

Lab-on-a-chip technika alkalmazása búzafehérje vizsgálatokban

Balázs Gábor, Nádosi Márta és Tömösközi Sándor

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott
Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék

Érkezett: 2007. március 12.

Búzafehérje vizsgálatok módszertanának áttekintése

A búzaliszt funkcionális és technológiai minősége szempontjából a búzaszemben található tartalékfehérjék meghatározó szerepet játszanak. A fehérjék mennyisége, összetétele és minősége a fajtától és a termesztési körülményektől függően változik, és hatással van a búzából előállított végtermékek minőségére.

A fehérjék jellemzése régóta foglalkoztatja a kutatókat. Jacopo Beccari (1745) a Bolognai egyetem professzora osztotta fel elsőként a búzafehérjéket vízben oldható és nem oldható részekre. A vízben nem oldható fehérjéket Einhoff (1805) alkoholban oldódó és nem oldódó részre választotta szét, és hasonló frakciókat tudott megkülönböztetni az árpa és a rizs vizsgálata során is. A mai napig használt, oldhatósági tulajdonság alapján történő csoportosítást Osborne (1907) végezte el, egymást követő extrakciókkal.

A búzafehérjék jellemzésére jelenleg számos, különböző elven működő analitikai módszer áll rendelkezésünkre.

A spektroszkópiai módszerek közül az infravörös spektroszkópiát (IR) ma már rutinszerűen alkalmazzák a búza beltartalmi értékeinek, így például fehérjetartalmának meghatározására. Ezt az teszi lehetővé, hogy az infravörös tartományban a fehérjék több jellegzetes abszorpciós csúccsal rendelkeznek. A technika alkalmazása gyártásközi ellenőrzések során egyre elterjedtebb, de például a spektrum által szolgáltatott információ nem elégséges búzafajták megkülönböztetésére. Búzafehérjék vizsgálatánál alkalmazott spektroszkópiai technika a CD (Circular Dichroism) is. A fehérje alegységek CD spektrumát a fehérjék másodlagos szerkezetének pontosabb megismerésére használják (Shewry és Lookhart, 2003).

Az elválasztástechnikai eljárások közül a gélkromatográfiát a 60-as évek óta a fehérjekémiában rutinszerűen alkalmazzák. Felhasználják a fehérjék elválasztására sóktól és kismolekulájú anyagoktól, illetve – a fehérjék eltérő molekulásúlya, vagy oldhatósága alapján – frakcionálásra is. A

preparatív műveleteken kívül ez a technika az analitikai célú eljárásokban is alkalmazható, így például fehérjekészítmények homogenitásának ellenőrzésénél és izolált fehérje molekulaméretének meghatározásakor. Búzafehérjék esetében a gélszűrést elsőként Huebner és Wall (1974) alkalmazta glutenin alegységek szétválasztására.

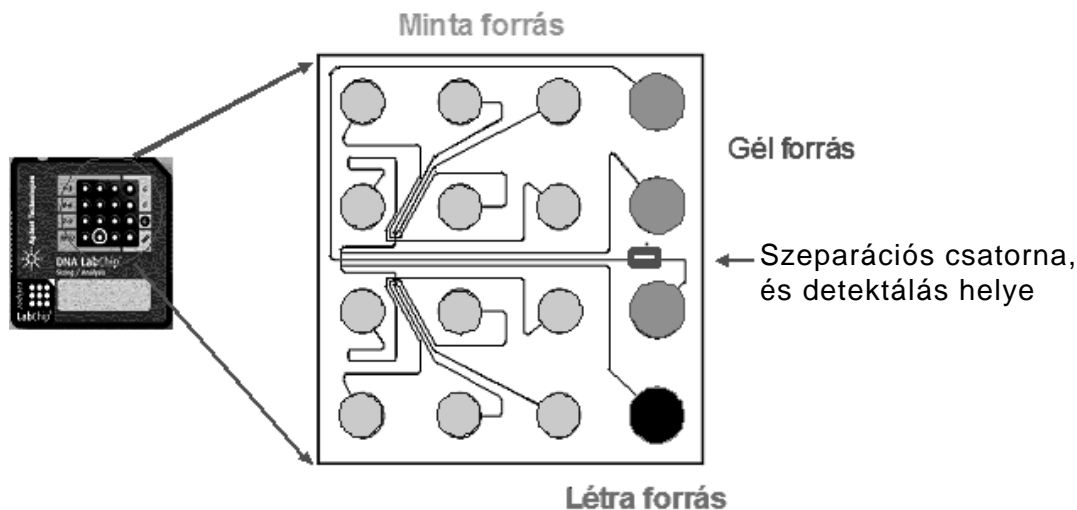
A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) térhódítása előtt az ioncserés kromatográfia (IEC) volt a legjobb szeparációs lehetőség gabonafehérjék szétválasztására a kromatográfia területén (Shewry és Lookhart, 2003). A későbbiekben a fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC) jobb felbontást és jobb reprodukálhatóságot biztosított a búzafehérjék vizsgálatában. RP-HPLC-vel elsősorban a gliadinok választhatóak szét a hidrofóbítás alapján (Bietz, 1983). Az elválasztott frakciók elemzésével a fajták közötti eltérés is vizsgálható. A módszer elterjedt, a kanadai búzafajták RP-HPLC adataiból katalógus is készült. Búzafehérje vizsgálatok során alkalmazott kromatográfias eljárás továbbá a méretkizárásos kromatográfia (SE-HPLC) is, melynek segítségével a glutenin-gliadin arány könnyen meghatározható (Bietz, 1985).

