

MALDI-TOF módszer alkalmazhatóságának vizsgálata napraforgó genetikai azonosság vizsgálatokban

¹Bojté Csilla – ²Lovász Csaba – ³Lajkó László – ⁴Timár Eszter – ²Micsinai Adrienn – ⁵Tóth Szilárd

¹Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Doktori Iskola, Debrecen

²Wessling Hungary Kft., Budapest

³Phytopatent Kft., Budapest

⁴NÉBIH NKI Központi Vetőmagvizsgáló Laboratórium, Budapest

⁵Fleischmann Rudolf Kutatóintézet, Kompolt

csillabojte1990@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

Gazdasági szempontból az egyik legfontosabb kultúrnövényünk a napraforgó, és termesztésének szempontjából nélkülözhetetlen a kiváló minőségű vetőmag. Mivel a vetőmag minősítés feltételeit és a minősítési paramétereket törvények, rendeletek írják elő, a termelőknek és a vetőmag előállítóknak nagyon fontos a kétes eredetű vagy gyenge minőségű vetőmagok kiszűrése.

Napjainkban a napraforgó fajtatisztaságának vizsgálatára referencia módszerként az International Seed Testing Association (ISTA) szabályzatának 8. fejezetében szereplő módszert alkalmazzák rutinszerűen, amely nemzetközi standard referencia módszer ultra vékony poliakrilamid gélen végzett izoelektromos fókuszálás (UTL-IEF, vagy röviden IEF).

Jelen munkában célul tűztük ki a referencia módszerrel kapott vizsgálati eredményekhez, mint referencia értékekhez hasonlítani a mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF) módszerrel kapott mérési eredményeket azzal a szándékkal, hogy egy újszerű, gyors, olcsó és megbízható módszer kerüljön kifejlesztésre. A cikk célja, az előkísérletek adataira alapozott feltérési módszer kidolgozása a vizsgálataink további fejlesztése céljából. Az eddigi kísérleteink során arra következtetésre jutottunk, hogy a négy extraháló szer közül NaCl savas puffer, 1-Propanolos puffer használatával kaphatunk legtöbb markerfehérjét.

Kulcsszavak: vetőmag, MALDI-TOF, genetikai tisztaság, napraforgó

SUMMARY

Economically, one of our most important crop is the sunflower. Regarding its production it is essential to use top quality seeds. As the conditions of seed certification and the certification parameters are regulated by laws and ordinances, it is highly important to farmers and seed producers to detect seeds of low quality or dubious origins.

Nowadays, the examination of the cultivar homogeneity of sunflower is based on a reference method of the International Seed Testing Association Rules International (ISTA), Chapter 8. This standard reference method uses ultrathin polyacrylamide isoelectric focusing gel electrophoresis (IEF-UTL, or simply IEF). With this work we have set out to compare the results of MALDI-TOF to the test results – used as reference results – achieved by this reference method. The aim is to develop a new, quick, cheap and reliable method. In this article I summarized the results of some of the experiments that will provide basis for my further work.

During our previous experiments we have concluded that out of four extracting agents we can get the most protein markers using NaCl acid buffer, 1 propanol buffer.

Keywords: seed, MALDI-TOF, genetic purity, sunflower

BEVEZETÉS

A Föld lakossága folyamatosan növekszik. Jelenleg hozzávetőleg 7,3 milliárd főt számolnak. Egyes adatok szerint azonban, ezt a növekedési ütemet követve 2050-re eléri a 9 milliárdot bolygónk népessége (Popp et al. 2015).

A népességnövekedés szükségszerűen magában hordozza az élelmiszerigény emelkedését is. Évente nagyjából 36 millió ember hal meg éhezés miatt közvetlenül vagy ezzel összefüggésben kialakult betegségek következtében (Latharn 1997, Gasperini és Maguire 2001). Ezen probléma megoldásának egyik kulcsa az agrárgazdaság egészének, valamint különböző területeinek folyamatos tanulmányozása, fejlesztése. A kukorica és búza után a harmadik legnagyobb területen termesztett szántóföldi növényünk a napraforgó, mely az egyik legfontosabb és kiemelt gazdasági jelentőséggel bíró kultúrnövényünk. Termesztése színvonalának emeléséhez is nélkülözhetetlen a kiváló mi-

