

Olaszperje (*Lolium multiflorum* Lam.) vizsgálhatósága MALDI TOF-TOF MS készülékkel

Monori István¹ – Máté Benedek² –
Varga Krisztina³ – Csapó Krisztián¹ –
Bojté Csilla³ – Csízi István³ – Halász András⁴ –
Nagy Dominik⁴ – Nagy Lajos² – Nagy Tibor² –
Asbolt Gergő³ – Kéki Sándor²

¹Alfaseed Kft, Karcag

²Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet,
Debrecen

³Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Karcagi Kutatóintézet,
Karcag

⁴Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Állattenyésztés-technológiai és Állatjóléti Tanszék, Gödöllő
monori.istvan@alfaseed.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Lolium multiflorum vetőmag vizsgálatát végeztük MALDI TOF-TOF MS-sel, mely során 3 extraháló szert próbáltunk ki (NaCl semleges, NaCl savas, propanolos). Célunk, hogy módszert tudjunk kifejleszteni a fűfélék vetőmag vizsgálatához. A 3 eljárás közül csak a propanolos extraháló szer segítségével sikerült zajmentes spektrumot kapni, mely során láthatóvá vált az olaszperje magban lévő tartalékfehérje m/z értéke.

Kulcsszavak: olaszperje, spektrométer, MALDI TOF-TOF MS, módszerfejlesztés

SUMMARY

Lolium multiflorum seeds were tested by MALDI TOF-TOF MS using 3 extraction solvents (NaCl neutral, NaCl acid, propanol). Our aim is to develop a method for grass seed testing. Among the 3 methods, only the propanol extraction agent was able to obtain a noise-free spectrum, revealing the m/z values of the reserve protein in the italian ryegrass seed.

Keywords: italian ryegrass, spectrometer, MALDI TOF-TOF MS, method development

BEVEZETÉS

A fűvek a legváltozatosabb növényi életformák közé tartoznak, amelyek a szárazföldi területek 40%-át teszik ki (pl. sztyepp, szavanna, préri, pampa). A Poaceae család az 5. legnagyobb növény család (780 nemzetség, 12 ezer faj) a növények között. Ma a legelterjedtebb növénytípus és gazdaságilag az egyik legfontosabb növény család. Fontos alappillére az élelmiszer előállítás, valamint fontos takarmánynövény az állatok számára. Használják az építőiparban is, és más számos területen is hasznos (energetikai ipar, papíripar). Továbbá sport- és díszgyep előállításában játszik szerepet, melynek elengedhetetlen feltétele a gyepvetőmag (Engloner et al., 2002).

A hazai gyepvetőmag előállítás volumene a kiváló ökológiai adottságok ellenére töredéke a piaci lehetőségeknek (Varga et al., 2020). Jelenleg a hazai

vetőmag beszerzése nehézkes, leginkább a külföldi fűfajták széles tárházából válogathatunk. Hazánk mezőgazdasági területéből 14,9%-ot foglal el a gyep művelési ág (Tasi et al., 2014).

A perje-félék, mint fajták elismeréséhez a standard DUS vizsgálatot alkalmazzák. Ahhoz, hogy a vizsgálat során a fajta megfeleljen, az állománynak fenotípusosan homogénnek kell lennie, de genotípusos vizsgálat nem történik. Napjaink új szemléletmódot követelő növény-nemesítésének egyik nagy perspektívája, – többek között – minőségbiztosítási szempontból, a tömegspektrometria, Reeve et al. (2018), valamint Zhan et al. (2012) szerint, mely a fűmag előállítás hitelességét is garantálhatja.

Az 1980-as évek közepe óta fejlesztett MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) lehetőséget nyújt új módszerek kialakítására, amely lehetővé teszi az agrárkutatások színvonalának növelését. Irodalmi áttekintésünk során perje-félékre vetőmagvizsgálatot nem találtunk MALDI TOF-TOF MS módszerrel, hanem a vizsgálatok, orvostudományi vonatkozásokban leginkább a pollenekre, valamint a stresszfaktorokra (pl. hőstressz) irányultak (Raftery et al., 2003; Irañeta et al., 2008; Zhang és Du, 2016).