A búzafehérjék jellemzésekor széles körben elterjedt módszernek számít a gélelektroforézis. A savas poliakrilamid gélelektroforézist (A-PAGE) a gliadinok és a monomer fehérjék (albumin globulin) elválasztására használják. Na-dodecil-szulfát-ot (SDS-PAGE) Laemmli (1970) módszere alapján főleg a gluteninek meghatározásakor alkalmaznak (Bushuk és Khan, 1977). Izoelektromos fókuszálással (IEF) olyan pH-gradiens hozható létre, amelyben a fehérjék addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő tartományt. A jobb felbontáshoz kifejlesztettek 2D-s elválasztási technikákat is. Ilyen az IEF X SDS-PAGE vagy a nem egyensúlyi pH gradienses elektroforézis (NEPHGE) X SDS-PAGE (Payne és mtsai, 1985). A felsoroltakon túlmenően a nagy hatékonyságú kapilláris elektroforézis (HPCE) is alkalmazott elektroforézises mérés technika a búzafehérjék elválasztásában. A fehérjealapú búzafajta azonosításhoz legtöbbször gélelektroforézist alkalmaznak.

Az immunanalitikai eljárások (western blot, ELISA) esetében specifikus antitesttel lehetséges egy adott fehérje kimutatása. Mivel a legtöbb immunológiai reakció a gliadinokhoz köthető a búzaszemben, ezért a búzafehérjék ilyen típusú vizsgálatai főképpen a gliadin specifikus immunreakción alapulnak.

Lab-on-a-chip technika ismertetése

A modern elválasztástechnika egyik fejlesztési iránya a hitelkártya nagyságú "analitikai laboratórium", a laboratory on a chip, lab-on-a-chip, LOC (Manz és mtsai, 1990) kialakítása. A kapilláris elektroforézisből továbbfejlesztett mikrochip technikával a mikro vagy nanoliternyi nagyságrendű minták elemzése üveg- vagy műanyaglapokba maratott, legfeljebb néhány centiméter hosszúságú kapillárisokban történik (1. ábra). A miniaturizálás során előnyös, hogy kis minta- és reagens-mennyiséggel kell dolgoznunk. Emellett a többsatornás chipek – a korábbi módszerekkel szemben – az elválasztást gyorsabbá teszik (Guttman, 2004).



1. ábra: Egy lab-on-a-chip felépítése (Zalkai, 2006 alapján)

A kapilláris csatornákhöz elektródok csatlakoznak, melyek változó nagyságú és polaritású elektromos teret hozhatnak létre. Így a minta és a pufferoldat mozgása elektrokinetikus szabályozott a chipen belül. Az elválasztáshoz a mintaforrásba helyezett anyag kis részét használják fel. A szeparáció a minta azon részével valósul meg, ami a chip feltöltése után a két csatorna (minta és szeparációs csatorna) kereszteződésében helyezkedik el. Az elválasztási művelet alatt a lab-on-a-chipek egyszerre működhetnek biokémiai reaktorként, injektorként, elválasztó rendszerként és egyes esetben frakciószedőként is.

Mivel a kapillárisban lévő molekulák nagy része a kapilláris falának közelében helyezkedik el, ezért felületi jelenségek, kölcsönhatások határozzák meg az elválasztás mechanizmusát. Így az ún. elektroosztatikus áramlás jelensége lép fel. Ez dugószerű áramlásprofil jelent, ami az elválasztástechnika magas szelektivitását vetíti előre.