nőségű vetőmag előállítása. A fajtatulajdonosok, a termelők, illetve a termelők szempontjából nagyon fontos a kétes eredetű vagy gyenge minőségű vetőmagok kiszűrése. A vetőmagtermesztés során egy tétel akkor kaphat Vetőmagminősítő Bizonyítványt (amely a forgalomba hozatal feltétele) ha megfelelő genetikai tisztasággal rendelkezik. Ehhez a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal NÉBIH általánosan az izoelektromos fókuszálást (IEF) (ISTA, vetőmag szövetség hivatközös) alkalmazza, amely a minta esetleges gombabetegséggel való fertőzöttségét is eltérő genotípusként mutatja ki, így a vetőmagtétel kizárásra kerülhet. A MALDI-TOF módszer nagyobb érzékenysége révén az esetleges genetikai szennyezettség és a gombabetegséggel való fertőzöttség nagyobb biztonsággal elkülöníthető. Így a nagy értékű vetőmagtétel a gombás fertőzöttség miatti kizárástól megmenthető. Kukorica esetében a módszer már alkalmazásra került, azonban a napraforgónál szükséges a fejlesztés. Az Európai Unió jogszabályaival összhangban a növényfajták kereske-

delmi forgalmazását Magyarországon a növényfajták állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról és forgalmazásáról szóló 2003. évi LII. törvény és végrehajtására kiadott FVM (például 48/2004 rendelet) (Net1) – Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium – által kiadott rendeletek szabályozzák. Magyarországon csak a Nemzeti Fajtajegyzékben és az EU fajtalistán szereplő növényfajok fajtáinak minősített vetőmagját lehet forgalomba hozatal céljára előállítani, forgalmazni, illetőleg áruterjesztési célra felhasználni. A vetőmagot külön jogszabályban meghatározott követelmények szerint kell minősíteni. A minősítés eredményéről igazoló okiratot kell kiállítani.

A vetőmagminősítés tehát a vetőmag forgalmazásának feltétele, melynek részfolyamatai a következők:

1. származási igazolás,
2. szántóföldi ellenőrzés,
3. mintavétel,
4. fémzárolás,
5. fajtaazonosító kitermesztés,
6. minőséget igazoló okirat kiadása.

A vetőmag minősítése során e részfolyamatokat végezzük el, így nyomon követhető az előállított vetőmag minősége, illetve ellenőrizhető, hogy a vetőmag előállítása során a legfontosabb nemzetközi alapelvek érvényesülnek-e. Az ön- és az idegentermékenyülés meghatározására, a fajtatisztaság vizsgálatára, a fajtaazonosításra és a fajtavédelemre egyaránt alkalmazhatunk izoenzim analíziseket (Hajósné 1999). Az izoenzim analíziseket inkább a fajtaelismerés és a szabaddalmaztatás céljából alkalmazzák. Napjainkban a napraforgó fajtatisztaságának vizsgálatára referencia módszerként az International Seed Testing Association (ISTA) szabályzatának 8. fejezetében szereplő módszert használják, amely egy nemzetközi standard referencia módszer, ultra vékony poliakrilamid gélen végzett izoelektromos fókuszálással (UTL-IEF, vagy röviden IEF).

Jelen munka célja egy olyan új tömegspektrometriás módszer kidolgozása, amely a referencia módszert kiválthatja, gyorsabb, és a kritikus esetekben (gombás szemek) is megfelelő eredményt szolgáltat.

A referencia módszerrel kapott vizsgálati eredmények szolgálnak referencia értékeként ha MALDI-TOF módszerrel kapott mérési eredmények kiértékelése során. A glutén fehérje vagy másképpen siker egy nagyon fontos fehérjéje a búzaszemnek. A gliadin és a glutenin keveréke, amely nagyban befolyásolja a búzaliszt minőségét. Mind a gliadinok mind a gluteninek jelentős szerepet játszanak a búzafajták minőségének különbségeiben (MacRitchie 1987, Payne 1987). Az alacsonyabb tömegszámú glutén alegységek (LMW-GS – low molecular weight glutenin subunits) az γ -gliadinokhoz hasonlóan mind méretben mind szerkezetben (3040 kDa). A magas tömegszámú glutenin alegységek (HMW-GS) 65–90 kDa tömegűek (Shewry és Tatham 1990, Zhang et al. 2008). A nagy tömegszámú fehérje komponensek befolyásolják a minőségi tulajdonságokat, kulcsszerepet töltenek be a liszt minőségének kialakításában, hiszen részt vesznek a glutén rugalmasságának kialakításában (Tatham et al. 1985). Az SDS-PAGE és HPLC módszereket rutinszerűen alkalmazzák nemesítési programokban, a nagy és kis molekulatömegű fehérjék elválasztására (Dworschak

