



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only Fotó/Photo: Lovász Csaba*

# *Kukoricahibridek genetikai-tisztaság vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel*

## *Vetőmagok korszerű „származási tesztje”*

### 1. Összefoglalás

A tömegspektrometria a korszerű műszeres metodikák egyik legsokoldalúbban alkalmazható módszere. A legérzékenyebb analitikai műszerektől kezdve, az úrkutatásban történő alkalmazásán át, az intelligens sebészkesig (iknife), a tudománynak szinte nincs olyan területe, ahol ne tudnánk kiaknázni a módszer nyújtotta előnyöket. Jelen cikkünkben a tömegspektrometria egy új területen való alkalmazását mutatjuk be.

Gazdasági szempontból az egyik legfontosabb kultúrnövényünk a kukorica, amiből 5-8 millió tonnát termelünk évente Magyarországon. Ehhez az ipari méretű termeléshez nélkülözhetetlen a kiváló minőségű vetőmag, amelynek előfeltétele a vetőmag szigorú ellenőrzésének rendszerszerű gyakorlata. Ennek szellemében a kétes eredetű vagy gyenge minőségű vetőmagok azonosítása, kiszűrése a termesztők és a vetőmag előállítók fontos feladata. A vetőmagok genetikai-tisztasága a fajtaazonosság legfontosabb minősítési paramétereinek egyike.

Kutatásunk célja az volt, hogy kidolgozzunk egy korszerű, hatékony vizsgálati módszert kukorica vetőmagok genetikai-tisztaságának és fajtaazonosságának vizsgálatára, illetve, hogy mérésekkel igazoljuk módszerünk alkalmazhatóságát.

Ez az eljárás a MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry – mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometria) alkalmazásán alapul, amelynek segítségével a kukoricaszemek tartalék fehérjéit tudjuk vizsgálni. A kukoricaszemek extrakcióját követően, a kivonatok tömegspektrumaiban megjelenő, különböző tömegszámú csúcsok (fehérjék) közül kiválaszthatjuk az adott szülőkre jellemző fehérjét, amelyeket a hibrid vetőmagok vizsgálata során, mint genetikai markereket követünk nyomon. A MALDI-TOF-MS módszer ellenőrzésére mérési eredményeinket összehasonlítottuk a javasolt referencia módszerrel (izoelektromos fókuszálás - IEF) kapott eredményekkel. Az eddig elvégzett vizsgálatok eredményei biztatóak, igen jó egyezést mutatnak a referencia módszerrel kapott eredményekkel. Módszerünk a gombával fertőzött kukorica vetőmagtétel vizsgálatára esetén is egzakt eredményt szolgáltatott, míg a referencia módszerrel az ilyen vetőmagtétel csak korlátozottan vizsgálható. A gombafertőzés befolyásolja az izoelektromos fókuszálással történő gélen való futtatást, ami nehezíti, néhány esetben lehetetlenné teszi az eredmények értékelését.

A kukorica vetőmagok genetikai tisztaság vizsgálatára kidolgozott MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerünk nemcsak gyorsaságával, érzékenységeivel és összevethető eredményeivel bizonyult megfelelőnek, de a gombafertőzött hibridek vizsgálatát is lehetővé tette.

<sup>1</sup> WESSLING Hungary Kft.

## 2. Bevezetés

A Föld népessége rohamosan növekszik, ezért fontos a megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszer biztosítása. E cél megvalósításához járul hozzá a növénynevelés, amellyel a terméshozamok növelését és a fajok örökletes tulajdonságainak javításával érhetjük el. A növénynevelés elsődleges feladata a nagyobb termőképességű és jobb minőségű új genotípusok előállítására.

Ahhoz, hogy a növénytermesztés eredményes legyen, nélkülözhetetlen a kiváló minőségű vetőmag. Hazánk Európa legfontosabb vetőmag előállítói közé tartozik, a XX. század kezdete óta fontos szerepet tölt be a vetőmagtermesztésben. A vetőmag minősítésének feltételeit és a megkövetelt paramétereket rendeletek írják elő. A minősítési paraméterek meghatározása azért fontos, mert a termelőknek a kétes eredetű vagy gyenge minőségű vetőmagok komoly károkat okoznak. A terméshozamok tervezése, illetve az adott fajták növényi betegségekkel szembeni ellenálló képessége miatt nem közömbös, hogy a vetőmag előállítók milyen genetikai eredetű vetőmagot állítanak elő.

A kukorica, mint kultúrnövény igen fontos szerepet tölt be a Föld lakosságának élelmezésében, az állatok takarmányozásában, illetve egyéb új ipari felhasználási területeken, mint például a bioetanol előállításában. Az alábbiakban a hibrid kukorica vetőmagok genetikai tisztaság vizsgálatának új, tömegspektrometriás módszerét ismertetjük. A módszer a MALDI-TOF tömegspektrometria – mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációs módszer – amelynek segítségével a kukorica vetőmagok fehérje profiljait vizsgáltuk. Az általunk kidolgozott tömegspektrometriás módszerrel lehetőségünk nyílt arra, hogy felismerjük az esetleges önbeporzást vagy az idegen termékenyülést, továbbá a gomba fertőzött kukoricaszemek genetikai tisztaságát is meghatározhatjuk.

## 3. Irodalmi áttekintés

### 3.1. A kukoricaszem összetétele, alkotói

A kukoricaszem fő alkotói a magcsúcs, a héj, a csíra és az ún. *endospermium* [1]. A csíra lényegében egy inaktív növényi embrió, amely megfelelő környezeti tényezők (hőmérséklet, páratartalom) mellett indul fejlődésnek. A csíra a mag tömegének mintegy 11%-át teszi ki, főként olajat, ezen kívül fehérjét és cukrokat tartalmaz. A szem tömegének további 83%-a az *endospermium*, sejtjei tömegének 88%-át a csíra fejlődéséhez szükséges keményítő szemcsék, és fehérjék alkotják.

A szem tömegének 5,3%-át kitevő maghéj két részből áll, külső része a 25 - 140 µm vastagságú, ún. *pericarp*, amely elhalt sejtekből áll, anyaga főként lignocellulóz [2], illetve a belső része a *pericarp*-hoz közvetlenül csatlakozó ún. *aleurone*, amelynek vas-

tagsága egy sejtréteget tesz ki. A maghéj a lignocellulózon kívül némi fehérjét és olajat is tartalmaz.

A tartalék- vagy raktározott fehérjék a gabonafélék magvainak *endospermium*ában vannak, és a magban található összes fehérje mennyiségének kb. a felét alkotják. A magfehérjék nemcsak az élelmiszer- és a takarmányipar, hanem az alap kutatás számára is értékes biológiai anyagot képviselnek, mert génjeik a növény életciklusának csak pontosan meghatározott szakaszában működnek [3]. A kukorica tartalékfehérjeje, amelyet Osborne [4] zeinnek nevezett, glutaminsavban, prolinban, leucinban és albuminban gazdag, de az esszenciális aminosavak közül lizinből és triptofánból kevés található benne. A zeint a megtermékenyülés utáni kb. 15. naptól kezdve az *endospermium*ban a durva endoplazmás reticulum (RER) riboszómái szintetizálják. A szintézist egy 1–2 kD molekulatömegű szignál peptid indítja. A peptid átjuttatja a szintetizálódott molekulákat a membránon, majd kivágódik, a molekulák pedig a membrán belsejében elhelyezkedve létrehozzák a RER-hez kötött fehérjetestet.

### 3.2. Vetőmag-minősítés

Hazánkban az Európai Unió jogszabályaival összhangban a növényfajták kereskedelmi forgalmazását a növényfajták állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalmazásáról szóló 2003. évi LII. törvény és végrehajtását a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium által kiadott 48/2004 számú rendelet szabályozza. Magyarországon csak a Nemzeti Fajtajegyzékben és az EU fajtelistán szereplő növényfajok fajtáinak minősített vetőmagját szabad forgalomba hozatal céljára előállítani, forgalmazni, illetőleg áruterjesztési célra felhasználni. A vetőmagot külön jogszabályban meghatározott követelmények szerint minősítik, amelynek eredményéről igazoló okiratot kell kiállítani.

A vetőmag-minősítés tehát a vetőmag-forgalmazás feltétele, amelynek részfolyamatai a következők:

- Származás igazolása;
- Szántóföldi ellenőrzés;
- Mintavétel;
- Laboratóriumi vizsgálat;
- Fémzárolás;
- Fajtaazonosító kitermesztés;
- Minőséget igazoló okirat kiadása.

A fentebb felsorolt folyamatok révén nyomon követhető az előállított vetőmag minősége, illetve ellenőrizhető, hogy a legfontosabb nemzetközi előírások érvényesülnek-e a vetőmag előállítás során. A laboratóriumi vizsgálatok egyik fő célja a vetőmagtétel genetikai tisztaságának, genetikai homogenitásának, fajtaazonosságának megállapítása.

A növénynevelésben az ön- és az idegentermékenyülés meghatározására, a fajtisztaság ellenőrzésére, a fajtaazonosításra és a fajtavédelemre egyaránt izoenzim analíziseket használnak. Napjainkban azonban az izoenzim analíziseket főleg a fajtaelismerés és a szabadalmaztatási eljárás folyamatában alkalmazzák. Jelenleg a kukorica hibridek fajtisztaságának vizsgálatára az izoelektromos fókuszálással végzett gélelektroforézis a nemzetközileg elfogadott módszer. Ezzel a módszerrel a kukoricában található tartalékfehérjéket (zein) magvanként extrahálják és ultravékony poliakrilamid gélen választják szét (Ultra Thin Layer Isoelectric Focusing - UTL-IEF módszer). Az ultravékony gélek használata gazdaságosabb és a szokásosnál magasabb feszültség alkalmazásával hajtható végre, segítségével a vizsgálat rövidebb ideig tart és a festési eljárás is gyorsabb, mint a hagyományos gélek alkalmazásakor [5].