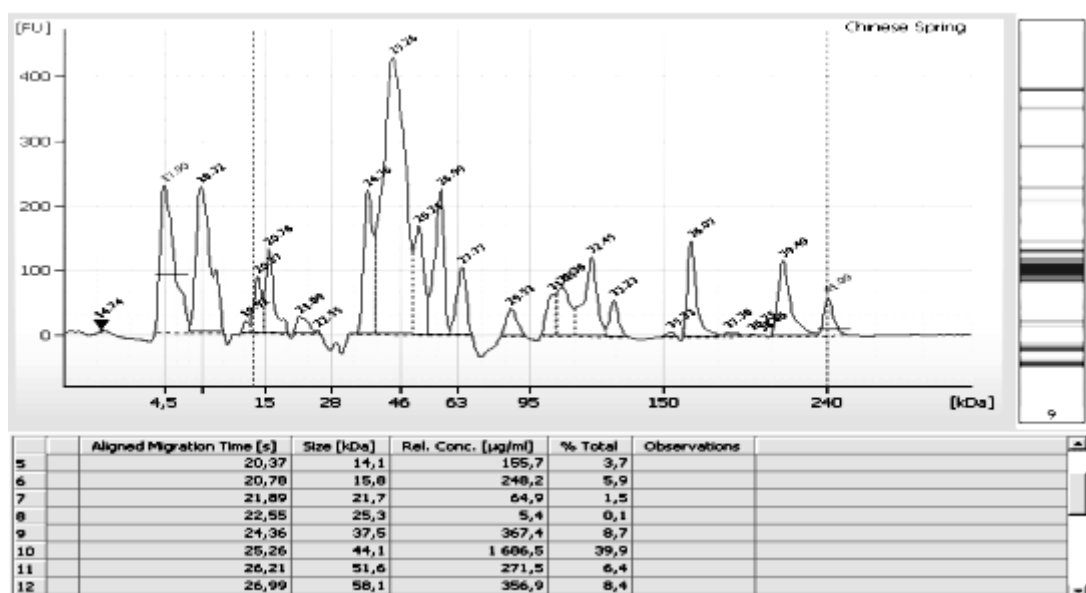
A nagy analízissebességnek, a kedvező szelektivitásnak, a reprodukálhatóságnak és az automatizálhatóságnak köszönhetően a kémiai chipeket egyre szélesebb körben alkalmazzák a genomika és proteomika területén.

Lab-on-a-chip technika egyes analitikai teljesítményjellemzőinek meghatározása

Vizsgálataink során célul tűztük ki a lab-on-a-chip technika alkalmazási lehetőségének vizsgálatát a búzafehérjék jellemzésében. Első lépésben az elválasztástechnika egyes analitikai jellemzőinek meghatározását és a mérési eljárás részleges validálását végeztük el.

Az ismételhetőségi vizsgálatok során az irodalomban részletesen jellemzett Chinese Spring búzafajtát használtuk standardként, amely az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetéből, Martonvásárról érkezett.

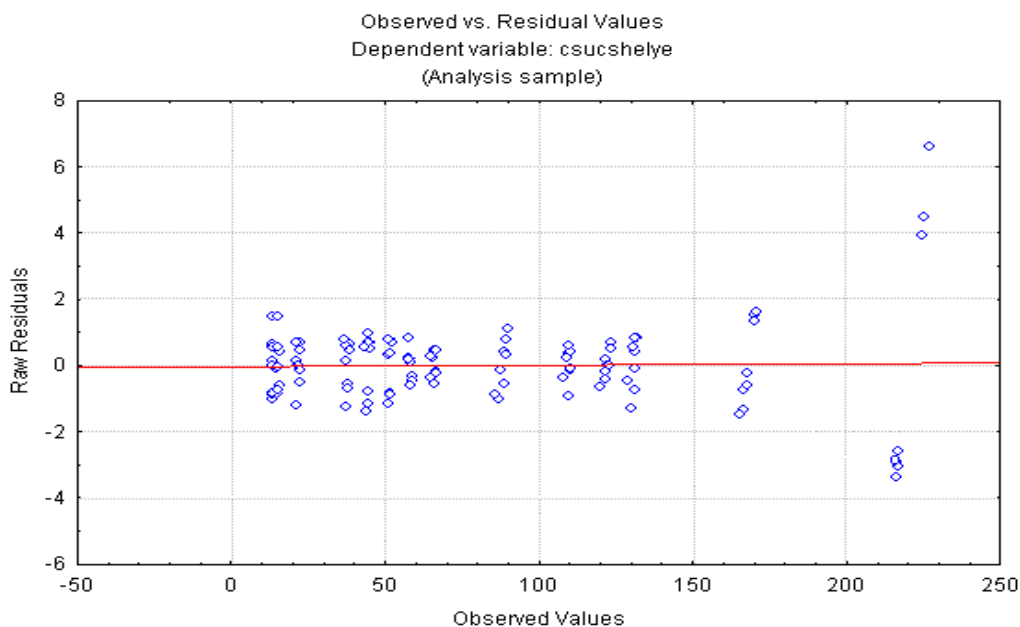
A mintát mikromalommal (FQC2000; Gyártó: Metafém Szövetkezet, Budapest) őröltük. A teljes őrleményből a fehérjéket 1% SDS-t és 1% DTT-t tartalmazó oldattal extraháltuk ki. A mintákat ezután meghatározott ideig vízfürdőbe helyeztük, majd centrifugálással tisztítottuk. Az így előkészített minta-oldatokat, gyári reagenseket (Protein 230 Kit) használva, Agilent Protein 230-as chipen, Agilent 2100 Bioanalyzer típusú készüléken futattuk. Az eredményeket a 2100 expert szoftver (Version: B.02.02.SI238) értékeli, amelyeket elektroferogramként, szimulált gélképként, illetve számszerűen is megkapjuk (2. ábra). Az elektroferogramon első csúcsként az alsó marker látható, amit a kettős csúccsal rendelkező rendszer jel (system peak) követ. A mérési tartomány 14 kDa-tól a felső marker megjelenéséig, 240 kDa-ig tart.