et al. 1998). Az SDS-PAGE módszerrel történő elválasztás az elektroforetikus mobilitáson alapul, viszont ez a módszer nem eléggé egzakt és az identifikálás is nehéz bizonyos esetekben (Gianibelli et al. 2001). Valamilyen szinten az RP-HPLC megoldást jelenthet ezekre a problémákra, de bizonyos alegységek azonosítása ezzel a módszerrel sem sikeres (Marchylo et al. 1992). MALDI-TOF módszerrel gyorsan és rendkívül eredményesen lehet a búza siker fehérjét azonosítani (Dworschak et al. 1998, Cozzolino et al. 2001, Cunsolo et al. 2004; Alberghina 2005, Muccilli et al. 2005, Chen et al. 2007, Zhang et al. 2008). 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 (Dworschak et al. 1998). Zhang 2008-ban nagy tömegszámú glutenin fehérjét jellemzett kilenc búza fajtánál MALDI-TOF módszerrel. Számos fajta nemesítési programjában is használják ezt a módszert. A nagy molekulatömegű glutenin fehérjét tartalmazó mintákat 60 μ l acetonitrilben oldják (ACN) egy órán keresztül. A minták előkészítése a „dried droplet method”- módszerrel, azaz szárított csepp módszerrel történik, melyre szinapin savat tartalmazó mátrixot cseppentenek, melyet a MALDI-TOF mintatartó lemezen végeznek el (Kusmann et al. 1997). A módszer automatizált és különösen hasznosnak bizonyulhat a búzaneselési programokban, ahol a vonalnak tartalmazniuk kell a megfelelő fehérje alegységeket, melynek legfontosabb célja a kiváló minőségű búzaliszt termelése (Flaete és Uhlen 2003). A legtöbb fehérje alegység jól elkülönül, így lehetővé válik a pontos molekulatömeg meghatározás.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatok növényi anyaga a Fleischmann Rudolf Kutatóintézet kísérleti területén, valamint a napraforgó vetőmag előállító területén, Kompolton, illetve több termőhelyen elvetésre kerültek.

Minták feldolgozása

A napraforgó kaszattermések betakarítást követően, a nyers minták feldolgozásra kerültek. A mintaelőkészítés során a terméseket többféle módszerrel dolgoztuk fel: teljes kaszattermések; csak a kitisztított mag; szeparáltuk az egészséges és fertőzött magokat. Emellett a teljes kaszattermések, illetve kitisztított magvak egészben is vizsgálatokra kerültek.

Mintaelőkészítés, extraháló szer összetétele, és az eluláló szer összetétele

MALDI-TOF vizsgálatokhoz a napraforgó kaszat terméseiből ki kell extrahálni a tartalékfehérjét. Az extrakcióhoz négyféle extraháló szert próbáltunk ki: egy vizes nátrium klorid puffert, savas nátrium kloridos puffert, illetve egy apolárosabb 1-propanolos extraháló puffert és egy apoláros 2-pronalonos puffert extraháló szert, mert az előkísérleteimből az derült ki, hogy az extraháló szer jelentősen befolyásolja az extrahált fehérjék minőségét és mennyiségét, ezáltal a tömegspektromban megjelenő fehérje csúcsok számát és intenzitását.

Extrakció vizes NaCl pufferrel extraktumok felvitele

A napraforgószemeket 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe helyeztük. Ezután 500 µl NaCl-os extraháló szert pipettáztunk a centrifugacsővekbe (amelyben hántolt egész napraforgó szem a másik esetben csávázott héjjal egész szem volt és Vortex-szel (Biosanvortex V1) alaposan megkevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezután a mintákat rotoros horizontális rázógépbé helyeztük és még 30 percig folytattuk az extrakciót. Az extrakció befejezése után lecentrifugáltuk eppendorf5415Ra mintákat (3 perc, 14100 rpm), majd a felülúszóból 50 µl-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A mintafelvitel előtt ismét Vortex-szel (Biosanvortex V1) alaposan megkevertük az extraktumot és ismét lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm). Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1–1 µl-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánként. Száradás után a mintákra 1 µl mátrix oldatot cseppentettünk és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát (1. táblázat).