Az izoenzim alapú fajtaazonosításkor a vizsgált fajta fehérjemintázatát hasonlítják össze a hiteles fajta fehérjemintázatával, ezzel szemben egy hibrid genetikai tisztaságának meghatározásakor a szülők fehérjemintázatát hasonlítják össze a hibrid fehérjemintázatával. A gélkromatogramokon látható fehérje sávok mintázata az adott fajtára vagy beltenyészett vonalra jellemző. A szülőkben mindig ki kell jelölni azokat a sávokat – marker fehérjéket – amelyek a hibridben öröklődnek. Általában az előállított hibrid genetikai-tisztasága az apában megtalálható, de az anyából hiányzó egy vagy több markersáv, marker fehérje segítségével értékelhető. Ezek a sávok felhasználhatók a hibridek fajtaazonosításakor is. A markersávok jelenléte vagy hiánya jelzi a hibrid genetikai vonalát, segítségével kimutatható az önbeporzott vagy az idegen beporzású szemek aránya.

### 3.3. Polimorfizmus és heterogenitás a zein mintázatban

A zein-mintázatban a polimorfizmust először Turner és mtsai [17] mutatták ki 1965-ben. Ez a polimorfizmus adódhat egyrészt a homozigóta egyedek magvaiból nyert prolamin frakció különböző összetételéből, másrészt származhat abból, hogy az elválasztható komponensek száma függ az alkalmazott módszertől és a hibridtől is. A prolamin komponensek eltérő elektroforetikus sajátosságai miatt szülői genotípustól függően hibridenként változhatnak [3]. Mivel a zein-mintázatot a környezeti tényezők nem befolyásolják, ki lehet mutatni a zein-polimorfizmussal beltenyészett kukoricavonalak és hibridek genetikai azonosságát vagy különbözőségét. Viszont azt a teljes genetikai különbözőséget, amely alapján az agronómiai teljesítmény (pl. heterózis) pontosan előre jelezhető lenne, ezzel a módszerrel sem lehet feltárni.

Wilson [6] a zein-polimorfizmus vizsgálatára az alábbi módszereket tartotta alkalmasnak:

- SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis - Na-dodecil-szulfát poliakril gél-elektroforézis) – szeparáció molekulatömeg alapján savas PAGE karbamid jelenlétében;
- UTL-IEF (Ultra thin layer gel electrophoresis with isoelectric focusing - Ultravékony gél-elektroforézis izoelektromos fókuszálással) – a fehérjék izoelektromos tulajdonságai alapján történő szeparáció – a fehérje sáv helyzete alapján;
- RP-HPLC (Reversed phase high performance liquid chromatography - fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia);



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

- CE (Capillary Electrophoresis – Kapilláris gélelektroforézis);
- Aminosav komponensek összetétele alapján történő vizsgálat;
- Zeint befolyásoló regulátorgének (pl. O2 gén) vizsgálata;
- Zeint kódoló struktúrgének feltérképezése;
- Zeint kódoló cDNS klónozása.

Bietz [7] módszere, a RP-HPLC, a fehérjéket – és így a zeint is – a felszíni hidrofób csoportok alapján bontotta alkotóira. Ezzel a technikával a heterogén zeint több frakcióra lehet bontani, mint bármely más kromatográfiás vagy elektroforetikus módszerrel. Napjainkban az utóbbi két módszert úgy kombinálják, hogy először a zeint RP-HPLC-vel frakcionálják, majd a frakciókat UTL-IEF-fel izoelektromos tulajdonságuk alapján választják szét.

Az SDS-PAGE és HPLC módszereket rutinszerűen alkalmazzák nemesítési programokban, a nagy és kis molekulatömegű fehérjék elválasztására [8]. Az SDS-PAGE módszerrel történő elválasztás az elektroforetikus mobilitáson alapul, viszont ez a módszer nem eléggé egzakt és az azonosítás is nehéz bizonyos esetekben [9]. Valamilyen szinten az RP-HPLC megoldást jelenthet ezekre a problémákra, de bizonyos alegységek azonosítása ezzel a módszerrel sem sikeres [10].

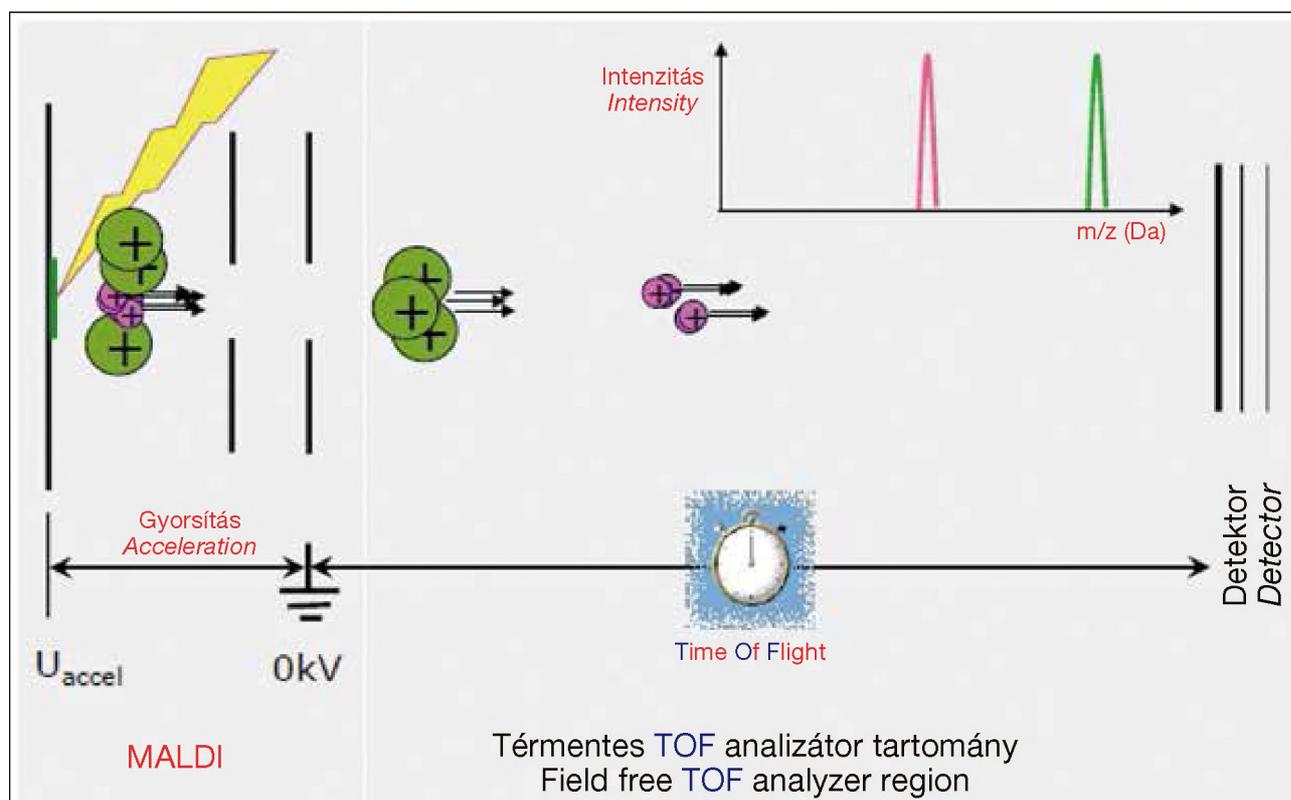
A fehérjék tömegspektrometriás vizsgálatához többek között a MALDI-TOF tömegspektrometria ki-

dolgozása, felfedezése [11] nyitotta meg az utat. Mivel a zein-polimorfizmus visszavezethető a zein fehérje összetételének, profiljának vizsgálatára, így adódik lehetőség, hogy tartalékfehérje összetételét MALDI-TOF tömegspektrometriával vizsgáljuk.

MALDI-TOF módszerrel gyorsan és rendkívül eredményesen lehet a búza sikefehérjéket azonosítani [8]. Összehasonlítva az előző módszerekkel a MALDI-TOF módszer sokkal pontosabb és érzékenyebb, és nem utolsó sorban időtakarékos módszer, hiszen a mintánkénti mérés csak néhány percet vesz igénybe [8]. Ghirardo [12] a búza glutenin és a gliadin fehérjéit vizsgálta MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel. A kukoricaszemek vizsgálatakor a Ghirardo által végzett extraktum előkészítési eljárást alkalmaztuk, kisebb-nagyobb módosításokkal.

### 3.4. A MALDI-TOF tömegspektrometria

A tömegspektroszkópia egy olyan hatékony szerkezetkutató módszer, amelynek alkalmazása közben a vizsgálandó molekulákat gázfázisba juttatjuk, ionizáljuk és nagyfeszültségű elektromos térrel felgyorsítjuk. A felgyorsított ionokat mágneses, elektrosztatikus, vagy rádiófrekvenciás terekkel tömegük és töltésük szerint elválasztjuk és meghatározzuk az ionok tömegét. A vizsgált molekula mérete, molekulatömege az egyik legfontosabb szerkezeti információ, amelyet a tömegspektrometria szolgáltat, ezért a makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatában a kulcskérdés az ionizáció. A biológiailag aktív molekulák – fehérjék, enzimek – vizsgálatára az egyik megoldás a MALDI ionizációs technika alkalmazása lehet.



1. ábra: A MALDI-TOF tömegspektrométer elvi felépítése [14]  
Figure 1: Basic design of the MALDI-TOF mass spectrometer [14]

A MALDI-TOF betűszó egy speciális tömegspektrométert jelent, amelyben a MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) az ionforrás és a TOF (*Time of Flight*) a tömegszám-analizátor, ami az ionizáció során keletkezett ionok tömeg/töltés szerinti szétválasztására szolgál. A műszer felépítését az **1. ábra** szemlélteti.

A Tanaka [11] által 1985-ben szabadalmaztatott eljárást (Soft Laser Desorption - SLD-mátrix: glicerín és fémpor) csak elvétve használták fehérjék vizsgálatára, helyette mind a mai napig a sokkal érzékenyebb, M.Karas F.Hillenkamp és [16] német kutatópáros megoldását alkalmazzuk a proteinek vizsgálatára. Ebben az eljárásban a mátrix, a segédanyag kis szerves molekula, amely képes elnyelni az ionizációhoz alkalmazott lézer energiáját, illetve ionizálni a célvegyületeket. Mátrixként leggyakrabban hidroxil-, illetve karboxil-csoportokat tartalmazó aromás vegyületeket alkalmazunk, amelyek közül a leggyakrabban alkalmazott vegyületek szerkezeti képletét és nevét a **2. ábra** mutatja be.