2. ábra: Chinese Spring elektroferogramja lab-on-a-chippel

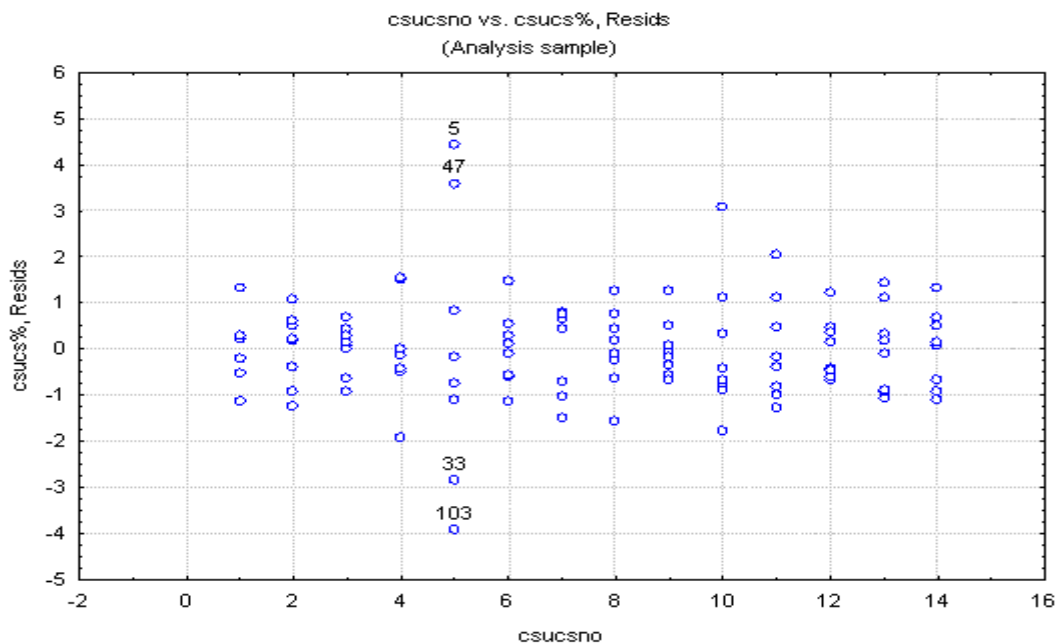
A kísérletekben alkalmazott fehérje-chipek, az SDS-PAGE-hez hasonlóan, a mérési tartományban a fehérje alegységeket méret alapján választják szét. A mérés első lépéseként a készülék egy ún. létrát (standardot) futtat le, ahol ismert méretű fehérjék retenciós ideje alapján a minták fehérjealegység összetételének profilja azonosítható. A mérést segíti, hogy a mintához adott mintapuffer a denaturáló oldat mellett az alsó és a felső markert belső standardként tartalmazza, aminek felhasználásával az esetleges áramlási problémákból adódó csúszások korrigálhatóak. A detektálás lézer indukált flouresszenciával (LIF) valósul meg.

