja (IVZ RS), kjer so vpeljane tudi referenčne metode izolacije omenjenih patogenih bakterij iz živil in detekcije tvorbe stafilokoknih enterotoksinov (test RPLA). V nadaljevanju smo s klasično mikrobiološko metodo določanja stafilokokov v živilih (SIST EN ISO 6888-1:1999/A1:2003) preiskali 40 vzorcev živil ter izolate identificirali in jih shranili. S PCR v realnem času smo ugotovili, da je 20 % vzorcev vsebovalo bakterije vrste *S. aureus*, ki ne tvorijo enterotoksinov a, b, c in d. Kombinacija standardne mikrobiološke metode določanja in kvantifikacije bakterij vrste *S. aureus* v živilih in PCR v realnem času za določanje najbolj pogostih stafilokoknih enterotoksinov omogoča preiskovanje večjega števila vzorcev ter njihovo karakterizacijo in vrednotenje. Sočasno so na sodelujoči RO uvedli metode odkrivanja patogenih sevov *Y. enterocolitica* na osnovi kombiniranega postopka klasične in metode PCR z odkrivanjem gena *ail* z zapisom proteina, povezanega s patogenostjo teh bakterij za človeka. Testirali so različne načine priprave tarčne DNK, različne mešanice PCR ter patogene in nepatogene seve *Y. enterocolitica*. Primerjava rezultatov molekularnih analiz s klasičnimi fenotipskimi analizami je pokazala, da se rezultati biotipizacije in serotipizacije ujemajo z določitvijo *ail* gena, povezanega s patogenostjo sevov *Y. enterocolitica*. Opisano delo je bilo opravljeno v okviru razvoja metodologije dela, ki vključuje uporabo metode PCR in PCR v realnem času, kar je bil prvi cilj tega projekta – razvoj znanja o biomarkerskih molekulah, kar bi omogočilo boljše izkoriščenost aparatov PCR, ki so del opreme Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, BF, prijavitelja tega projekta, in IVZ, sodelujoče raziskovalne organizacije tega projekta.

Drugi del projekta pa je bil vezan na razvoj t.i. SPR aparature in s tem v zvezi tudi na detekcijo glivnih toksinov. Zato smo poleg bakterijskih patogenih kultur preučevali tudi rast in tvorbo ohratoksina A pri plesnih *Penicillium verrucosum* in *Aspergillus westerdijkiae* ter aflatoxina B1 in B2 pri plesni *Aspergillus flavus*. Ohratoksine in aflatoxine tvori več vrst plesni rodu *Penicillium* in *Aspergillus*. Kemijsko so sorodne spojine, ki jim je osnova izokumarinska molekula, povezana z L-fenilalaninom. V živilih se izmed vseh ohratoksinov največkrat pojavlja ohratoksin A, ki ga tvorijo predvsem plesni vrste *Penicillium verrucosum* ter aflatoxina B1 in B2 ki ju tvori *A. flavus*. V praktičnem delu smo zato določili vpliv okoljskih dejavnikov na rast plesni vrste *Penicillium verrucosum* in vzporedno na rast štirih drugih sevov *Penicillium*. Med okoljskimi dejavniki smo spreminjali temperaturo (med 10 in 25 °C), vodno aktivnost (med 0,900 in 0,999), vrednost pH (med 4,6 in 6,5) ter vrsto gojišča (tekoče in trdno gojišče, kruhov analog). Izračunali smo relativne hitrosti rasti pri izbranih okoljskih parametrih in v enakih razmerah spremljali tvorbo ohratoksina A pri rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* (gojišče YES, pH 4,5 in 6,5, aw 0,90 in 0,99 in T 10 in 25 °C. Vzorčili smo vsakih sedem dni, skupno do 42 oz. 56 dni. Ohratoksin A smo določali spektrofotometrično (metoda v razvoju na Katedri za biotehnologijo), katere občutljivost je 34,2 ng ml<sup>-1</sup>. Plesni vrste *P. verrucosum* so tvorile OTA na gojišču YES z aw 0,90 in pH 4,5 po 35 dneh inkubacije pri 25 °C, tvorbo OTA na gojišču YES z aw 0,90 in pH 6,5 pri 25 °C pa smo določili šele po 56 dneh. Pri temperaturi 10 °C in ostalih okoljskih parametrih OTA nismo določili oz. so bile koncentracije pod mejo občutljivosti metode. Rezultati so pokazali, da ima temperatura največji vpliv na tvorbo OTA, za določitev vpliva aw in pH bi bilo potrebnih več raziskav. Preverili smo tudi vpliv nekaterih rastlinskih ekstraktov na rast plesni *A. flavus* in *A. westerdijkiae* ter produkcijo mikotoksinov (aflatoxin B1, B2 ter ohratoksin A). Koncentracijo mikotoksinov smo v tem primeru določali s pomočjo encimsko imunskega testa (ELISA). Rastlinski ekstrakti niso vplivali na rast plesni, so pa v nekaterih primerih inhibirali produkcijo mikotoksinov.