A fehérjék vizsgálatában az egyik leggyakrabban alkalmazott mátrix az *alfa*-Ciano-4-hidroxi-fahéjsav ( $\alpha$ -HCCA, HCCA), amelynek UV abszorbancia maximuma 332 nm-nél van, ezáltal a MALDI-TOF tömegspektrométerben alkalmazott pulzáló nitrogén UV lézer energiáját igen jól hasznosítja (a gyári specifikáció szerint az UV lézer sugárzása maximuma 337,1 nm-nél van). A kibocsátott foton-impulzusok energiája tetszőlegesen szabályozható, a műszervezélő szoftver az ionizáció határfokának megfelelően akár impulzusról-impulzusra változtatja.

A mátrix leggyakrabban oldat formájában kerül a mintatartó lemezre, illetve a mintákra. A mintákban található fehérjékkel egy szilárd elegykristályt képez, amelyben zárványként találjuk a makromolekulákat. Az ionizáció során a lézer energiája egyrészt a fehérjék gázfázisba jutását szolgálja, másrészt az ionizációjukat segíti. Így a vizsgált proteinekből gázfázisú protonált, jórészt egyszerűen töltött pozitív

ionokat, főként molekulaionokat ( $[M+H]^+$ ) kapunk. A molekula-addukt képződés mátrixfüggő, de a tömegspektrumban kisebb intenzitással megjelennek a többszörösen protonált ionok is ( $[M+2H]^{2+}$  vagy  $[M+3H]^{3+}$ ).

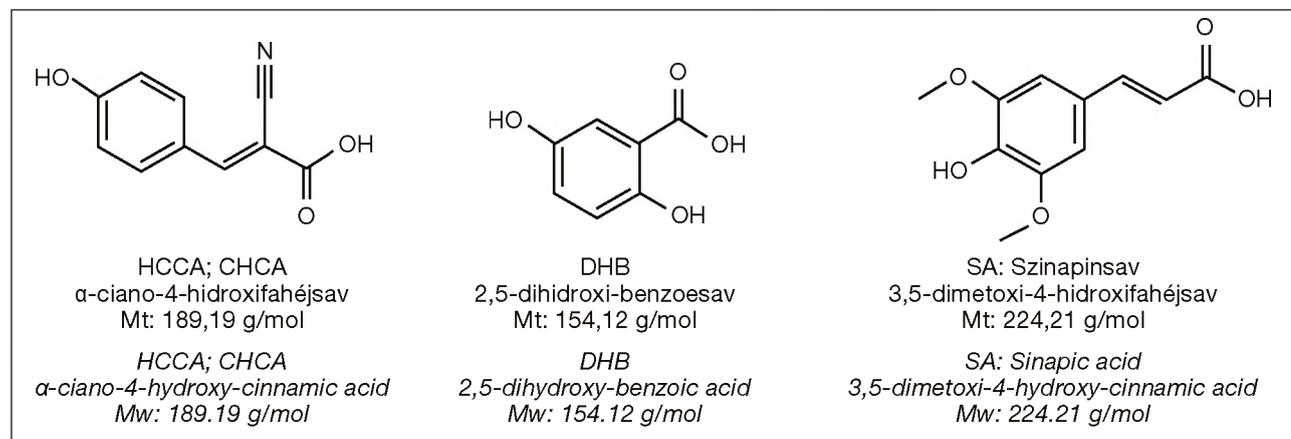
A speciálisan kialakított ionforrásban képződött ionokat nagyfeszültségű térrel felgyorsítják, fókuszálják, majd egy repülési csövön keresztül a detektorba juttatják. A repülési idő tömegspektrométer alkalmazása lehetőséget kínál a felgyorsított ionok tömeg szerinti elválasztására [13]. A MALDI-TOF berendezés egyszerűen és hatékonyan ad információkat a vizsgált minta makromolekuláiról, fehérjeprofiliájáról. A vizsgálat során rögzített tömegspektrum számos módon használható fel a makromolekulákkal kapcsolatos további következtetések levonására.

A kukorica tartalék fehérjéinek vizsgálata során a MALDI-TOF technikával kapott spektrum nem egy konkrét vegyület tömegspektruma, hanem a berendezés ionforrásban képződő, különböző tömegszámú ionok, azaz a vizsgált mintában található fehérjék protonált molekula ionjainak összessége. Ezért a spektrumban megjelenő valamennyi csúcs egy-egy fehérjének felel meg (**3. ábra**). A kukorica hibridek genetikai tisztaság vizsgálatakor a tartalék fehérjék, illetve az ezek közül kiválasztott marker fehérjék képezik a tisztaság vizsgálat alapját. Kutatásaink során nem találtunk olyan publikációt, amely MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel ellenőrizné a vetőmagminták genetikai tisztaságát, ezért célunk egy olyan új tömegspektrometriás módszer kidolgozása volt, amely a referencia módszert (UTL-IEF) kiválthatja, hatékonyabb, és a kritikus esetekben (gombával fertőzött szemek) is megfelelő eredményt szolgáltat.

### 3.5. Anyag és módszer

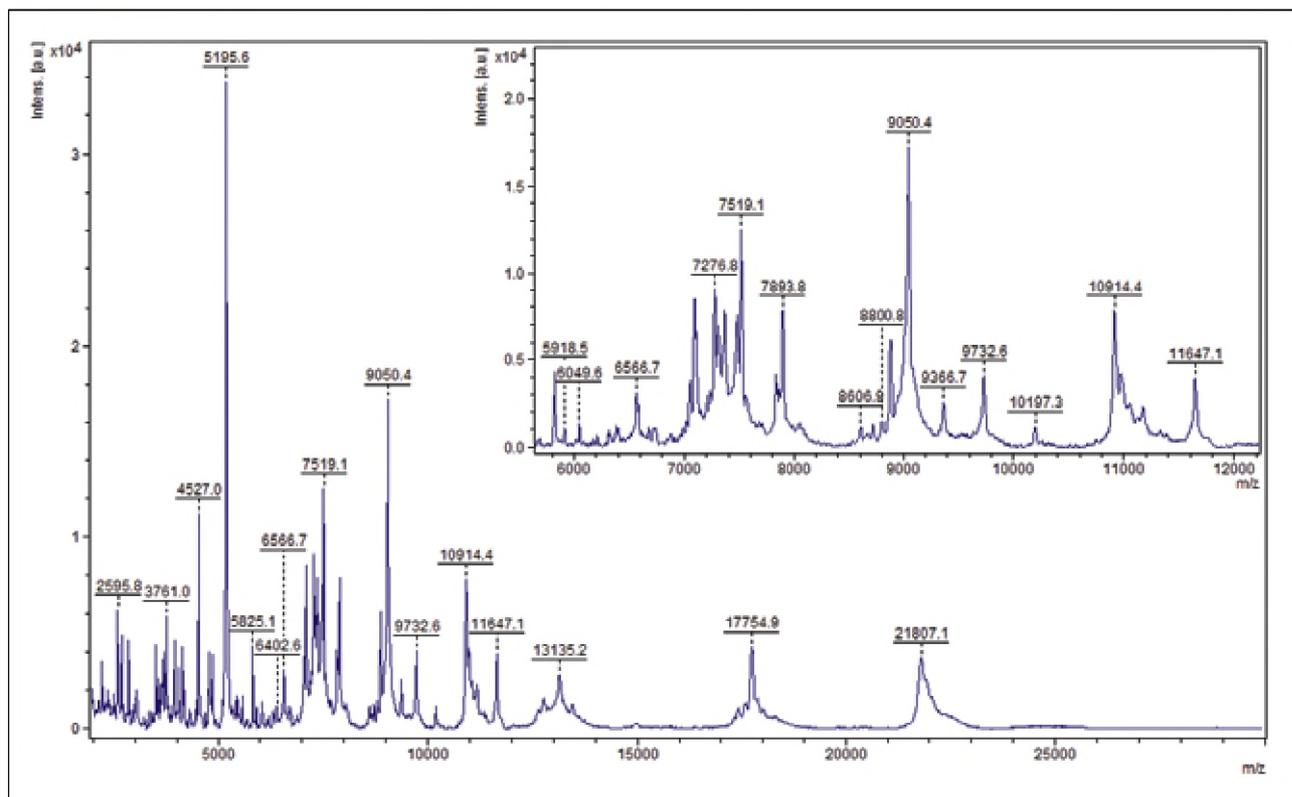
#### 3.5.1. Minták és minta-előkészítés

A vizsgált kukorica-vetőmagminták a nagy területen végzett szántóföldi hibridkukorica vetőmag előállít-



2. ábra: A MALDI-TOF-MS módszernél leggyakrabban alkalmazott mátrix vegyületek neve, szerkezeti képlete és molekulatömege (MW: molecular weight) [15]

Figure 2: Names, structural formulas and molecular weights (MW) of matrix compounds most commonly used in the MALDI-TOF-MS method [15]



3. ábra Egy hibrid kukorica 2-propanolos pufferrel készült extraktumának MALDI-TOF tömegspektruma  
Figure 3 MALDI-TOF mass spectrum of the 2-propanol buffer extract of a hybrid maize

tásból származtak. A vetőmagokat a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Vetőmagvizsgáló laboratóriumából kaptuk, tört, illetve egész szemes formában. A vizsgálati minták között voltak egészséges, gombával fertőzött és csávázott vetőmagok is.

Nemzetközi standard referencia módszerként az *International Seed Testing Association* (ISTA) szabályzatának 8. fejezetében előírt módszert vettük alapul [5]. Ez az ultravékony poliakrilamid gélen izoelektromos fókuszálással végzett gélelektroforézis (UTL-IEF, vagy rövidebben IEF). Ezt a módszert alkalmazza a NÉBIH Vetőmagvizsgáló laboratóriuma is, így az általuk rendelkezésre bocsátott vizsgálati eredményekhez, mint referencia értékekhez hasonlítottuk a MALDI-TOF módszerrel kapott mérési eredményeinket.