Az eredmények kiértékelése során első lépésként az elválasztástechnikai módszer analitikai paramétereit vizsgáltuk. A minőségi információk, azaz a retenciós időből számolt méreteloszlás elemzésével megállapítottuk, hogy a fehérjealegységek méretének legnagyobb relatív szórása nem haladta meg az 1%-ot, átlagértékük pedig 0,32% volt. A mérési eljárás ismételhetőségét vizsgálva, a mérést (beleértve a mintaelőkészítést) többször megismételve a legnagyobb relatív szórás is 2,5% alatt volt. Az eredményeket STASTICA 7.0 programmal is elemeztük; varianciaanalízist végeztünk. A fehérjealegységek méretének varianciája a párhuzamos mérések során $0,57\%^2$ volt. A legnagyobb szórás az utolsó csúcs elhelyezkedésénél van, amit a rezídium értékek mutatják (3. ábra). Ez a módszer kiemelkedően jó ismételhetőségét mutatja, összehasonlítva például a hagyományos SDS-PAGE ismételhetőségi jellemzőivel.



3. ábra: Fehérje alegységek méretének rezídium értékei a lab-on-a-chippel végzett ismételhetőség vizsgálatánál

A minőségi információkhoz tartozó mennyiségi értékeket is elemeztük. Az aleggységek relatív mennyiségi értékei az ismételt mérések során nagyobb, de elfogadható szórást mutattak. A variancia az ismételt elvégzett mérések során $1,49\%^2$ volt. A legnagyobb eltérést az ismétlések között a mennyiségi értékekben a legnagyobb koncentrációban megjelenő fehérjealegység esetében lehetett tapasztalni (4.ábra).



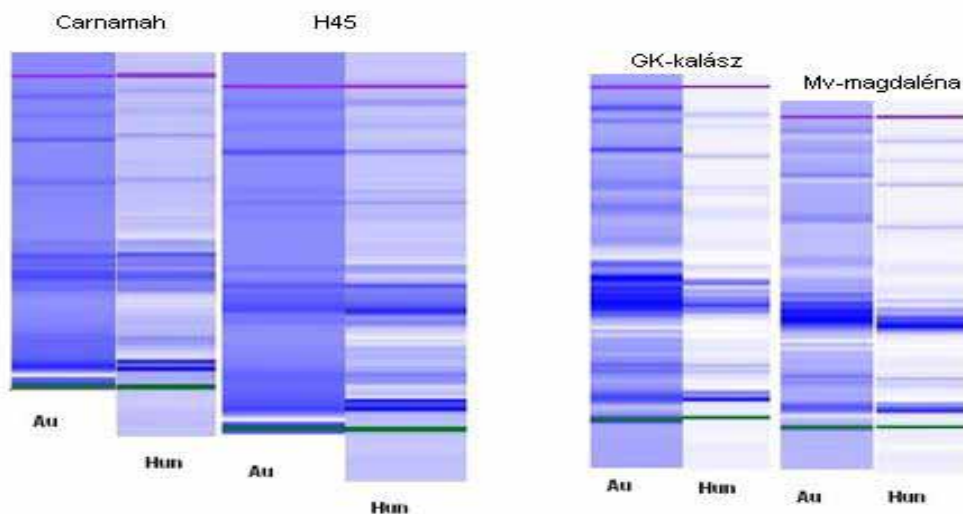
4. ábra: Fehérje aleggységek mennyiségének rezídium értékeia a lab-on-a-chipen végzett ismételtetőségi vizsgálatánál

Külföldi laboratóriummal (Food Science Australia) együttműködve, ausztrál és magyar búzafajtákat használva, vizsgáltuk a mérés reprodukálhatóságát is (5. ábra). Az eredményeket összehasonlítva megállapítottuk, hogy ugyanazon fehérjealegységeket tudtuk meghatározni, de egyes mérések esetén a jellegzetes aleggységek folyamatosan növekvő elcsúszást mutatva jelentek meg. A mennyiségi értékek páros t-próbát végezve megegyezőnek bizonyultak.