A tömegspektrometria 115 évre tekint vissza, amely az elmúlt évtizedekben hatalmas fejlődésen ment keresztül, és az új mérnöki fejlesztéseknek köszönhetően gyors és pontos módszer lett. A tömegspektrometria a szerkezeti vizsgálatok hatékony módszere, amelyben a vizsgálandó molekulákat gáz fázisba juttatják, ionizálják és nagyfeszültségű elektromos térben felgyorsítják. Az ionokat tömegük és töltésük alapján mágneses, elektrosztatikus vagy rádiófrekvenciás mezőkkel választják el és mérik. A biológiai aktív molekulák (fehérjék vagy enzimek) vizsgálatának egyik legfontosabb módszere a MALDI ionizációs technológia. Ezért a tudomány minden területén alkalmazzák az orvostudományoktól az agrártudományokig (Bojté, 2023).

Célunk, hogy egy olyan módszert fejleszthessünk MALDI TOF-TOF MS készülék segítségével, mely biztosítja a fűfélék vetőmagjainak homogenitásának vizsgálatát.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Lolium multiflorum magok tartalékfehérjét vizsgáltuk MALDI TOF-TOF MS készülékkel Bojté (2023) módszere alapján (1. ábra).

1. ábra: MALDI TOF-TOF MS készülék
(Fotó: Varga Krisztina)



Figure 1: MALDI TOF-TOF MS (Photo by Krisztina Varga)

A tartalékfehérje vizsgálat röviden a következő: 10 g mintát 2,0 ml-es Eppendorf centrifuga csőbe helyeztünk, melyhez különböző extrahálószerkeket adtunk hozzá. Ezután a mintát rázatógépbe (Vortex), majd ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezután 30 percig ismét rázatógépbe helyeztük. 30 perces ráztatás után 3 percen keresztül centrifugáltuk 14100 rpm-en. A felülúszóból 50 μ l-t ismét Eppendorf csőbe pipettáztunk, majd ismét a rázatógépbe került a minta. A folyamat következő lépése ismét centrifugálás volt 3 percig 14100 rpm-en. Az így keletkezett mintából a MALDI-lemezre cseppentettünk 1-1 μ l-t, majd hagytuk beszáradni a mintákat. A beszáradt mintákra 1-1 μ l mátrix oldatot cseppentettünk, melyet ismét hagytunk beszáradni, és ezután behelyeztük a készülékbe.

A mintakészítési eljárás során háromféle extraháló szert alkalmaztunk:

- NaCl semleges extraháló puffer: egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 100 ml ionmentes vizet mértünk, majd 0,58 g NaCl-ot és 0,31 g

Ditiotreitolt (DL-DTT) mértünk és alaposan összekevertük.

- NaCl savas extraháló puffer: egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 100 ml ionmentes vizet mértünk, majd 0,58 g NaCl-ot, 0,31 g Ditiotreitolt (DL-DTT) és 1 ml ecetsavat mértünk és alaposan összekevertünk.
- Propanolos extraháló puffer: egy 150 ml-es csavaros tetejű üvegbe 50 ml 1-propanolt mértünk, hozzátettünk 47 ml ionmentes vizet, 1 ml 100%-os ecetsavat és 2 g ditiotreitolt (DL-DTT).

A HCCA mátrix készítésének eljárását Signor és Erba (2013) alapján folytattuk le. A kapott spektrumok értékelését Bruker Flex Daltonics FlexAnalyses programjával végeztük el.

EREDMÉNYEK

A FlexAnalyses programban a spektrumok értékeléséhez zajszűrést végeztünk. A MALDI TOF-TOF MS tömegspektrométerrel mért spektrumok a 2-4. ábrán találhatóak. A vizsgálatok során a fehérjeprofílokat a 2000-18000 m/z tartományban vettük fel.

Jól látható, hogy a NaCl semleges extraháló pufferrel előkészített minta (2. ábra) nem ad használható információt a fehérje m/z értékeiről, mivel a felvétel zajos. Hasonló eredményt szolgáltat a NaCl savas extraháló pufferrel előkészített minta (3. ábra), amely szintén nem tud információt adni a fehérje m/z értékeiről, ez a felvétel is zajos, nem kaptunk értékelhető spektrumot. Ennek alapvetően két oka lehet, egyfelől az extraháló szer tudta jól kioldani az olaszperje szemekből a fehérjét, másfelől a sótartalom általában jelentősen rontja a kapott tömegspektrum minőségét. Tehát megállapítható, hogy a NaCl semleges, illetve savas extraháló pufferes mintaelőkészítési eljárás nem alkalmas az olaszperje fehérjeinek kimutatására.