Extrakció savas NaCl pufferrel extraktumok felvitele

A kísérlet eljárás módja a fent említettekben megegyező.

Extrakció 2-propanolos pufferrel és az extraktumok felvitele

A napraforgó szemeket 2,0 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe helyeztük. Ezután 500 µl 1-propanolos

extraháló szert pipettáztunk a centrifugacsővekbe. Vortex-szel alaposan megkevertük, majd 30 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezután rotoros vertikális rázógépbé helyeztük a mintákat és még 30 percig folytattuk az extrakciót. Az extrakció befejezése után lecentrifugáltuk a mintákat (3 perc, 14100 rpm), majd a felülúszóból 50 µl-t pipettáztunk egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A felülúszó lepipettázása után 50 µl TA25 o25 ml acetonitril (ACN), 75 ml ionmentes vizet és 100 µl trifluor-ecetsavat mértünk, majd az alaposan összekevert oldatot adtuk a mintákhoz. Ez a lépés a minta extraktum felvitele szempontjából fontos. A tiszta 1-propanolos extraktum szétfolyik a lemezen, viszont TA25 oldattal kiegészítve a felvitel lehetségessé válik. A Wesslin Hungaria Kft. kísérletei alapján kiderült, ez az anyag nem befolyásolja a további eredményeket. A mintafelvitel előtt ismét Vortex-szel alaposan megkevertük az extraktumot és lecentrifugáltuk (3 perc, 14100 rpm). Ezt követően az előkészített mintatartó lemezre 1–1 µl-t cseppentettünk két párhuzamosban mintánként. Száradás után a mintákra 1 µl mátrix oldatot cseppentettünk és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát (1. táblázat).

Extrakció 1-propanolos pufferrel és az extraktumok felvitele

A kísérlet eljárás módja a fent említettekben megegyező.

1. táblázat

Az előkísérletekhez használt extraháló szerek összetétele

Extraháló szer(1)	Nátrium-klorid koncentráció(2)	dI-DTT koncentráció(3)	Alkohol koncentráció(4)	Ecetsav koncentráció(5)
NaCl semleges puffer(6)	0,1 M	20 mM	-	-
NaCl savas puffer(7)	0,1 M	20 mM	-	0,1% (v/v)
1-propanolos puffer(8)	-	20 mM	50% (v/v)	0,1% (v/v)
2-propanolos puffer(9)	-	20 mM	50% (v/v)	0,1% (v/v)

Table 1: Composition of extracting agents used in the first experiment

Extracting agents(1), Sodium chloride(2), dI-DTT concentration(3), Alcohol concentration(4), Acetic acid concentration(5), NaCl natural buffer(6), NaCl acid buffer(7), 1-propanol buffer(8), 2-propanol buffer(9)

Mintatartó előkészítése, a műszer kalibrálása

A méréshez a mintatartó lemezeket elő kell készíteni, 5–10 percre 70%-os etanolban áztatni szükséges, majd meleg folyóvízzel le kell mosni a mátrix, a mikroorganizmus telepek vagy az extraktumok maradékát, ezt követően finom alumínium-oxid vizes szuszpenziójával átdörzsölni, majd a lemezeket papírtörölő segítségével megszáritani. Ezt követően 5–10 percre metanolba kell áztatni a lemezeket. Ezután lamináris boksban hagytuk elpárologni a metanol maradékát, majd a lemezeket 2-propanolba mártott szálmentes törlőkendővel dörzsöltük át. Száradás után lamináris boksban a lemezek közepére 50 µl 80%-os trifluorecetsav oldatot pipettáztunk és fűtiszító pálcika segítségével a lemezeket alaposan átdörzsöltük, majd a trifluorecetsav maradékát ionmentes vízzel mostuk le. A megszáritott lemezeket kevés grafitporral dörzsöltük át, a grafitpor maradékát finom ecsettel távolítottuk el. Az így előkészített mintatartó lemezeket Petri csészében tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig.