Lab-on-a-chip alkalmazása búzafajták azonosításában

Célunk a közeljövőben, hogy a mérési körülményeket felülvizsgálva a lab-on-a-chip technikával végzett gabonafehérje elválasztást validáljuk és különböző laboratóriumokban is megfelelően standardizálható módszerré tegyük. Összegezve megállapíthatjuk, hogy a lab-on-a-chip technika a jelenleg alkalmazott elválasztástechnikai módszerekhez képest gyors, kis minta- és vegyszer-igényű, megfelelő analitikai jellemzőkkel rendelkezik és a mérési protokoll kidolgozásával rutinszerűen alkalmazható olyan növényi minták fehérjeösszetételének vizsgálatában, mint például az általunk

vizsgált búza. A különböző búzafajták eltérő genotípusa a DNS expresszió során szintetizálódó fehérje-alegységek összetételén is nyomon követhető. Az alegységek eltérő minőségi és mennyiségi értékei lehetővé teszik az eltérő fajták azonosítását. A fajtaazonosítás jelenleg legelterjedtebb módszerei a búza fehérje-alegységeinek vizsgálatán alapulnak (gélelektroforézis, HPLC). Az alkalmazott módszerek kivétel nélkül szakértelmet és hosszú vizsgálati időt igényelnek (Wrigley, 1995).



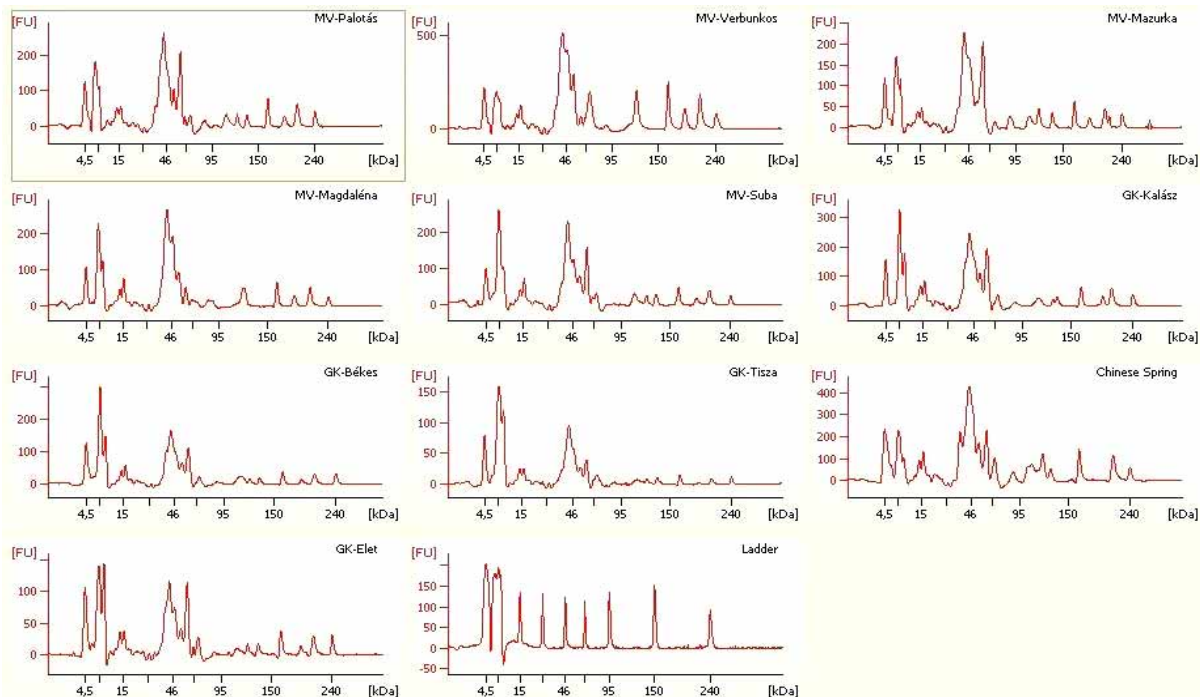
5. ábra: Ausztráliában és a BME Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszékén lab-on-a-chippel mért búzafajták gélképeinek összehasonlítása

Meg kell említenünk a nem fehérjealapú fajtaazonosítási módszereket is. A digitális képanalízissel (DIA) a szemek morfológiája és színe vizsgálható, amely olyan termeltetői rendszerben nyújt jó megoldást a fajtaazonosításra, ahol a termelt fajták száma alacsony (USA, Kanada). A fenol-tesztet manapság – gyorsvizsgálatként – csupán fajtakeverékek észlelésére használják. A patogén rezisztencia-vizsgálat idő-, eszköz- és szaktudás-igényes. A fajtaazonosítási vizsgálatokat a búza DNS-ének izolálása után a polimeráz láncreakció (PCR) teszi lehetővé. A molekuláris markerek használatával a közeli nemesítési útvonalak is jól azonosíthatóak, de a vizsgálatok rutinszerű alkalmazása jelenleg nem megoldott.