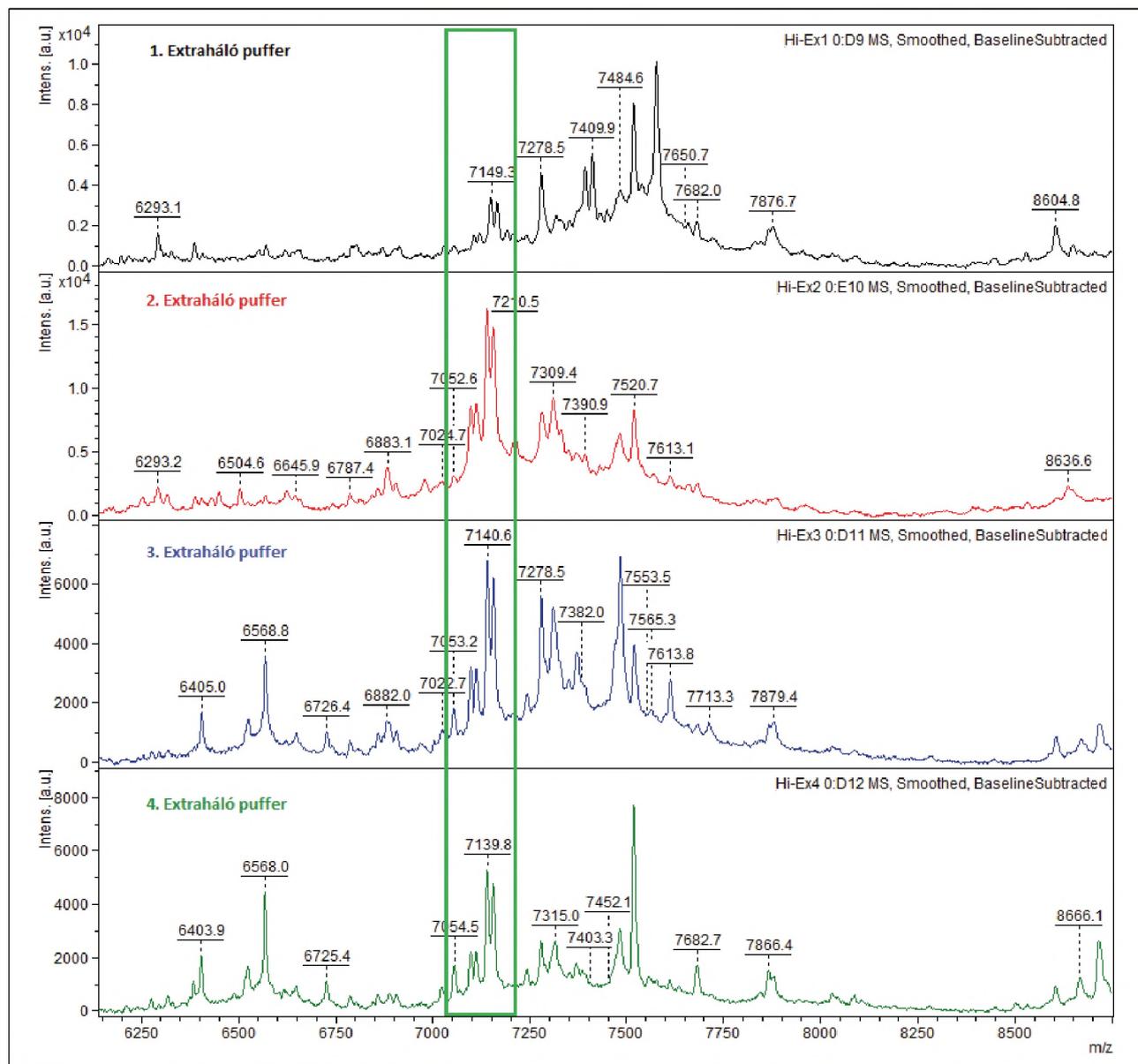
Mivel a MALDI-TOF vizsgálatokhoz első lépésben a kukoricaszemekből ki kellett vonnunk a fehérjéket, a kukorica vetőmagok genetikai tisztaságvizsgálata

előtt extrakciós előkísérleteket végeztünk, egyrészt a markerfehérjék kijelölésére, másrészt a vizsgálatokhoz legalkalmasabb extrahálószer kiválasztása céljából. A vizsgálatokat 25-50 darab kukoricaszemből készült átlagmintákból (ultracentrifugális daráló, 1 mm-nél kisebb szemcseméret) hajtottuk végre az esetleges genetikai inhomogenitásból adódó hibák elkerülése végett.

### 3.5.2. A marker fehérjék extrakciója, mintafelvitel, a tömegspektrumok felvétele

Az extrakcióhoz többféle extrahálószerrel használtunk: vizes nátrium-kloridos puffereket, illetve apolárosabb, alkoholos (1-propanolt, 2-propanolt, 2-klóretanolt tartalmazó) extraháló puffereket. Tapasztalataink azt mutatták, hogy a vizsgált fehérjék oldhatóságát a diszulfidhidakat megbontó, redukálószer (például dl-ditiotreitol – DTT) jelenléte is segíti, ezért az extrahálószerbe DTT-t is kevertünk (1. táblázat).

Extraháló puffer Extraction buffer	Nátrium-klorid koncentráció Sodium chloride concentration	dl-DTT koncentráció dl-DTT concentration	Alkohol koncentráció Alcohol concentration	Ecetsav koncentráció Acetic acid concentration
(1) Nátrium-klorid puffer Sodium chloride buffer	0.1 M	20 mM	-	-
(2) Savas nátrium-klorid puffer Acidic sodium chloride buffer	0.1 M	20 mM	-	0.1% (v/v)
(3) 1-Propanolos puffer 1-Propanol buffer	-	20 mM	50% (v/v)	0.1% (v/v)
(4) 2-Propanolos puffer 2-Propanol buffer	-	20 mM	50% (v/v)	0.1% (v/v)



4. ábra Egy hibrid kukorica extrakciós előkísérleteinek tömegspektrumai.  
Figure 4 Mass spectra of the preliminary extraction experiments of a hybrid maize.

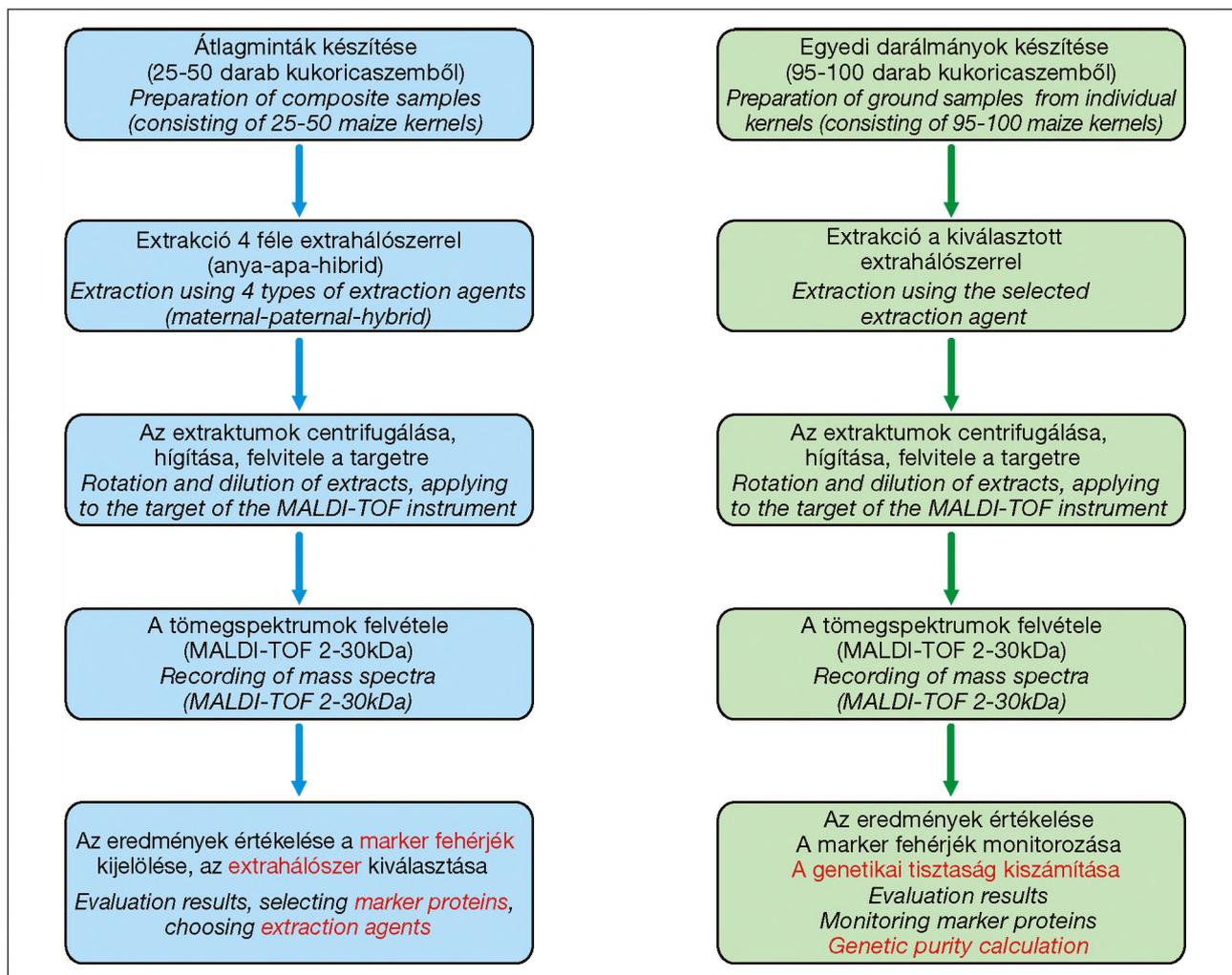
Mivel vizsgálatainkból az derült ki, hogy az extrahálószer jelentősen befolyásolja az extrahált fehérjék minőségét és mennyiségét, ezáltal a tömegspektrumban megjelenő fehérje csúcsok számát és intenzitását, előkísérleteink során többféle extrahálószerrel is kipróbáltunk. Amíg néhány hibridkukorica esetében a nátrium-kloridos pufferek voltak kedvezőek, addig más hibrideknél valamelyik alkoholos puffer adott értékelhetőbb eredményt. A fehérjespektrumok értékelése után döntöttük el, hogy a genetikai tisztaság vizsgálat során melyik extraháló szer-elegyet fogjuk alkalmazni.