Drugi del projekta je vključeval razvoj detektorja na osnovi tehnologije SPRM z vgrajenimi ustreznimi biomolekulami, selektivnimi na izbrane proteinske markerje. Izdelki bi uporabniku omogočali hkratno izvedbo kompleksne preiskave prisotnosti različnih kontaminantov v preiskovanih vzorcih.

Program dela je skladno s temeljnimi cilji v projektu vključeval:

-razvoj in izdelavo detektorja (biosenzorja) na osnovi tehnologije resonance površinskih plazmonov (Surface plasmon resonance), ki bi omogočal sočasno detekcijo več analitov – biomarkerjev;

- sklapanje tehnoloških pristopov in konfiguracije SPR, ki bi omogočala sočasno zajemanje podatkov iz celotne detekcijske površine senzorja (prikaz detekcijske površine), primernih mikropretočnih sistemov za izdelavo proteinskih čipov ter aplikacijo izbranih biomolekul, selektivnih na preučevane biomarkerje – na osnovi tega izdelava multifunkcionalnega analitskega sistema.

-razvoj in izdelavo mikropretočnih sistemov za pripravo proteinskih biočipov na SPR detektorju, ter

kontroliran vnos vzorcev čez detekcijsko površino.

-razvoj novih detekcijskih površin na osnovi bimetalov, ki bi omogočale višjo občutljivost merjenja.

-pripravo proteinskih biočipov za detekcijo izbranih molekularnih markerjev (mikotoksinov), izdelavo metode merjenja ter določitev merilnih lastnosti.

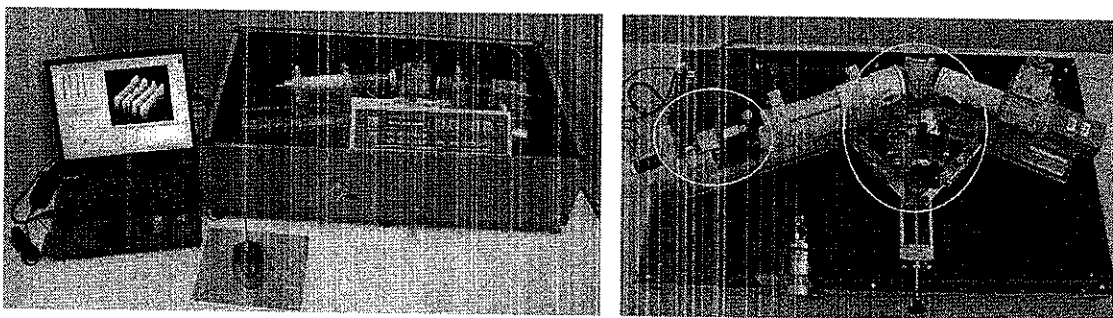
-detekcijo izbranih analitov s komercialnim SPR sistemom (Biacore) ter primerjavo merilnih lastnosti z izdelanim detektorjem.