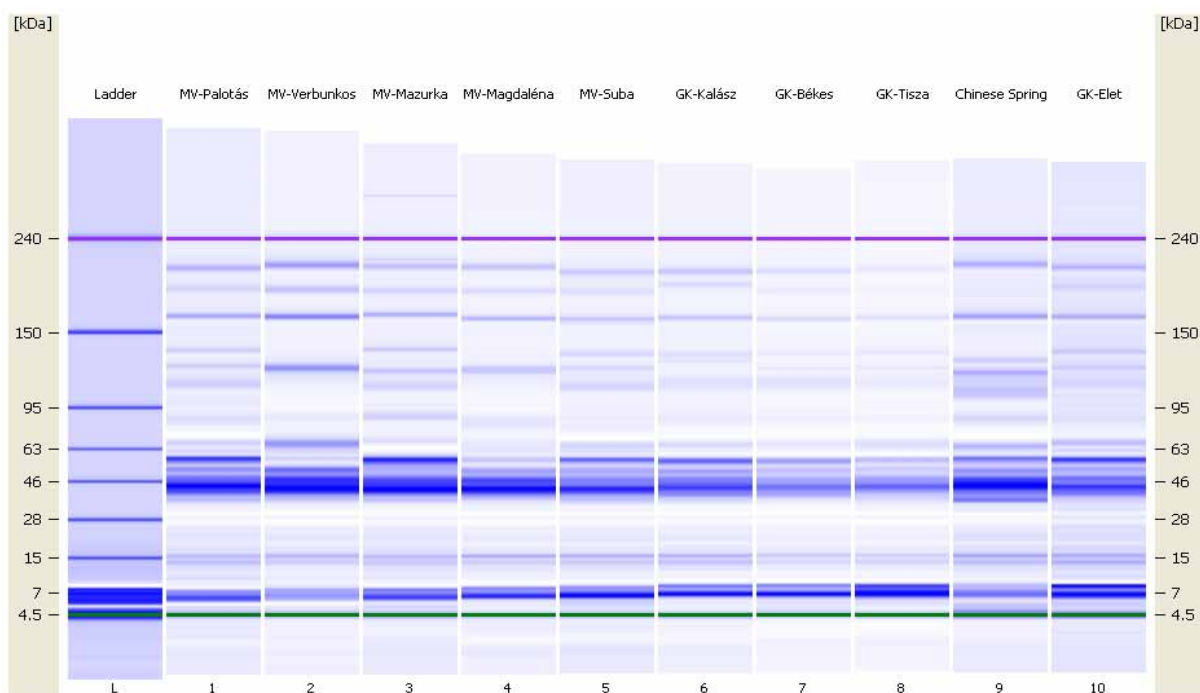
A minősítési gyakorlat számára olyan megoldás szükséges, ami rövid vizsgálati időt és megbízható eljárást jelent. Ezen a területen erre adhat lehetőséget a lab-on-a-chip bevezetése (Bhandari és mtsai, 2004; Uthayakumaran és mtsai, 2004; 2005; 2006). A lab-on-a-chip technikával célunk egy magyar búzafajtákon alapuló, rutinszerűen alkalmazható fajtaazonosítási rendszer kialakítása.

Munkánk során 90 búzafajtát vizsgáltunk (10 magyar búzafajta jellegzetes elektroferogramját a 6. ábra, szimulált gélképét a 7. ábra

mutatja). A 90 fajta tartalmazza a Magyarországon köztermesztésben levő fajták jelentős részét. A búzamintákat az OMMI (Budapest) és az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet (Martonvásár) bocsátotta rendelkezésünkre.



6. ábra: magyar búzafajták elektroferogramjai lab-on-a-chippel



7. ábra: magyar búzafajták gélképei lab-on-a-chippel

Az elvégzett mérések után a fajtaazonosításhoz a jelenlegi munkában a minőségi információk, vagyis a megjelenő fehérje-alegységek kalibrációs összefüggés alapján meghatározott mérete került feldolgozásra. Az

eredményeket fajtánként rendeztük és egy adatmátrixot hoztunk létre. Az így létrehozott rendszerben mind a 90 búzafajta megkülönböztethető volt egymástól. Az automatikus azonosításhoz egy makro és egy felhasználóbarát kezelőfelület is készült. A makro a bevitt mérési eredményt összehasonlítva az adatbázisban található értékekkel megadja a teljesen vagy leginkább hasonló fajta nevét.

A visszamérések alapján a program több mint 80%-ban sikeresen azonosította a fajtát. A későbbiekben lehetséges lesz azonos fajtájú, de eltérő helyen és különböző körülmények között termesztett minták vizsgálatával növelni az azonosítás robusztusságát. Ezen túlmenően a makro fejlesztéséhez a mennyiségi információk is figyelembe vehetőek a fajtaazonosítás során.