A méréshez Bruker microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométert használtunk. Az előkészített mintatartó lemezt egy zsiliprendszeren keresztül juttattuk az ionforrásba. A minták letapogatásához szükséges mozgást, egy precíz mechanika végzi, amely igen pontosan tudja mozgatni a mintatartó lemezt az UV lézerforrás alatt. Egy kisfelbontású digitális kamerával nyomon is követhetjük az aktuális pozícióban lévő minta vizsgálatát. Ez egyrészt segít ellenőrizni, hogy a vizsgálat a megfelelő minta pozícióból történik, illetve az esetleges mintafelviteli inhomogenitások esetén segíti a manuális spektrum felvételt. Egy általános műszervezérlő szoftverrel (Flex Control – Bruker Daltonik) lehet beállítani a tömegspektrumok felvételéhez szükséges paramétereket, így a lézer energiáját, az ionok gyorsításához szükséges nagyfeszültséget, a mintatartó lemez mozgatási sémáját és a vizsgált tömegszám-tartományt is. Ezzel a szoftverrel végezhetjük továbbá a készülék tömegszám-skálájának kalibrációját, a repülési idők tömegszámra történő konverziójához szük-

seges függvény meghatározását. Az elv egyszerű, egy ismert fehérje összetételű baktérium törzset (*Escherichia coli*DH5), mint kalibráló standardot használtunk erre a célra. A vákuum ellenőrzése után a kalibráló pozícióra (A2) állítottuk a lézert és az automatikus spektrum-felvételi módban elkészítettük a kalibráló standard átlag tömegspektrumát a 2000–25 000 amu (atomicmass unit) tömegszám-tartományban, lehetőség szerint 200–500 spektrum átlagából. Zajsűrés (simítás) és alapvonal-korrekció után elvégeztük a kalibrációt (a műszer megkereste a referencia tömegszámokat és a megfelelő függvényt illesztette a tömegszámokra). Ellenőriztük a referencia tömegszámok eltérését, és akkor fogadtuk el a kalibrációt, ha minden tömegszám esetén az eltérés kisebb volt, mint 300 ppm. A kalibrációhoz használt (*Escherichiacoli*) DH5 tömegspektruma „csúcs gazdag”, így könnyen találtunk megfelelő számú iont a tömegszám-tartomány (2000–25 000 amu) lefedéséhez (Lovász 2014). A MALDI-TOF készüléket célszerű minden mintasorozat előtt a referencia baktérium standard mérésével kalibrálni. A kalibráló minta (spot) többszörösen is felhasználható.

Kalibráló standard felvitele

A kalibráló standard oldat 1 μ l-t az előkészített mintatartó lemez A2-es pozíciójára cseppentettük fel és hagytuk az oldószert elpárologni. Lehetőség szerint a száradás után azonnal 1 μ l mátrix oldatot cseppenttünk a kalibráló standardra és lamináris boksban hagytuk elpárologni az oldószert. Minden minta felviteléhez új pipettahegyet használtunk, és miután a minta megszáradt a lemezen, azután mértük a mintákra a mátrix oldatot legfeljebb 10 percen belül. Fontos, hogy a mátrix oldatot nem kevertük össze a mintával, nehogy összefolyjon a szomszédos mezőkkel, így tudtuk elkerülni a mezők közti keresztzennyeződést, amely hibás eredményekhez vezetett volna, illetve így a preparáció és a kristályképződés is jobban kialakult. A mintatartó lemezeket hagytuk megszáradni szobahőmérsékleten, és a beszáradás után készek voltak az MALDI-TOF vizsgálatra.

EREDMÉNYEK

A tartalékfehérje profilok elemzéséhez a Flex Analízis (Bruker Daltonik) szoftvert használtuk. Ezzel a szoftverrel lehetőség nyílt egyesével megtekinteni a mintákból készült tömegspektrumokat. Miután beolvastuk a spektrumokat, a Wessling Hungaria Kft. kidolgozott módszerfájljával végeztük el a megfelelő matematikai műveleteket (zajsűrés, alapvonal-korrekció). A munka során többféle extraháló oldatot alkalmaztunk, ennek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a módszerek milyen különbségeket mutatnak.