Glede na zastavljeni cilj v projektu je delo na projektu potekalo v sklopih:

1. Razvoj in izdelava aparata na principu resonance površinskih plazmonov (SPR) v konfiguraciji, ki bi omogočala sočasno zajemanje in podatkov iz celotne detekcijske površine senzora – t.i. SPR mikroskopija: Poslužili smo se osnovne strukture v laboratoriju predhodno že izdelanega SPR detektorja v klasični (Kretchmanovi) konfiguraciji, ki je bil v projektu v več stopnjah predelan za doseganje 2D prikaza detekcijske površine, z resolucijo, primerno za prikaz in merjenje biomolekularnih interakcijskih mest na detekcijski površini, organizirani v obliki biočipa:

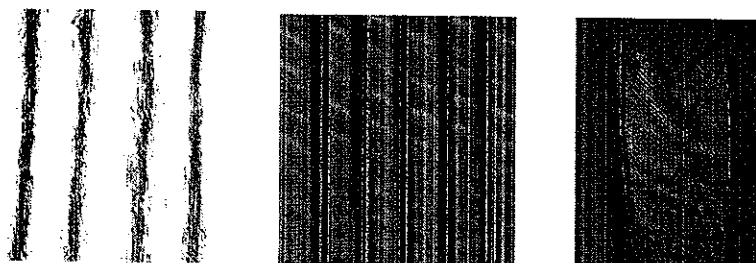
V obdobju 1.1.-31.3.2007 je bila izdelana konfiguracija SPR mikroskopa s konstantnim vpadnim kotom analitske svetlobe. Aparat je bil povezan na prenosni računalnik in v komercialnem programskem okolju VisionAssistant omogočal 2D prikaz detekcijske površine. Pri preverjanju merilnih lastnosti na standardnih raztopinah z definiranim lomnim količnikom medija je resolucija prikaza detekcijske površine znašala  $100\mu\text{m}$ , spodnja meja detekcije na spremembe lomnega količnika ( $\Delta n$ ) pa je znašala  $>10^{-3}$ , in ni zadoščala potrebam analiz biomolekulskih interakcij (protitelo – mikotoksin); minimalna potrebna spodnja meja detekcije  $<10^{-4} \Delta n$ .

Za izboljšanje občutljivosti aparata so bili v obdobju 1.4. – 31.12.2007 izvedeni dodatni tehnični posegi na inštrumentu: izboljššan izvor svetlobe, ki zagotavlja monokromatske pogoje z nizko stopnjo divergence analitske svetlobe (zamenjava laserske diode z HeNe laserjem), filtracija nultega reda difrakcijskega minimuma – (montaža filtra), interferenčna filtracija signala na principu (Mach-Zhender) interferometrije (slika 1).



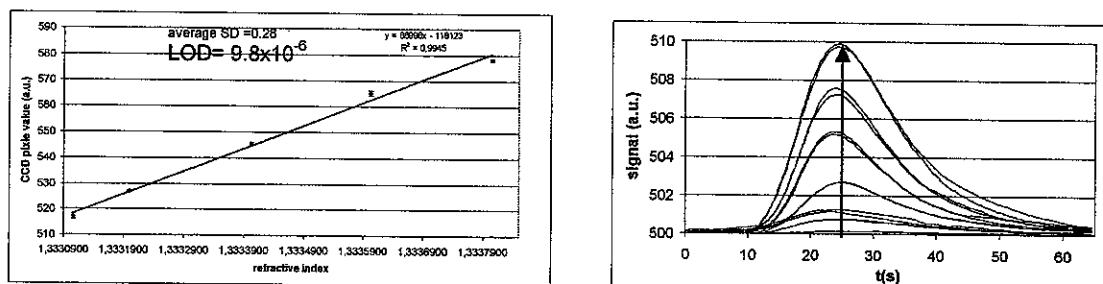
Slika 1: SPRi senzor prototip (levo), prikaz nadgrajene strukture (desno). Označena sta sklopa elementov za izboljšanje kakovosti optičnega signala; filtracija nultega reda difrakcijskega minimuma – levo, interferenčna filtracija - desno.