A 4. ábrán egy hibrid kukorica extrakciós előkísérleteinek tömegspektrumai láthatók. Zöld kerettel emeltük ki a hibridre jellemző markerfehérjéket. Látható, hogy a markerfehérjék jel/zaj viszonya a 3. extraháló pufferben (1. táblázat) a legjobb, így ennek a hibridnek a genetikai tisztaság vizsgálatához ezt a keveréket választottuk.

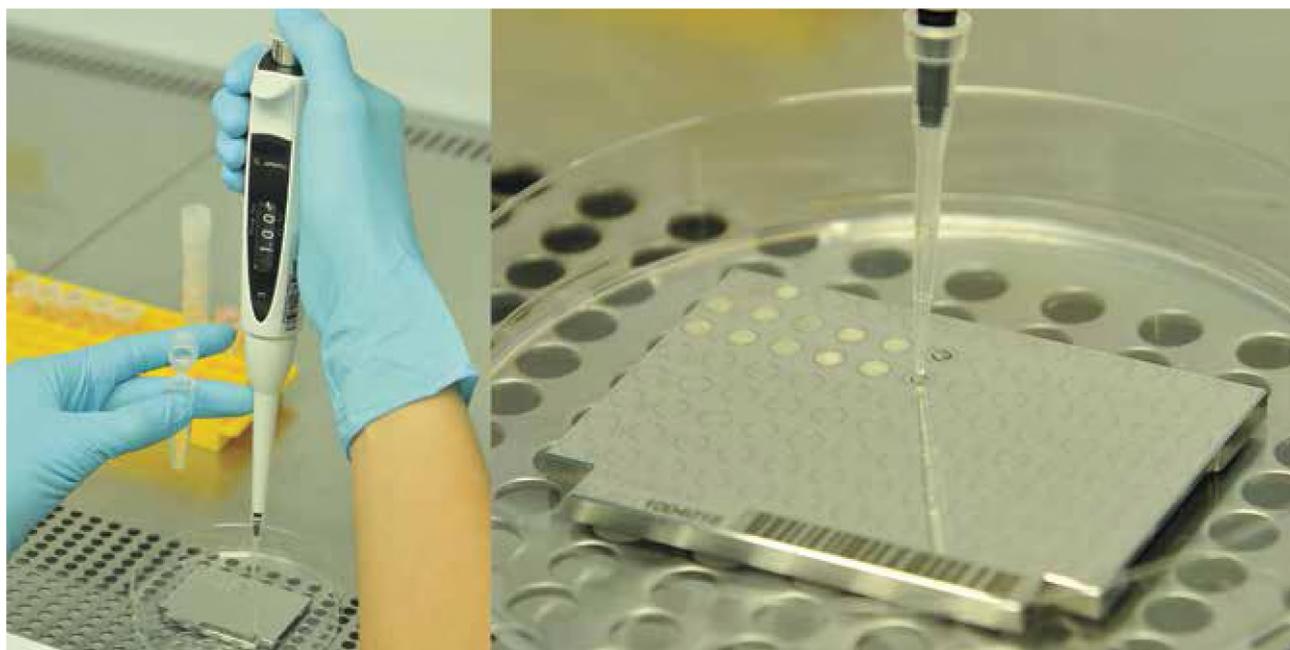
A genetikai tisztaságvizsgálatokhoz a kukorica hibrid vetőmagokból 95 - 100 egyedi szemből megfelelő szemcseméretű daralmányokat készítettünk, majd ezeket a mintákat kezeltük az előkísérletek eredményei alapján kiválasztott extrahálószerrel. Az 5. ábrán a genetikai tisztaság vizsgálat munkamenetét foglaljuk össze.

Az extraktumokat hígított állapotban, két párhuzamosan vittük fel a mintatartó lemezre. A nátrium-klorid puffereket acetonitrilrel, míg az alkoholos extraktumokat víz-acetonitril keverékkel hígítottuk. Az acetonitril egyrészt mintatartó lemezre (target-re) felvitt cseppek beszáradását, másrészt az alkoholos oldatok felvitelét segíti elő. A mátrixoldatot az extraktumok beszáradását követően cseppentettük fel a lemezre (6. ábra).

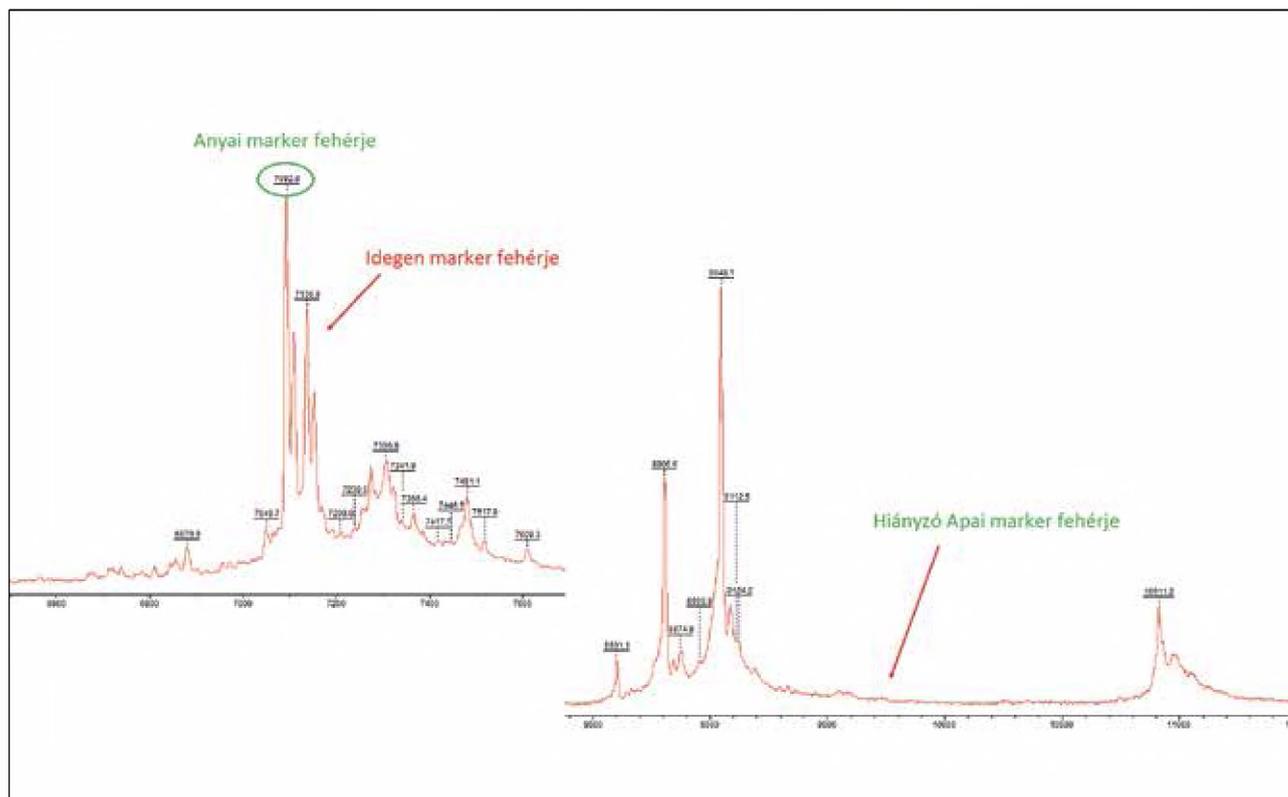
A tömegszám-kalibrációhoz szükséges standardot a mintatartó lemez meghatározott pozíciójára vittük fel. A referencia-standard kukorica vetőmagvizsgálá-



5. ábra A genetikai tisztaságvizsgálat folyamatábrája, az előkísérletek lépései az ábra bal oldalán (kék), míg a genetikai tisztaság meghatározás lépéseit az ábra a jobb oldalán (zöld) láthatók  
Figure 5 Flowchart of genetic purity testing, with steps of the preliminary experiments on the left (blue), and steps of genetic purity testing on the right (green)



6. ábra Az extraktumok felvitele a mintatartó lemezre  
Figure 6 Application of the extracts to the sample plate



7. ábra Hibás hibrid kukoricaszem fehérjeprofíja  
Figure 7 Protein profile of a faulty hybrid maize kernel

tok esetében megegyezik a mikroorganizmusok azonosításnál használt referencia anyaggal (*Escherichia coli* DH5).

Az extraktumok vizsgálatához *Bruker microflex LT* MALDI-TOF tömegspektrométert használtunk. Az előkészített mintatartó lemezt egy zsiliprendszeren keresztül juttattuk az ionforrásba. A vizsgálatokhoz használt paramétereket (vizsgált tömegszám tartomány, lézereenergia, a mintatartó lemez mozgató sémája) az általános műszervezrlő szoftver (*flexControl – Bruker Daltonics*) segítségével állítottuk be. Ugyanezzel a programmal hajtottuk végre a tömegszám- kalibrációt is (repülési idő vs. tömegszám függvény paramétereinek meghatározása).

Ezek után az extraktumok tömegspektrumainak felvételét a készülék automatikusan végezte az általunk megadott sorrendben. Minden mintahelyről a 2 - 30 kDa tartományban minimum 640 egyedi tömegspektrumot készítettünk, amelyekből a szoftver egy összesített tömegspektrumot rögzített.

### 3.5.3. A mérési adatok feldolgozása, a tömegspektrumok értékelése

A mérési adatok feldolgozásához a *flexAnalysis* (*Bruker Daltonics*) szoftvert alkalmaztuk, amelyben lehetőség van egyszerre több, akár 50 - 60 tömegspektrum egy idejű feldolgozására is. A *flexAnalysis* segítségével első lépésben a tömegspektrumokon néhány egyszerű műveletet végeztünk el (zajszűrés - simítás, alapvonal korrekció, a tömegspektrumban

megjelenő csúcsok maximumainak megkeresése - a csúcsok tömegszámainak azonosítása). Ezt követően az egyes kukoricaszemek extraktumaiban, tömegspektrumaiban tömegszámaik alapján azonosítottuk az elővizsgálatok során kiválasztott markerfehérjéket, azokon keresztül pedig a „hibás” szemeket. Az apai vonal markerfehérjéinek hiánya, illetve az anyai vonal fehérjeprofíljának jelenléte önbeporzásra utal. Az anyai vonaltól eltérő fehérjeprofíli idegen szem jelenlétére utal (7. ábra).