Összegzésképpen megállapítható, hogy a lab-on-a-chip technikával nyert fehérjealegység-profil elegendő információt ad a fajták megkülönböztetésére. A korábban megállapított analitikai teljesítményjellemzők ismeretében így ez a technika alkalmasnak bizonyult a fajtaazonosításra, és szoftvertámogatással egy gyorsan, hatékonyan végrehajtható mérési protokoll dolgozható ki.

A fehérjevizsgálatok gyakorlati körülmények közötti alkalmazásának elterjedését a módszerek komplexitása, a szaktudás-igény és a hozzáértést igénylő vegyszerek alkalmazása is gátolta. Ezért a lab-on-a-chip ezen a területen megoldást jelenthet. A gyakorlati alkalmazás mellett az eddig elért eredmények megalapozzák az eljárás kutatómunkában történő használatát is. Tanszékünkön jelenleg a környezeti és a termelési körülmények hatását vizsgáljuk a lab-on-a-chip által kapott fehérjealegység-profilra vonatkozóan. Ezen túlmenően a lab-on-a-chip technika a búza mellett természetesen más növényi minták fehérje összetételének jellemzéséhez is bizonyára felhasználható.

Felhasznált irodalom:

- Bhandari, D.G., Church, S., Borthwick, A., Jensen, M.A. (2004): Automated varietal identification using Lab-on-a-chip technology. 12. ICC Cereal & Bread Congress. Herogate, Anglia
- Bietz, J.A. (1983): Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **255**, 219
- Bietz, J.A. 1985. High performance liquid chromatography: How proteins look in cereals. *Cereal Chem.* **62**, 210-212
- Bushuk, W., Khan, K. (1977): Studies of Glutenin, IX. Subunit Composition by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis at pH 7.3 and 8.9. *Cereal Chem.* **54**, 588-596

- Guttman, A. (2004): Miniaturizálás az elválasztástechnikában: Elektroforézis mikrochipek alkalmazása a modern bioanalitikában. In Memoriam Professor Horváth Csaba
- Huebner, F. R. and Wall, J. S. (1974): Wheat glutenin subunits. I. Preparative separation by gel-filtration and ion exchange chromatography. *Cereal Chem.* **51**, 228-240
- Lookhart, G. L. and Wrigley, C. W. (1995): Variety Identification by Electrophoretic Analysis. In: Wrigley, C.W. 1995. Identification of Food-Grain Varieties. American Association of Cereal Chemists
- Manz, A. et al. (1990): Miniaturized total chemical analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B* 1, 244–248
- Shewry, P.R., Lookhart G. L. (2003): Wheat Gluten Protein Analysis, AACCC, inc
- Payne, P. I., Holt, L.M., Jarvis, M.G. and Jacson, E.A. (1985): Two diemsional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): Biochemical and genetic studies. *Cereal Chem.* **62**, 319-326
- Uthayakumaran, S., Batey, I.L., Wrigley, C.W. (2004): Efficient identification of glutenin subunits in wheat by Lab-on-a-chip capillary electrophoresis. In: Black, C.K., Panozzo, J.F.,
- Uthayakumaran, S., Batey, I.L., Wrigley, C.W. (2005): On-the-spot identification of grain variety and wheat-quality type by Lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Journal of Cereal Science* **41** (3), 371-374
- Uthayakumaran, S., Baratta M. Batey, I.L., Wrigley, C.W. (2006): Identification of Wheat Varietes and Glutenin
- Zalka, A. (2006): Agilent 2100 Bioanalyser „Lab-on-a-chip” csúcsminőség a molekuláris biológiában (előadás kézirat)

Köszönetnyilvánítás:

Köszönjük a Kromat Kft. munkatársainak, Dr. Zalka Annának és Dr. Andrásfalvy Mártonnak a szakmai közreműködést és a készülékháttér biztosítását, Dr. Uthayakumarannak és munkatársainak (Food Science Australia) a szakmai együttműködést, valamint Dr. Bezúr Lászlónak, Dr. Kemény Sándornak, és Dr. Örsi Ferencnek (BME) az adatok értékelésében nyújtott segítséget.

A környezet és a termelési körülmény hatását vizsgáló kutatómunkát az NKTH a Gazdaságorientált Agrárágazati Kutatások programban támogatja a Pannon minőségű búza fejlesztési program, GAK-ALAP-001262004.