Tehnični poseg je pripomogel k izboljšanju resolucije prikaza detekcijske površine, ni pa izboljšal občutljivosti detektorja. Poleg tega se je povečala občutljivost na mehanske vibracije v okolju, pojav interferenčnih območij v projekciji, ter občutljivost na spremembe svetlobe v okolici (Slika 2).



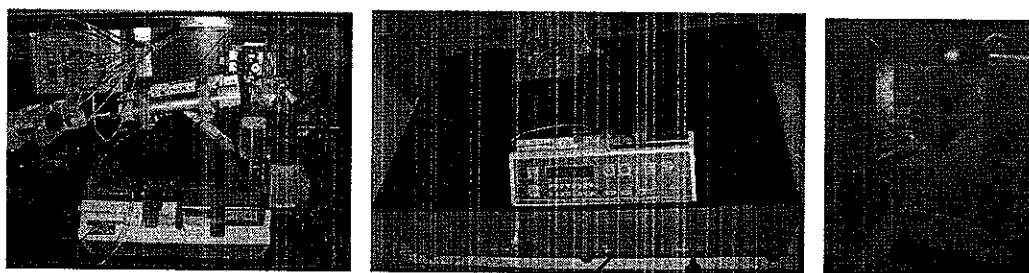
Slika 2: 2D slika detekcijske površine pred -levo in po filtraciji šuma -sredina (razdalja med kanali  $300\mu\text{m}$ ). 2D slika celotne detekcijske površine; prikaz 10 kanalov -desno.

Zaradi teh težav in potrebne večje občutljivosti detektorja smo v zadnjem obdobju projekta temu posvetili več pozornosti in v detekcijskem sistemu s spremembo geometrije analitske svetlobe dosegli izboljšavo občutljivosti aparata na  $10^{-5}$  in ter izvedli opredelitev merilnih lastnosti aparata (Slika 2a).



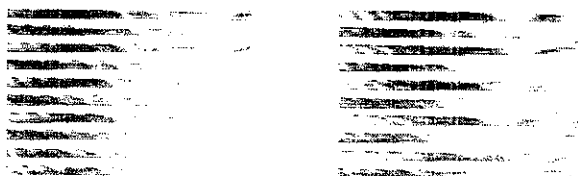
Slika 2a: Občutljivost detektorja (levo), prikaz meritev občutljivosti (desno), vrednosti standardov od  $1 \cdot 10^{-5}$  do  $6 \cdot 10^{-4} \Delta n$ .

V sistemu je bila z dodatkom cilindrične leče (pred detekcijsko površino) analitska svetloba fokusirana na detekcijsko površino v obliki črte, ki prečka mikropretočne kanale (slika 3).



Slika 3: SPRI senzor – nadgradnja optičnega sistema; struktura – levo, slika senzorja – sredina, svetloba fokusirana na detekcijsko površino v obliki črte preko 10 kanalov (desno)

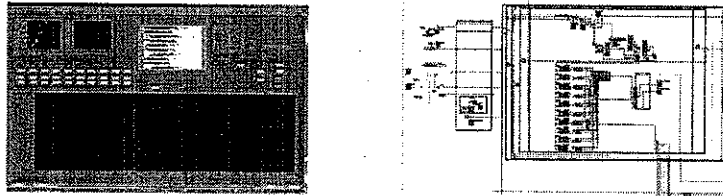
Resonančna stanja v posameznih ločenih mikropretočnih kanalih so bila v projekciji svetlobe opažena kot območja z nižjo intenziteto, ki so glede na lomni količnik merjenega tekočega vzorca spreminjala položaj (sprememba vpadnega kota ki ustrezajo resonančnim pogojem in posledično vertikalni pomik temnega območja v projekciji – slika 4).