### 4. A genetikai tisztaságvizsgálat eredményei

A hibridek eltérő genotípusos hátterei különböző mértékű genetikai tisztaságot eredményeznek. A legtöbb vetőmag esetén ezek az értékek a javasolt határértéken (> 97%) belül maradtak. A vetőmag-minősítés során kötelező vizsgálni a csírázási képességet, és a növénykórtani állapotot is. A genetikai tisztaság vizsgálata ugyanakkor nem kötelező, de a vetőmag-forgalmazók kiegészítő módszerként végzik, vagy végeztetik az arra alkalmas laboratóriumokkal. A fentebb említett határértéket a forgalmazók írják elő. A gyakorlat szerint az esetek többségében a 97-98%-os genetikai tisztaságú vetőmagtétel tekinthető megfelelő minőségűnek.

Munkánk során olyan kódjelzett kukoricahibrideket vizsgáltunk, amelyek genetikai tisztaság vizsgálati eredményeit ismertük, amelyeket a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal (NÉBIH) Vetőmagvizsgáló laboratóriuma bocsátott rendelkezésünkre. A NÉBIH szakemberei a hibridek genetikai tisztaság ellenőrzé-

sét az általánosan ismert referenciamódszerrel – ultravékony poliakrilamid gélen végzett izoelektromos fókuszálással (UTL-IEF – röviden IEF) – végezték el. Ennél az eljárásnál referencia géleket készítettek (apa – anya – hibrid), amelyek alapján megállapították a hibridek fehérjemintázatának hasonlóságát, illetve az eltérés okát, amely lehet önbeporzás, idegen termékenyülés, illetve idegen szem jelenléte a vetőmagtételben. A referenciamódszerrel végzett vizsgálatok megismételhetőségének egyik alapvető feltétele a megfelelő mintavétel, vagyis a vetőmagtétel minősítéséhez végzett vizsgálatok számára véletlenszerűen vett minták összetétele az alapsokaságra nézve reprezentatív kell, hogy legyen. A laboratóriumi mintát homogenizálni kell.

Kutatásunk egyik fő célja az volt, hogy az egészséges vetőmagok vizsgálatán túl, a gombafertőzött vetőmagok MALDI-TOF módszerrel történő genetikai tisztaság vizsgálatát is kidolgozzuk, mivel az ilyen szemek a referencia IEF módszerrel kapható vizsgálati eredményei szerfelett bizonytalanok.

A referencia UTL-IEF módszer alkalmazásakor a NÉBIH szakemberei 2 x 96 db kukoricaszemet vizsgáltak, ugyanakkor mi a MALDI-TOF módszerrel vetőmag-tételenként csak 96 db szemet analizáltunk, mert tudni akartuk, hogy kevesebb kukoricaszem feldolgozása esetén is hasonló eredményeket kapunk-e, mint amilyenek a referencia módszer eredményei. Az összehasonlító adatokat a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

A **2. táblázat** adatai azt mutatják, hogy – még kevesebb kukoricaszem feldolgozása esetén is – a MALDI-TOF technikára kidolgozott módszerünkkel kapott eredményeink igen jól egyeznek a referencia módszerrel (UTL-IEF) kapott eredményekkel. A gombafertőzött minták (5 g és 6 g) vizsgálata a referenciamódszerrel nem adott értékelhető eredményt, így

azok vizsgálati adatait nem lehetett összehasonlítani a nagyműszeres technikával kapott eredményekkel. Az összehasonlítható eredmények közti minimális eltérések két okra vezethetők vissza:

1. A genetikai tisztaság számításánál (GT (%) = hibás szemek/vizsgált szemek\*100) a kapott tisztasági érték nem azonos szemszámot magában foglaló vizsgálati mintából származott, ami kis mértékben növelte a tisztasági értékek közötti számított különbséget.
2. A két különböző vizsgálatához az adott hibridkukorica vetőmag tételből eltérő populációt választottunk ki a NÉBIH által vizsgált mintához képest;

Megjegyezzük, hogy a gombafertőzött vetőmagtétel (5 g és 6 g) esetében a referencia módszerrel nem állt rendelkezésünkre értékelhető genetikai tisztaság eredmény.

A továbbiakban a MALDI-TOF technikára kidolgozott vizsgálati módszerrel kapott tömegspektrumokat és az azokról leolvasható következtetéseket ismertetjük be.

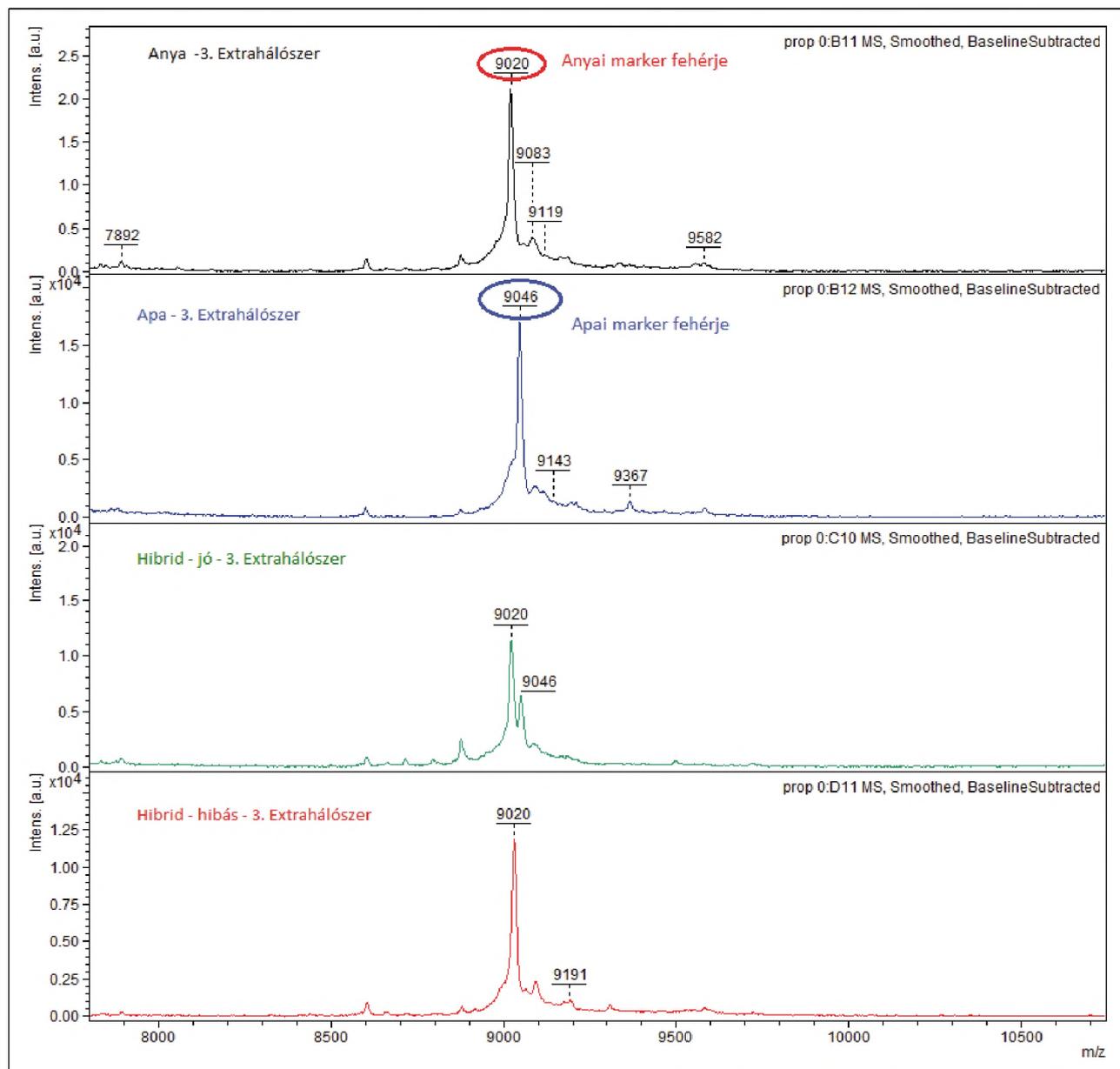
A **8. ábrán** egy kétvonalas hibridre jellemző marker fehérje-pár tömegspektruma látható. Megfigyelhető, hogy a genetikailag nem-megfelelő „hibás” szem esetén az apai markerfehérje hiányzik, ami ön vagy idegen termékenyülés lehetőségére utal. A vizsgálatok során előfordult olyan eset is, amikor egyik markerfehérje sem jelent meg a tömegspektrumban, ilyenkor az valószínűsíthető, hogy fajtaidegen szem került a vizsgálandó mintapopulációba. A **9. ábrán** ugyanennek a hibridnek a gél-fotóját is bemutatjuk. A gél képén látható, hogy az UTL-IEF referencia módszerrel még egészséges szemek esetében sem egyszerű az értékelést elvégezni.

2. táblázat Hibrid kukorica vetőmagtétel genetikai tisztaság vizsgálatának összehasonlító táblázata.

A g-vel jelölt vetőmagtétel láthatóan gombafertőzött kukoricaszemeket is tartalmaztak.

Table 2 Comparative table of the genetic purity test results of hybrid maize seed batches. Fungus-infected corn kernels were visible in seed batches marked with a g.