Ezután sómentes extrakcióval próbálkoztunk. A vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy az olaszperjében a fehérjéket a propanolos extraháló puffer alkalmazásával lehet a legjobban tanulmányozni tömegspektrometriás körülmények között. A 4. ábrán látható fehérje spektrum az m/z 2000-8000 tartományban volt értékelhető, ugyanakkor m/z 8000 tartomány felett már nem tudtunk értékelhető csúcsokat kimutatni a programban az elemzés során. Ezzel az extraháló szerrel készült minta vizsgálatakor készült spektrum jó minőségű, a fehérjék jó intenzitással jelennek meg és elkülönülnek egymástól (4. ábra). A 4. ábrán látható tömegspektrumban 8-10 fehérjecsúcsot detektáltunk, melyek közül a legnagyobb tömegű m/z 7273 értéknél, míg a legnagyobb intenzitást mutató fehérje pedig m/z 4373 értéknél jelent meg. Az UniProt adatbázisban nem tudtuk beazonosítani a felvételezett spektrum csúcsok m/z értéke alapján, hogy pontosan mely fehérjét vette fel a tömegspektrométer (uniprot.org).

2. ábra: NaCl semleges extrakcióval kapott spektrum

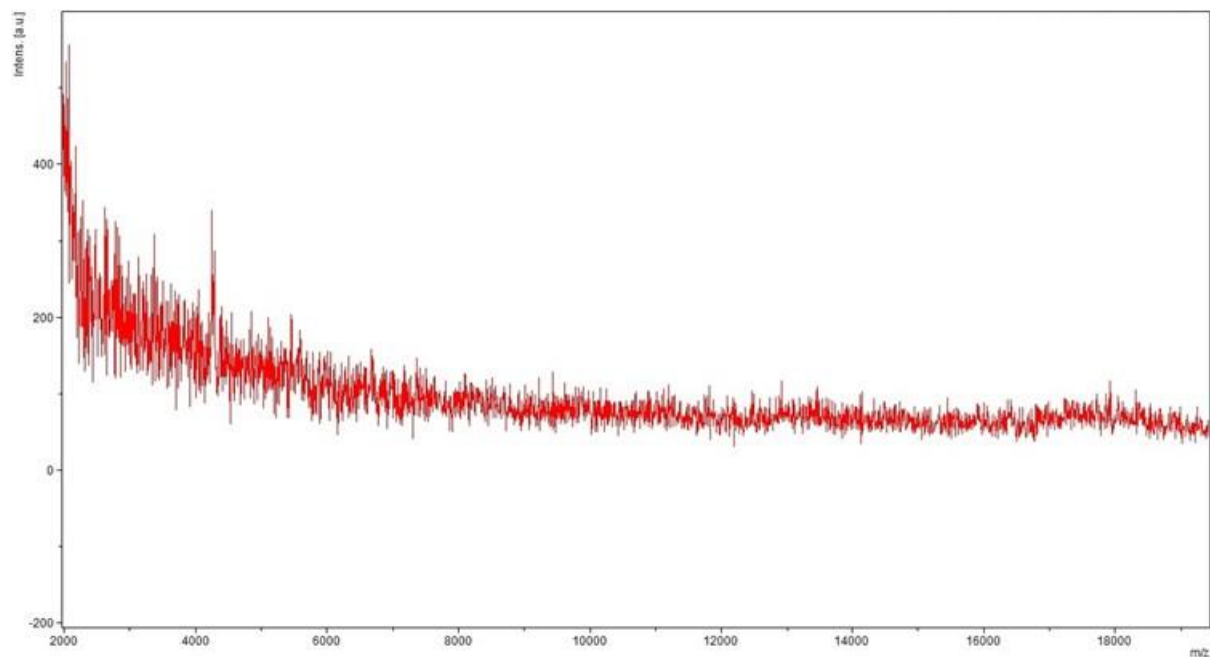


Figure 2: Spectrum obtained by NaCl neutral extraction

3. ábra: NaCl savas extrakcióval kapott spektrum

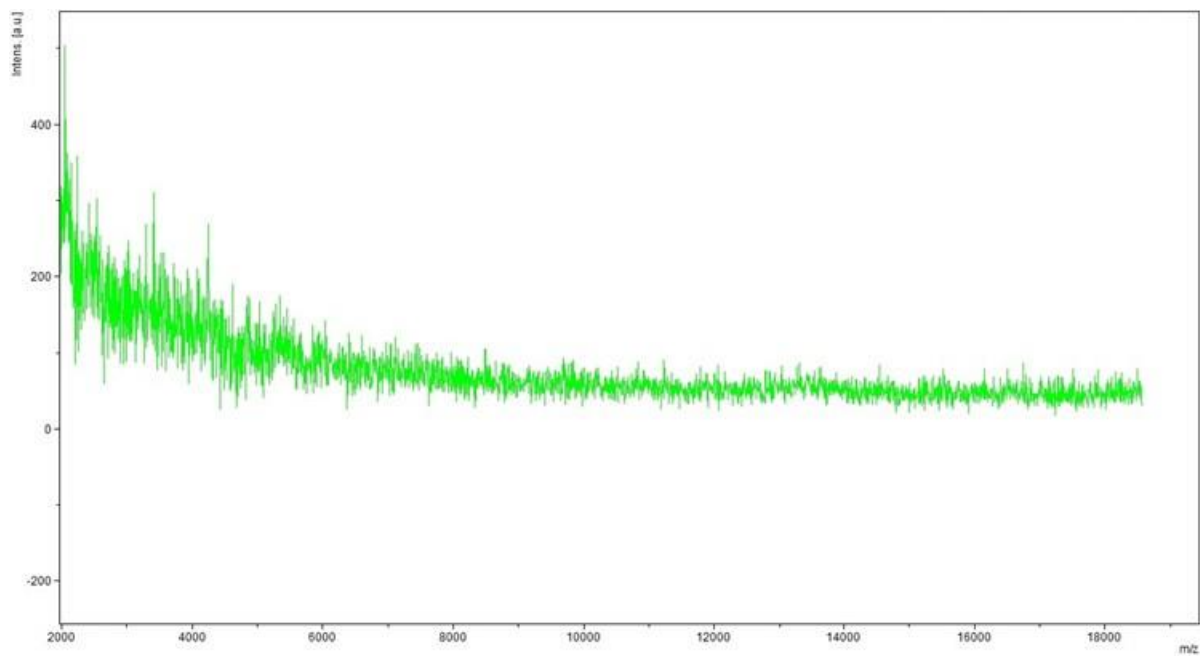


Figure 3: Spectrum obtained by acid extraction of NaCl

4. ábra: Propanolos extrakcióval kapott spektrum

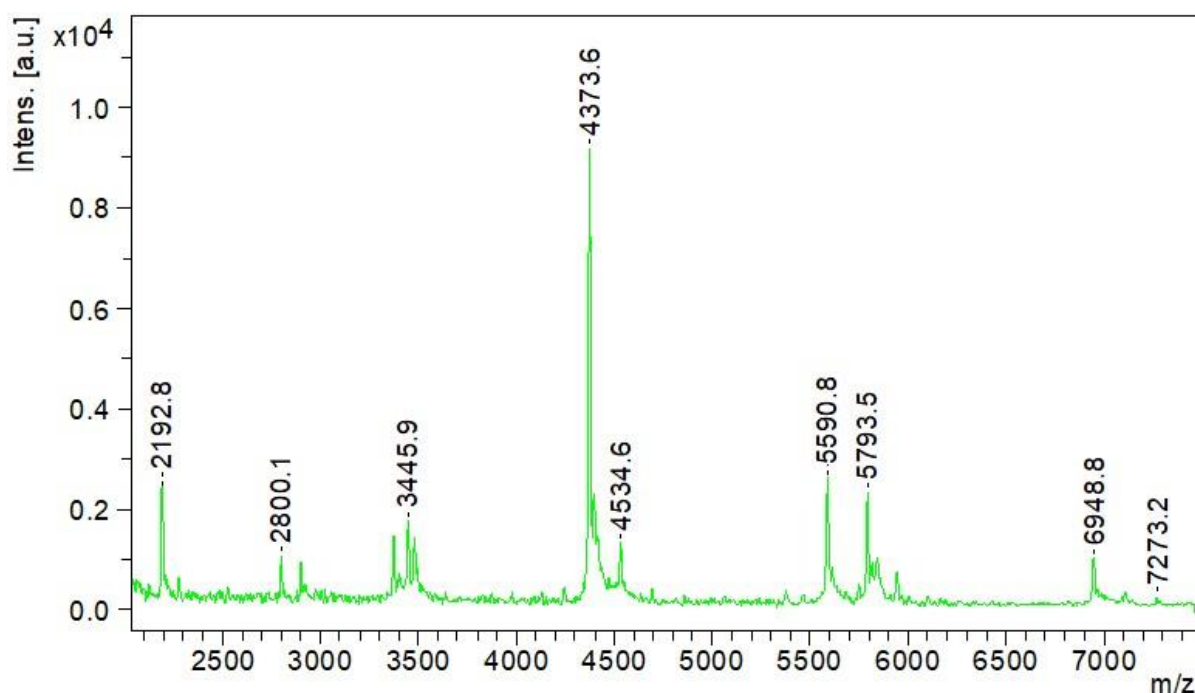