Slika 4: Prikaz projekcije signalov v 10 kanalih; temno območje sovпада z resonančnim stanjem, metanol (levo), premik resonančnega stanja po dodatku vode v 1, 3, 5, 7, 9 kanal (desno).

Zaradi uvedenega posega in spremenjenega načina detekcije resonančnega stanja smo izdelali računalniški program v programskem okolju Labview, ki omogoča komunikacijo med prenosnim računalnikom ter svetlobnim detektorjem (CCD), s kontroliranim zajemanjem, obdelavo in shranjevanjem videopodatkov. V ta namen je bil izdelan programski algoritem, ki omogoča (uporabniku prijazen) kontinuiran prikaz signala v posameznih kanalih mikropretočnega sistema (1.4.-31.7. 2008). Izdelani program omogoča filtracijo šuma (povprečenje signalov) z možnostjo optimizacije nastavitve obdelave podatkov v posameznih kanalih mikropretočnega sistema (slika 5).





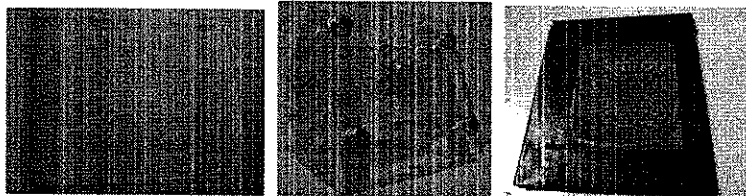
Slika 5: Prikaz izdelanega programskega okolja za SPR detektor, nadzorno okolje (levo), programska shema (desno).

Izdelana konfiguracija aparata SPR zadošča pogojem za sočasno merjenja več biomolekularnih interakcij. Ob odstranitvi dodanih cilindričnih leč, prav tako aparat omogoča tudi 2D prikaz detekcijske površine, ki pa med potekom merjenja interakcij zaradi spremenjenega pristopa merjenja ni možen.

## 2. Razvoj in izdelava mikropretočnega sistema za pripravo proteinskih biočipov:

-Izdelan je bil preprost mikrotekočinski sistem za kontroliran vnos reagentov/vzorcev na detekcijsko površino, ki zagotavlja pogoje za pripravo proteinskega biočipa (1.1-31.12.2007). Mikrotekočinski sistem je bil pripravljen s pomočjo tehnike fotolitografije za pripravo kalupov ter tehnike odlivanja elastomerov (sintetični polimer polidimetilsiloksan PDMS) na pripravljene kalupe. Izdelan je bil 10 kanalni mikropretočni sistem, z vzporednimi neodvisnimi mikrokanali na površini 8x8mm (širina kanala 200 $\mu$ m), ter primerno ohišje za vpenjanje mikrotekočinskega sistema na detekcijsko površino.

Z uporabo grafičnega programskega okolja in inkjet tiskanja na acetatne prosojnice so bile izdelane maske za izvedbo fotopostopka v okviru fotolitografije (slika). Pri izdelavi mask so bile upoštevane dimenzije ki omogočajo mehansko obdelavo ter sklapljanje cevi tekočinskega sistema povezanega z črpalko ter ventili SPR aparata. Pri izdelavi kalupov smo kot substrat za jedkanje preverili možnost uporabe "pentinax" plošč, ki se uporabljajo v elektrotehnik in ugotovili, da ne zagotavljajo dovolj širne globine odlitka mikrokanalov (10-30 $\mu$ ) ter posledično mašenje mikropretočnega sistema ob mehanski namestitvi. Problem smo odpravili z izvedbo fotolitografskega postopka na bakreni pločevini ter zagotovili globino mikrokanalov ca. 250 $\mu$ m ki zadošča potrebam pretoka tekočin (slika 6).



Slika 6: PDMS odlitek mikrokanalov (levo), mikrotekočinski sistem in detekcijska površina (sredina), kalup mikrotekočinskega sistema (desno).