Hibrid vetőmagtétel sorszáma Serial number of hybrid seed batch	Genetikai tisztaság IEF módszerrel GT (%) (2x96 szemből) Genetic purity by the IEF method GT (%) (from 2x96 kernels)	Genetikai tisztaság MALDI-TOF technikával GT (%) (96 szemből) Genetic purity by the MALDI-TOF technique GT (%) (from 96 kernels)	Az IEF módszerrel és a MALDI-TOF technikával kapott eredmény aránya Ratio of the results obtained by the IEF method and the MALDI-TOF technique
1	98.4%	97.9%	1.005
2	98.4%	99.0%	0.994
3	96.0%	96.9%	0.991
4	79.0%	76.1%	1.038
5	100.0%	99.0%	1.010
5g	Nem értékelhető Cannot be evaluated	97.9%	-
6	96.5%	94.8%	1.018
6g	Nem értékelhető Cannot be evaluated	95.8%	-



8. ábra Egy hibrid kukorica genetikai tisztaság vizsgálatának tömegspektrumai.  
A genetikailag nem-megfelelő „hibás” szem esetén hiányzik az apai marker fehérje (9046 Da)  
Figure 8 Mass spectra of the genetic purity testing of a hybrid maize.  
In the case of the genetically inadequate, “faulty” kernel, the paternal marker protein is missing (9046 Da)

A kukoricaszemek gombás fertőzése, megbetegedése, zavarhatja a referencia módszerként alkalmazott UTL-IEF módszerrel kapott gél képének értékelését. Ennek alátámasztása végett a **10. ábrán** egy gombafertőzött hibrid kukorica UTL-IEF referencia módszerrel kapott gél-fotóját közöljük.

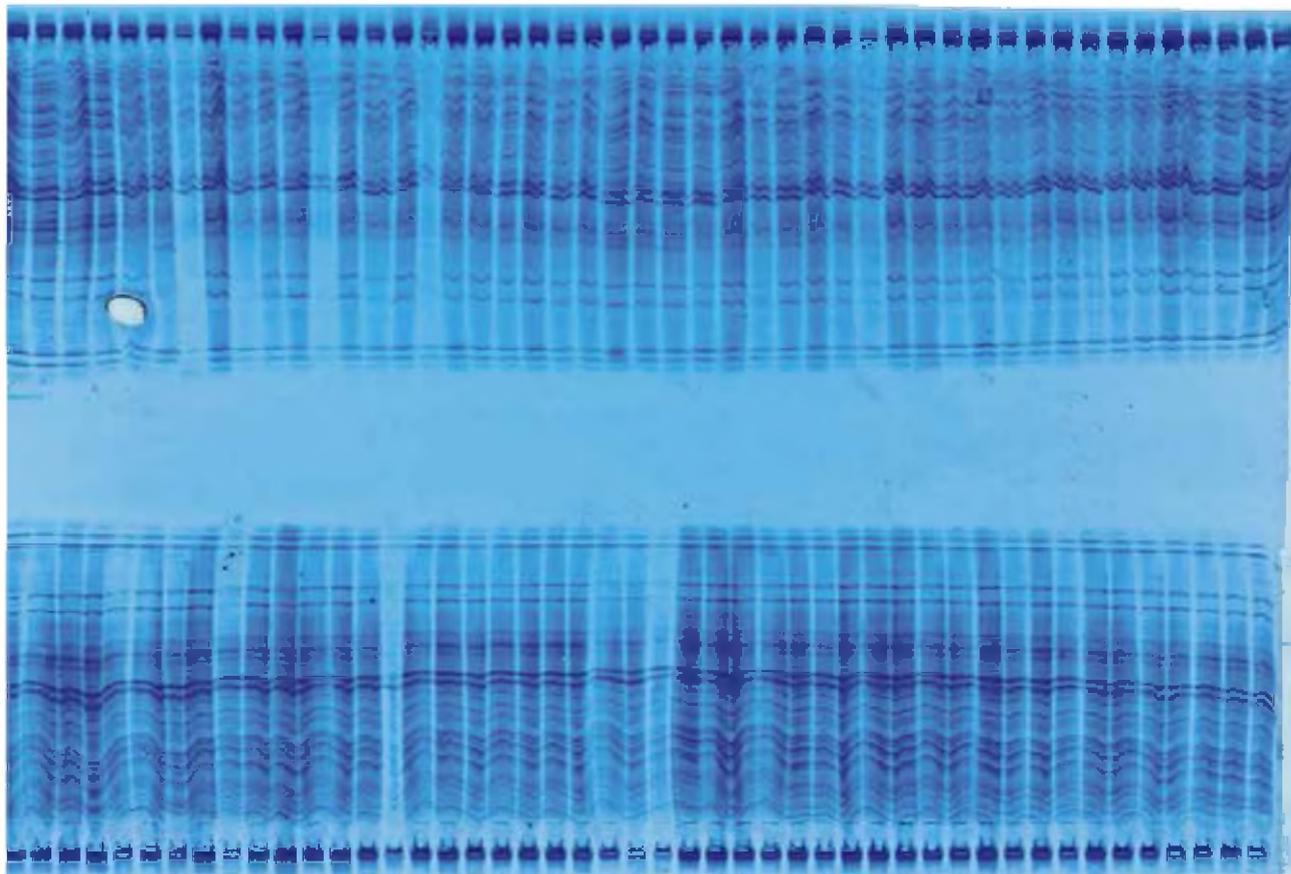
A **10. ábrán** a gyakorlott szakember számára feltűnhet, hogy a gélkromatogramon egyes fehérjék sávjai eltűnnek, mások megjelennek. Ez a jelenség a referenciamódszer alapelvéből következik. Az izoelektromos fókuszalásos gélelektroforézis (IEF) ugyanis, olyan kényszeráramoltatási módszer, amely a fehérjéket izoelektromos pontjaik szerint választja el. Az elválasztást amfoter elektrolitokból (amfolitokból) álló keveréket tartalmazó poliakrilamid gélen végzik. Az amfolitok a gélben elektromos erőter hatására vándorolnak, miközben pH-gradienst alakítanak ki. Ami-

kor egy fehérje eléri az izoelektromos pontjával (pI) megegyező pH-értékű gélfraakciót, töltése semlegesítődik, és nem vándorol tovább.

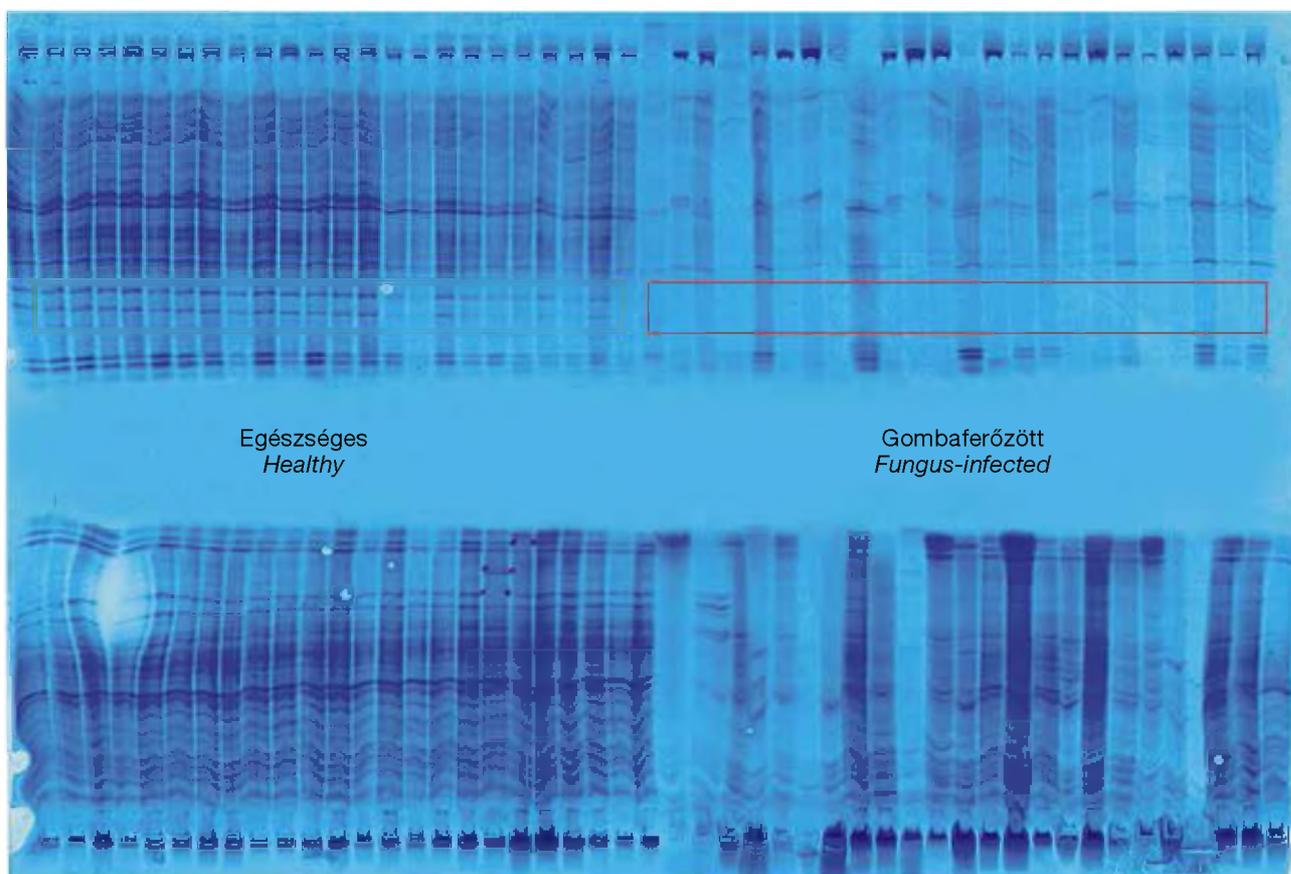
Mivel a MALDI-TOF technikával végzett vizsgálatok eredményeit az extraktum pH-ja nem befolyásolja, a fentebb említett hatás nem érvényesül. Ennek megfelelően a gombafertőzött kukoricaszemek vizsgálata során markerfehérjék profiljában nem tapasztaltunk **változást (11. ábra)**.