A módszerek a következők voltak: az összehasonlító kísérletben a fentiekben leírt négy extraháló szert alkalmaztunk mint a magok csávázva, hántolva, egész és beteg minták esetében különböző kísérleti módszernek megfelelően az extraháló oldatokat. A kapott spektrumok alapján a legoptimálisabb, ha hántoljuk a szemeket, így a héj nem zavar be a vizsgálat során. Az extraháló oldatok optimalizálása folyamatos. A kapott spektrumok alapján a csávázott magoknál ahol a vizsgálat során a nem történt hántolás (1. ábra), az 1-propanolos extraháló oldattal több csúcsot kaptunk, azaz több markerfehérje mutatható, ki mint a NaCl savas extraháló oldattal. Az NaCl savas és NaCl vizes extraháló oldat esetében (2. ábra) nem tapasztaltunk eltérést. A beteg szemek (3. ábra) vizsgálatánál azon extraháló oldatoknál is eltérő spektrumokat kaptunk, ami arra utalhat, hogy a módszer, amelyet a vizsgálatunk során alkalmaztunk, még mindig optimalizálásra szorulnak. A cél a genetikai tisztaság vizsgálatokhoz egy megfelelő, biztos, olcsó és gyors módszer fejlesztése. Az eljárás és a módszer sokkal egyszerűbb és gyorsabb, mint az ultra vékony poliakrilamid gélen végzett izoelektromos fókuszálás (UTL-IEF), mivel az eredmények értékelését egy szoftver segíti, illetve a digitálisan tárolt eredmények visszakereshetősége, újraértékelése sokkal egyszerűbb. A módszer érzékenységeinek köszönhetően a kis mennyiségben jelen lévő markerfehérjéket is könnyen ki lehet mutatni.

1. ábra: Anyavonal – egészszem csávázott héjjal – fehérjeprofíljá NaCl savas (A) és 1-propanolos (B) extraháló szerrel

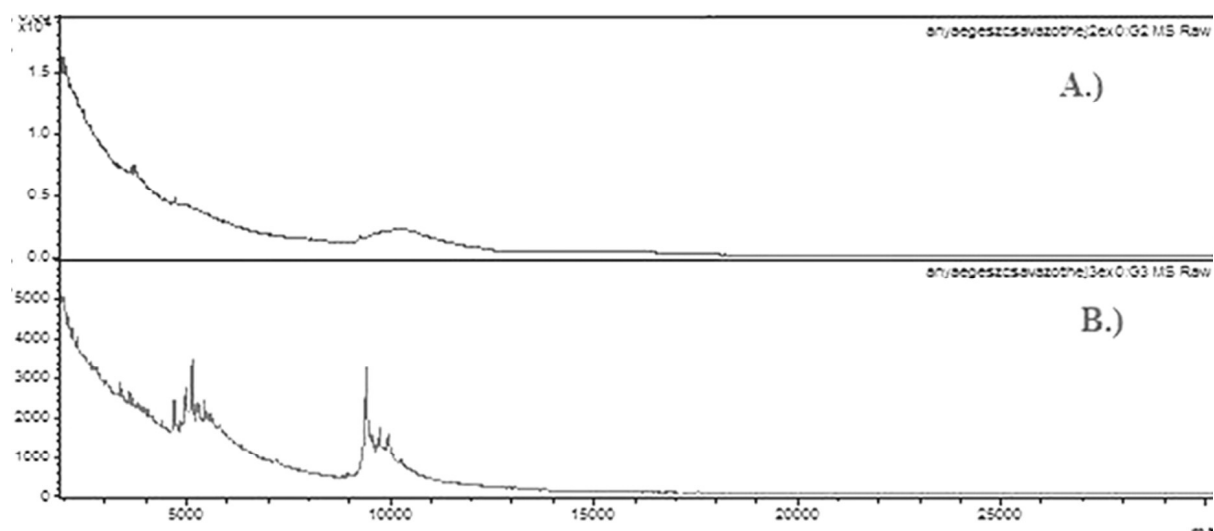


Figure 1: Female line – sunflower cautioned seed – protein profile with NaCl acid buffer (A) 1-propanol buffer (B)

2. ábra: Anyavonal – hántolt egészszem – fehérjeprofilja NaCl vizes (C) és NaCl savas (D) extraháló szerekkel