Vzporedna organizacija mikrokanalov v pripravljenem mikrotekočinskem sistemu omogoča pogoje za kontroliran mestnospecifičen vnos reagentov/vzorcev čez detekcijsko površino ter pripravo proteinskih biočipov. Simetričnost izdelave vpenjala mikrotekočinskega sistema pa omogoča namestitvev mikrotekočinskega sistema v dveh položajih ki sta med seboj lahko zasukana 90°. Možnost zasuka mikrotekočinskega sistema pa omogoča možnost vodenja tekočih vzorcev (do 10) pravokotno čez 10 vrst biomolekul ki so imobilizirane v progah čez detekcijsko površino ter posledično do 100 interakcijskih mest.

## 3. Detekcija preučevanih analitov s komercialnim SPR sistemom:

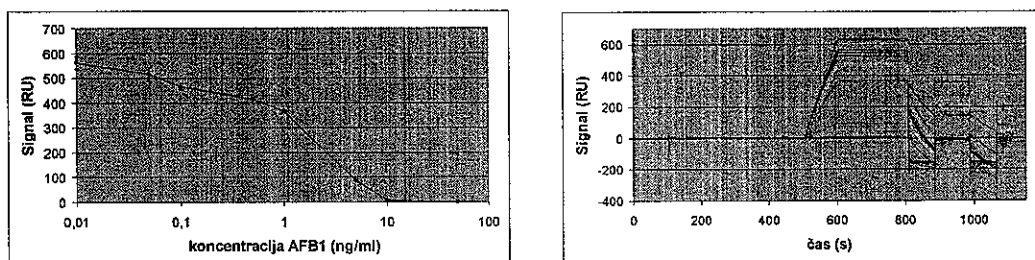
V projektnem obdobju 1.4.-31.12.2007 smo izvajali eksperimente izdelave in optimizacije metode detekcije mikotksinov (aflatoxin B1 (AFB1)) na komercialnem aparatu Biacore T100 (Infrastrukturni center za površinsko plazmnsko resonanco). Pri oblikovanju metode detekcije smo preverili tri pristope detekcije na principu imunološke detekcije s protitelesi (monoklonska protitelesa specifična za mikotksin B1, B2), optimizirali pogoje za imobilizacijo biomolekul (visoka gostota nanosa) ter regeneracijo detekcijske površine: -Pri "direktni detekciji" mikotoksina z imobilizacijo protiteles (anti AFB1) na detekcijsko površino ter merjenju

interakcije z AFB1 v vodni fazi so rezultati pokazali visoko spodnjo mejo detekcije aflatoksina (300 ng/ml) v primerjavi z obstoječimi analitskimi tehnikami (ELISA – direktna kompetitivna detekcija AFB1, 5ng/ml). Nizka občutljivost metode je bila posledica majhne molekulske mase analita (316 Da).

-"direktna kompetitivna detekcija" z uporabo konjugiranih molekul mikotoksina (Aflatoksin B1 - BSA molekulska masa ca. 70 kDa); imobilizacija protiteles (anti AFB1) na detekcijsko površino ter tekmovanje za vezavna mesta na protitelesu med analitom v vzorcu (aflatoksin B1) ter konjugatom. Pri uporabi direktne kompetitivne metode detekcije se funkcionalnost detekcijske površine izgubi ob regeneraciji (trajna denaturacija protiteles).

-"inhibicijski test"; imobilizacija konjugata aflatoksin B1-BSA na detekcijsko površino, inhibicija protiteles (anti aflatoksin B1) dodanim vzorcem z analitom (aflatoksin B1), ter nadalje vezava prostih protiteles (molekulska masa ca 180 kDa) s konjugatom, imobiliziranim na detekcijski površini.

Rezultati preverjenih metod merjenja so pokazali, da je inhibicijski test najprimernejši. Preliminarni rezultati so pokazali možnost regeneracije detekcijske površine z 10% acetonitrilom in 50mM NaOH z možnostjo do ca. 100 meritev. Zaradi močne selektivne vezave monoklonskih protiteles z AFB1 je potrebna uporaba agresivnega regeneracijskega sredstva, ki močno vpliva na funkcionalnost detekcijske površine (slika 7).