## 5. Következtetések

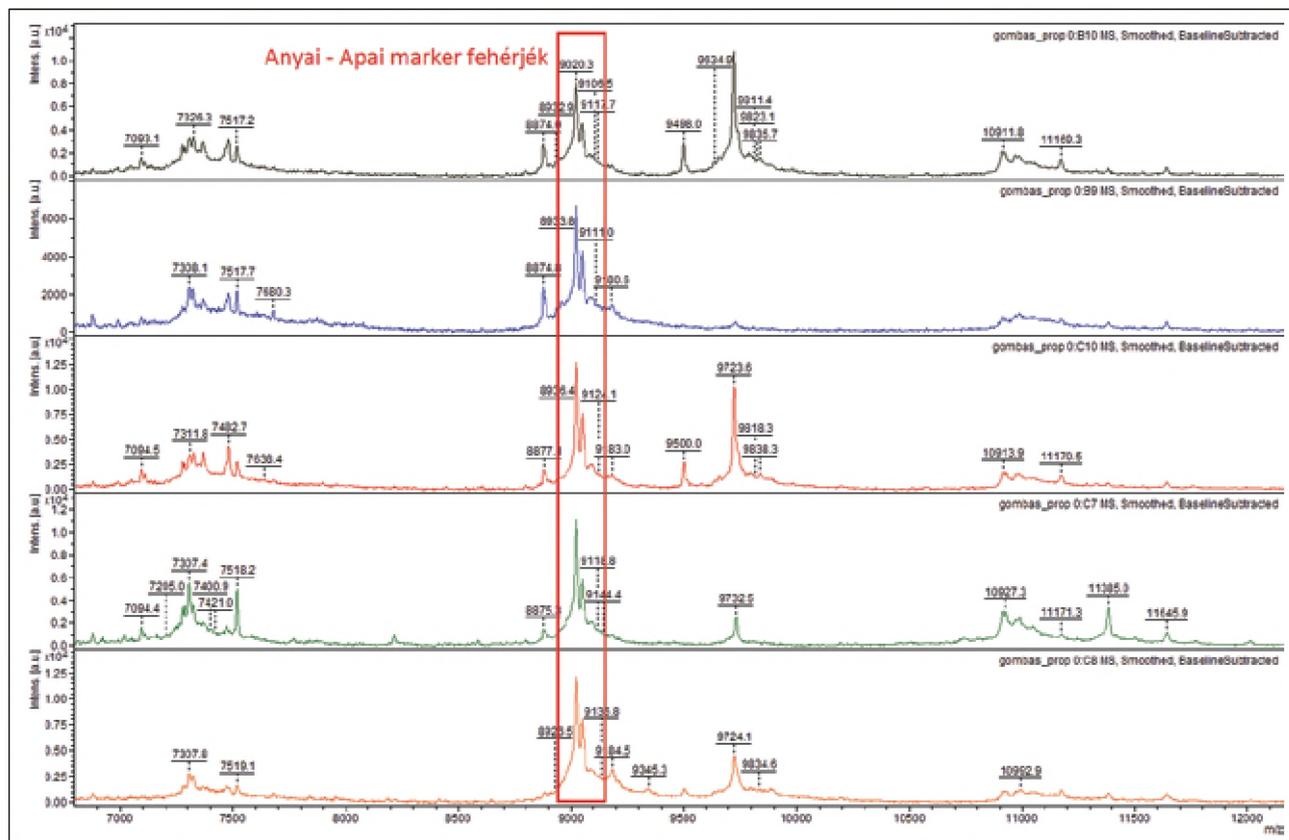
Eddigi eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az egészséges hibrid kukoricaszemek esetén a MALDI-TOF technikával végzett vizsgálataink eredményei kielégítő egyezést mutatnak a referenciamódszer eredményeivel. MALDI-TOF tömegspekt-



9. ábra Egy hibrid kukorica genetikai tisztaság vizsgálatának gél-fotója.  
Figure 9 Gel photo of the genetic purity testing of a hybrid maize.



10. ábra Egy gombafertőzött hibrid kukorica genetikai tisztaság vizsgálatának gél-fotója.  
Figure 10 Gel photo of the genetic purity testing of a fungus-infected hybrid maize.



11. ábra Néhány gombafertőzött hibrid kukoricaszem MALDI-TOF tömegspektruma.  
Figure 11 MALDI-TOF mass spectra of several fungus-infected hybrid maize kernels.

rometriás módszerünkkel lehetőségünk van arra, hogy tartalékfehérje profilokat elemezzünk, azaz kukorica-hibrid minták esetén a szemekből meghatározuk a genetikai tisztaságot.

A referenciamódszerrel történő vizsgálatok során a tartalék fehérjék extrakciójához csak néhány extrahálószer alkalmazható (víz, 2-klóretanol). A MALDI-TOF módszer esetében számos extrahálószer, adalékot (nátrium-klorid, di-DTT) alkalmazhatunk annak érdekében, hogy a marker fehérjék extrakciója a lehető legnagyobb hatásfokú legyen. Tapasztalataink szerint a kukoricaminták esetében a tartalékfehérjék, illetve a markerfehérjék az alkoholos extraháló pufferben oldódnak ki a legnagyobb arányban. Az alkoholos extraktum a referenciamódszerrel azonban nem vizsgálható.

A MALDI-TOF technikára kidolgozott módszerünk sokkal egyszerűbb és gyorsabb, mint az ultravékony poliakrilamid gélen végzett izoelektromos fókuszálás (UTL-IEF), mivel az eredmények értékelését egy szoftver támogatja, illetve a digitálisan tárolt eredmények visszakereshetősége, újra értékelése is számos előnyt rejt magában a hagyományos vizsgálati technikához képest. A módszer érzékenységének köszönhetően a kis mennyiségben jelen lévő markerfehérjéket is ki tudtuk mutatni.

Kísérleteink a gombafertőzött szemek vizsgálatára is kiterjedtek. A gombafertőzöttséget az adott szemeknél a referencia módszer (IEF) alkalmazásával is fel-

lehet ismerni. A gélekromatogramon azonban a jellemző fehérjesávok (markerek) eltűnnek és elmosódott képet mutatnak, így ennek alapján az adott szem genetikai tisztaságát nem lehet kellő biztonsággal meghatározni. A gombafertőzés általunk egyelőre ismeretlen módon befolyásolja az izoelektromos fókuszálással történő gélen való futtatást. Ezért úgy véljük, hogy a gombafertőzött kukorica-vetőmag tételek vizsgálata a referencia módszerrel nem lehetséges. Mivel a gombafertőzés a MALDI-TOF technikával végzett vizsgálat eredményét nem befolyásolja, ez a módszer megoldást jelenthet a fertőzött tételek ellenőrzésére is. Kísérleteink során számos fertőzött kukoricaszemet is vizsgáltunk. A tömegspektrumokon minden esetben jól láthatók voltak a markerfehérjék. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a gombafertőzés a tartalékfehérjék profiljában nem okoz változást. Elmondható, hogyha egy szem gombafertőzött, attól függetlenül genetikailag még megfelelő lehet. A vizsgált kukorica vetőmagtétel között gombafertőzés ellen kezelt (csávázott) tételek is voltak, amelyek vizsgálata szintén nem jelentett nehézséget az általunk kidolgozott módszerrel.

A hibrid kukoricák MALDI-TOF technikával végzett genetikai tisztaságvizsgálata során kapott adatok (tömegspektrumok) alkalmasak a fajtaazonosság meghatározására is. A MALDI-TOF nyújtotta szoftveres háttérrel, az adatokból olyan adatbázis is építhető, amely a későbbiekben segítheti a megbízható fajtaazonosítást, ami a fajtavédelem szempontjából elengedhetetlen feltételt jelent.



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only*

## 6. Irodalom

- [1] László, E., (1994): Biológiai és élelmiszeripari technológia II. Budapesti Műszaki Egyetem Vegyészmérnöki Kar. Műegyetemi Kiadó.
- [2] Watson, S. A., Ramstad, P. E., (1987): Corn: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0-913250-48-1.
- [3] Hajósné Novák Márta (1999): A genetikai variabilitás vizsgálata tartalékfehérjékkel In:; Hajósné Novák Márta, Genetikai variabilitás a növénynevelésben (szerk). Mezőgazda Kiadó, Budapest 17. 21. p.
- [4] Osborne, T. B. (1987): The amount and properties of the proteins of the maize kernel. J Am Chem Soc 19: 525-528. p.
- [5] ISTA (1992): „Handbook of Variety Testing-Electrophoresis Testing” 8. fejezet.
- [6] Wilson, C. M. (1987): Proteins of the kernel. In: Watson, S. A.- Ramstad, P. E. (eds). Corn: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, 273-310. p.
- [7] Bietz, J. A. (1983): Biochem. Genet. 20: 1039-1053. p.
- [8] Dworschak, R.G., Ens, W., Standing, K.G., Preston, K.R., Marchylo, B.A., Nightingale, M.J., Stevenson S.G., Hatcher, D.W. (1998): Analysis of wheat gluten proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 33: 429-435. p.
- [9] Gianibelli, M.C., Larroque, O., MacRitchie, F., Wrigley, C.W. (2001): Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. Cereal Chem. 78: 635-646. p.
- [10] Marchylo, B.A., Lukow, O.M., Kruger, J.E. (1992): Quantitative variation in high molecular weight glutenin subunit 7 in some Canadian wheats. J. Cereal Sci. 15: 29-37. p.
- [11] Tanaka, K. (2002): The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irridiation, Nobel lecture, December 8, 2002
- [12] Ghirardo, A. (2004): Determination of wheat quality during the development of the grain using MALDI-TOF mass spectrometry and multivariate data analysis. MSc thesis. Technical University of Denmark. 140 p.
- [13] Cameron, A.E., Eggers, D.F. (1948): An Ion „Velocitron”, The Review of Scientific Instruments Vol. 19. Number 9, September
- [14] A MALDI-TOF tömegspektrométer elvi felépítése: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) (Hozzáférés: 2015. 06. 12.)
- [15] A MALDI-TOF-MS módszernél leggyakrabban alkalmazott mátrix vegyületek neve, szerkezeti képlete és molekulatömege (MW: molecular weight): [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) (Hozzáférés: 2015. 06. 12.)
- [16] M. Karas, F. Hillencamp (1988): Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons, Anal. Chem. 60, 2299.
- [17] Turner, J. E., Boundy, J. A., Dimler, R. J. (1965): Zein: A heterogeneous protein containing disulfide-linked aggregates. Cereal Chem. 42:452.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only