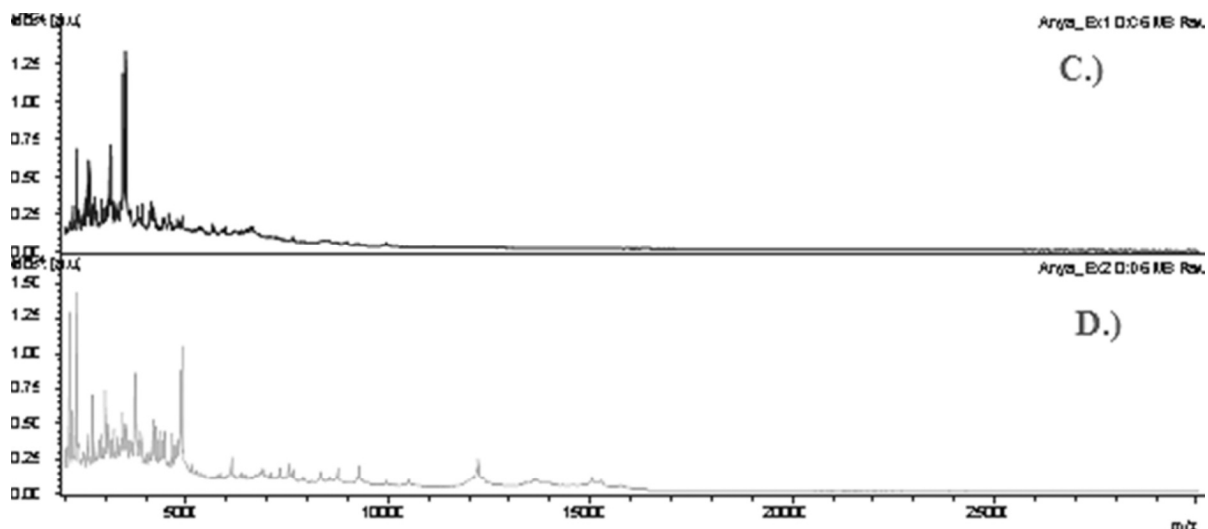


Figure 2: Female line – sunflower seed without shell – protein profile with NaCl natural buffer (C) NaCl acid beffer (D)

3. ábra: Hántolt beteg hibrid napraforgó szem fehérje profilja NaCl savas (E) és 1-propanolos (F) extraháló szerrel

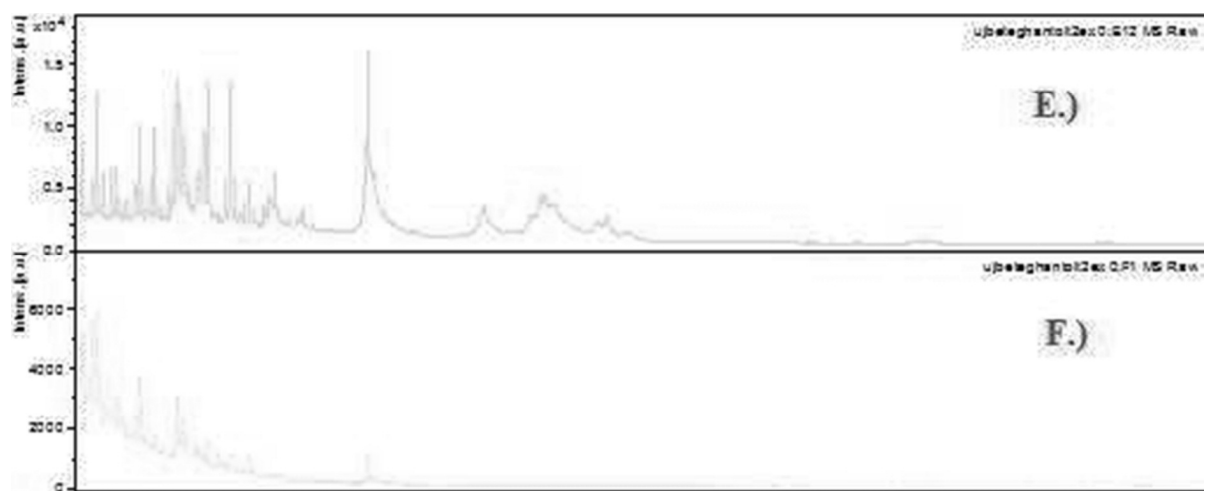


Figure 3: Hybrid patients sunflower seed without shell protein profile with NaCl acid buffer (E) 1-propanol buffer (F)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Tóth Szilárd igazgatónak a Fleischmann Rudolf Kutatóintézetből, Lovász Csaba okleveles vegyészmérnöknek (Wessling Hungary Kft.) a módszer megismerésének és elsajátításában nyújtott segítségért, Dr. Micsinai Adriennek a Wessling Hungary Kft. Élelmiszerbiztonsági Üzletág vezetőjének, hogy lehetőséget és helyet biztosított a vizsgálatok létrejöttéhez, Dr. Lajkó László-