Slika 7: Meritve AFB1. Umeritvena krivulja (levo), prikaz meritev (desno).

Glede na rezultate eksperimentov je bila ocenjena spodnja meja detekcije na standardne raztopine AFB1 0,1 ng/ml v dinamičnem območju 0,1-10 ng/ml AFB1. Čas 1 meritve je znašal 1300 s. Pri meritvah nizkih koncentracij analita smo opazili slabšo učinkovitost regeneracije, ki je zahtevala ponovitev regeneracijskega postopka. Prav tako smo opazili vpliv regeneracijskega sredstva na dekstranski sloj komercialnih detekcijskih površin, ki vplivajo na stabilnost bazne linije po regeneraciji. Zaradi nestabilnosti detekcijske površine in izgubljanja občutljivosti ter ponovljivosti meritev ob večkratnih regeneracijah metoda potrebuje dodatne optimizacije.

### 3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen<sup>2</sup> rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
  - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
  - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

---

<sup>2</sup> Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

- Razvoj metodologije, ki bo omogočila boljšo izkoriščenost obstoječe tehnične opreme laboratorija za odkrivanje kontaminantov v vzorcih hrane ali drugih okoljskih vzorcih.  
- Razvoj tehničnega repertoarja na principu resonance površinskih plazmonov. V projektu je bil izdelan nov aparat na principu SPR tehnologije, ki omogoča sočasno merjenje do 10 biomolekularnih interakcij.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Širša uporabnost metodologije tudi v drugih laboratorijih v Sloveniji in širše (vključno z akreditiranimi slovenskimi laboratoriji (kot je IVZ, ki je bil iz tega razloga tudi sodelujoča RO projekta, ter tujih laboratorijih, s katerimi trenutno sodelujemo – npr. Institut za higieno mleka, Univerza za veterinarsko medicino (VUW), Dunaj, Avstrija) - trenutno aktivni bilateralni projekt, ali bomo sodelovali v prihodnosti (opisano v točki 3.6).  
Lažje iskanje partnerjev za skupno vključevanje v evropske projekte

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Raziskovalci domačih analitskih laboratorijev (IVZ, ZZV)  
Raziskovalci tujih analitskih laboratorijev (v letu 2008 je sprejeta v sofinanciranje sprejeta skupna bilateralna prijava projekta s Slovaško, Institute for Food Research, Bratislava: »Polymerase Chain Reaction – Application for Food Safety«, torej raziskovalni projekt s področja molekularne analitike kontaminantov hrane - kot projekt CRP oz. to poročilo.

3.7. Število diplomantov, magistrstov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

V raziskovalni projekt je bilo vključenih 6 diplomantov in ena doktorska disertacija.

#### 4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

- EU projekt FW6: Biotracer, nosilec dr. J Horfar, Danska, skupno preko 50 partnerjev, konkretno sodelovanje na področju, ki je bil predmet tega CRP projekta z inst. Statens Serum Institute Copenhagen, Danska.
- EU projekt Safoodnet, nosilec G. Wirtanen, VTT, Finska
- bilateralni projekt Slovenija-Avstrija: Detection of food-borne pathogenic Campylobacter spp. for safety of poultry meat (2007-2008)
- bilateralno sodelovanje z Institutom ILVO, Melle, Belgija (2004-2007) (razvidno iz točke 5: Bibliografski rezultati)

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

- Skupni razvoj metodoloških pristopov
- Skupna priprava znanstvenih publikacij (razvidno iz točke 5: Bibliografski rezultati)
- Skupna mednarodna prezentacija rezultatov raziskovalnega dela (razvidno iz točke 5: Bibliografski rezultati)
- Izmenjava študentov, učiteljev in raziskovalcev med sodelujočimi institucijami

#### 5. Bibliografski rezultati<sup>3</sup> :

*Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.*

#### 6. Druge reference<sup>4</sup> vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

<sup>3</sup> Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

<sup>4</sup> Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.