Figure 4: Spectrum obtained by propanol extraction

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Tudomásunk szerint mi kutatócsoportunk vizsgált először tartalékfehérjét az olaszperje esetében. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a MALDI-TOF-TOF MS vizsgálati módszer alkalmas az olaszperje vizsgálatára. Az olaszperje vizsgálatához a propanolos eljárást találtuk megfelelőnek.

A MALDI-TOF-TOF MS tömegspektrometriás módszerrel lehetőségünk van arra, hogy tartalékfehérje profilokat elemezzünk. A MALDI-TOF MS technológia lehetővé teszi, hogy rövid időn belül le tudjuk mérni a mintákat. A kutatási eredményeink bizonyítják, hogy a MALDI-TOF-TOF MS készülékkel kapott tartalékfehérje tömegspektrumok alkalmasak genetikai homogenitás vizsgálatára az m/z 2000-8000 tartományban.

IRODALOM

- Bojté Cs. (2023): Különböző növényi vetőmagvak genetikai homogenitás vizsgálata tömegspektroszkópiai technológiával. Doktori értekezés, Debrecen, Debreceni Egyetem p. 166.
- Engloner A.-Penksza K.-Szerdahelyi T. (2002): A hajtásos növények ismerete. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest. p. 268.
- Iraneta, S. G.-Acosta, D. M.-Duran, R.-Apicella, C.-Orlando, U. D.-Seoane, M. A.-Alonso, A.-Duschak, V. G. (2008): MALDI-TOF MS analysis of labile *Lolium perenne* major allergens in mixes. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(8): 1391-1399.