nak a Phytopatent Kft. ügyvezető igazgatójának a probléma és a hipotézis felvetéséért és értékes szakmai tanácsaiért, Dr. Tímár Eszternek és Ézsiás Anikónak a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal (NÉBIH) Gélelektroforézis Központi Laboratórium mérnökeinek, akik a referenciamódszer megismerésében segítettek, valamint Lukács Józsefnek a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal (NÉBIH NKI) elnökhelyettesének, hogy engedélyezte a Gélelektroforézis Laboratóriumi látogatásaimat.

IRODALOM

Alberhina, G.–Cozzolino, R.–Fischella, S.–Garozzo, D.–Anna Savarino, A. (2005): Proteomics of gluten: mapping of the 1Bx7 glutenin subunit in Chinese Spring cultivar by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2069–2074.

Chen, J.–Lan, P.–Tarr, A.–Yan, Y. M.–Francki, M.–Appels, R.–Ma, W., (2007): MALDI-TOF based wheat gliadin protein peaks are useful molecular markers for wheat genetic study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 21: 2913–2917.

- Cozzolino, R.–Di Giorgi, S.–Fisichella, S.–Garozzo, D.–Lafiandra, D.–Palermo, A. (2001): Proteomics of gluten: mapping of subunit 1Ax2 in Chyenne cultivar by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 1129–1135.
- Cunsolo, V.–Foti, S.–Saletti, R.–Gilbert, S.–Tatham, A. S.–Shewry, P. R. (2004): Structural studies of the allelic wheat glutenin subunits 1Bx7 and 1Bx20 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 39: 66–78.
- 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.
- Flaete, N. E. S.–Uhlen, A. K. (2003): Association between allelic variation at the combined Gli-1, Glu-3 loci and protein common wheat (*Triticum aestivum*). *J. Cereal Sci.* 37: 129–137.
- Gasparini, L.–Maguire, C. (2001): Targeting the Rural Poor: The Role of Education and Training. Sustainable Development, Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao/sd/2002/kn0301a_en.htm
- 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.
- Hajósné Novák M. (szerk.) (1999): A Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
- ISTA (1992): „Handbook of Variety Testing – Electrophoresis Testing” Chapter 8.
- Kussmann, M.–Nordhoff, E.–Rahbek-Nielsen, H.–Haebel, S.–Rossel-Larsen, M.–Jakobsen, L.–Gobom, J.–Mirgorodskaya, E.–Kroll-Kristensen, A.–Palm, L.–Roepstorff, P. (1997): MALDI-MS sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.* 32: 593–601.
- Latharn, M. C. (1997): Human Nutrition in the Developing World. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome Italy. 522.
- Lovász Cs. (2014): A kémiai Nobel-díj és a *Staphylococcus aureus*. Avagy a modern tömegspektrometria szerepe a mikroorganizmusok azonosításában. *Élelmiszervizsgálati Közlemények.* 4: 327–343.
- MacRitchie, F. (1987): Evaluation of contributions from wheat protein fractionstodough mixing and breadmaking. *J. Cereal Sci.* 6: 259–268.
- 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.
- Net1: http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0400048.FVM
- Payne, P. I. (1987): Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 38: 141–153.
- Popp J.–Fári M.–Antal G.–Harangi-Rákos M. (2015): A fehérje-takarmány-piac kilátásai az EU-ban, különös tekintettel Magyarország fehérjeigényének kielégítésére. *Gazdálkodás.* 5: 401–421.
- Shewry, P. R.–Tatham, A. S. (1990): The prolamin storage proteins of cereal seeds: Structure and evolution. *Biochem. J.* 267: 1–12.
- Tatham, A. S.–Mifflin, B. J.–Shewry, P. R. (1985): The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 62: 405–412.
- Zhang, Q.–Dong, Y. M.–An, X. L.–Wang, A. L.–Zhang, Y. Z.–Li, X. H.–Gao, L. Y.–Xia, X. C.–He, Z. H.–Yan, Y. M. (2008): Characterization of HMW glutenin subunits in common wheat and related species by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Cereal Sci.* 47: 252–261.