- Raftery, M. J.-Saldanha, R. G.-Geczy, C. L.-Kumar, R. K. (2003): Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates. *Respir. Res.* 4(10): 1-12.
- Reeve, M. A.-Buddie, A. G.-Pollard, K. M.-Varia, S.-Seier, M. K.-Offord, L. C.-Cock, M. J. W. (2018): A highly-simplified and inexpensive MALDI-TOF mass spectrometry sample preparation method with broad applicability to microorganism, plants and insects. *Journal of Biological Methods* 5(4): 13.
- Signor, L.-Erba, E. B. (2013): Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa. *Journal of Visualized Experiments* 79: 1-7.
- Tasi J.-Bajnok M.-Halász A.-Szabó F.-Harkányiné Székely Zs.-Láng V. (2014): Magyarországi komplex gyepgazdálkodási adatbázis létrehozásának első lépései és eredményei. *Gyepgazdálkodási Közlemények* 2014/1: 57-58.
- Varga K.-Murányi E.-Pápay G.-Csízi I. (2020): Morfometriai adatok *Lolium*, *Festuca* és *Poa* fajok vetőmagtisztításához. *Gyepgazdálkodási Közlemények* 18(1-2): 55-61.
- Zhan, L.-Huang, X.-Xue, J.-Liu, H.-Xiong, C.-Wang, J.-Nie, Z. (2021): MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry imaging reveals non-uniform distribution of disaccharide isomers in plant tissue. *Food chemistry* 338.
- Zhang, Y.-Du, H. (2016): Differential accumulation of proteins in leaves and roots associated with heat tolerance in two Kentucky bluegrass genotypes differing in heat tolerance. *Acta Physiol Plant* 38: 1-15.