

Napraforgó hibrid tartalék fehérjéinek vizsgálata MALDI-TOF MS készülékkel

KRISTÓ ATTILA

Debreceni Egyetem, Kerpely Kálmán Doktori Iskola, Debrecen

Összefoglalás

A hibrid vetőmagok sikeres előállításának egyik alapfeltétele a szülővonalak és hibridjeik genetikai homogenitásának biztosítása. Ezt laboratóriumi módszerekkel, például fehérjemarkerek, izoenzimek és molekuláris markerek, valamint szántóföldi vizsgálatokkal lehet meghatározni. A MALDI-TOF MS (mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometria) különösen alkalmas lehet a vetőmagok genetikai homogenitásának vizsgálatára, mivel minden minta egyedi „fehérje ujjlenyomatát” megkaphatjuk az m/z értékek és a csúcsok intenzitásának kimutatása alapján. A fehérjék a tömegspektrumban jellemző csúcsok formájában jelennek meg, és jelenlétük vagy hiányuk alapján következtethetünk a minták homogenitására. A MALDI-TOF előnye, hogy gyorsan és megbízhatóan detektálja a fehérjéket, még komplex mintákban is, és a mérési paraméterek – relatív intenzitás, abszolút intenzitás, jel/zaj arány, rezolúció, csúcs alatti terület – lehetővé teszik a spektrum minőségének objektív értékelését. Homogén vetőmagok esetén a spektrumok szinte azonos csúcsokkal és intenzitásokkal jelennek meg, míg heterogén minták eltérő csúcsmintázatot mutatnak, így ez a technika gyors, érzékeny és reprodukálható, lehetővé téve a markerfehérjék monitorozását, a spektrumok összehasonlítását és a genetikai homogenitás pontos meghatározását.

Kulcsszavak: napraforgó, homogenitás, MALDI-TOF MS

Analysis of reserve proteins in sunflower hybrids using a MALDI-TOF MS device

A. KRISTÓ

University of Debrecen, Kerpely Kálmán Doctoral School, Debrecen

Summary

One of the basic for the successful production of hybrid seeds is ensuring the genetic homogeneity of the parental lines and their hybrids. This can be assessed using laboratory methods, such as protein markers, isozymes, and molecular markers, as well as field tests. MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) is particularly suitable for examining the genetic homogeneity of seeds, as it allows obtaining a unique “protein fingerprint” for each sample based on the detected m/z values and peak intensities. Proteins appear as characteristic peaks in the mass spectrum, and their presence or absence can be used to infer the uniformity of the samples. The advantage of MALDI-TOF lies in its ability to rapidly and reliably detect proteins, even in complex samples, while measurement parameters – relative intensity, absolute intensity, signal-to-noise ratio, resolution, and peak area – allow an objective evaluation of spectrum quality. In homogeneous seed samples, spectra display nearly identical peaks and intensities, whereas heterogeneous samples exhibit differing peak patterns. Thus, this technique is fast, sensitive, and reproducible, enabling the monitoring of marker proteins, comparison of spectra, and precise determination of genetic homogeneity.

Keywords: sunflower, homogeneity, MALDI-TOF MS

Bevezetés

A kereskedelmi forgalomba kerülő hibrid vetőmagok sikeres előállításának egyik alapfeltétele a szülővonalak és hibridjeik genetikai homogenitásának biztosítása. Ennek pontos meghatározására laboratóriumi (fehérjemarkerek, izoenzimek, tartalékfehérjék és molekuláris markerek) és szántóföldi (morfológiai, fenológiai) módszerek egyaránt alkalmasak (*Nikolić et al.* 2008).

A felhasználható módszerek sorában a MALDI-TOF (mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometria) típusú tömegspektrométer egy speciálisan mikrobiológiai minták fehérjealapú, gyors azonosítására szolgáló műszer. A MALDI-TOF egy olyan gyors, érzékeny és pontos analitikai módszer, amelyet egyre szélesebb körben alkalmaznak mezőgazdasági és élelmiszeripari minták vizsgálatára is (Bojté 2022).

A technika alkalmazható összetett mikrobiális közösségek elemzésére is, ami segít feltárni a növényekkel és egymással való kölcsönhatásaikat. Nemzetközi törekvés zajlik a tömegspektrometriás adatok nyilvános adatbázisba rendezésére, ami elősegíti a MALDI-TOF MS univerzális használatát a növényi kórokozók azonosításában (Ahmad *et al.* 2012). Az 1,5-diaminonáftalin (DAN) kiváló mátrixként szolgál a MALDI tömegspektrometriában az ép klorofillok és származékaik pontos azonosítására, mert minimális a fémion-vesztés és fragmentáció. Ez a módszer lehetővé teszi a klorofill természetes lebomlásának nyomon követését, például szártott tealevelekben, továbbá alkalmas illegális növényi olaj újrazöldítési gyakorlatok kimutatására is (Calvano *et al.* 2015). A *Rhizobiaceae* család három nemzetségét (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*) olyan baktériumok alkotják, amelyek között patogén, szimbionta és szaprofita fajok is vannak. Ezek azonosítása hagyományos módszerekkel nehéz, ezért alternatív, gyors és megbízható eljárások szükségesek. A MALDI-TOF MS technika alkalmasságát vizsgálták a fajok pontos elkülönítésére és az adatbázis bővítésére. A módszer 100%-os pontossággal azonosította az izolált törzseket, így kiváló eszköz lehet nagy mennyiségű rizobium izolátum azonosítására ökológiai és taxonómiai kutatásokban (Ferreira *et al.* 2011).

Az élelmiszer csalások egyre bonyolultabbá válásával egyre nagyobb szükség van gyors, megbízható és költséghatékony analitikai módszerekre az élelmiszer-ellenőrzésben. A MALDI-TOF MS technika ezen igényeknek jól megfelel, mivel egyszerűen használható, gyors adatgyűjtést tesz lehetővé, és még összetett mintákból is pontos eredményeket ad. Ezt a módszert sikeresen alkalmazzák különböző élelmiszerek, például tejtermékek, olajok, halak, húsok, gyümölcsök és zöldségek minőségének vizsgálatára és hamisítások kimutatására (Zambonin 2021). Az extra szűz olívaolaj hamisítása más növényi olajokkal vagy alacsonyabb minőségű olívaolajokkal gyakori probléma. Egy gyors, MALDI-TOF MS alapú tömegspektrometriás módszert fejlesztettek ki az olaj hamisításának kimutatására, amely képes már 1%-os

hamisítást is érzékelni. Ez a módszer hatékonyabbnak bizonyult a hagyományos spektrofotometriás eljárásoknál, és sikeresen alkalmazható különböző földrajzi régiókból származó minták vizsgálatára is (Jergović *et al.* 2017). Különböző növényi olajok összetételének vizsgálatánál a MALDI-TOF gyors és megbízható információt ad a zsírsav-összetételről (Schiller *et al.* 2002).

A kukorica gyökereinek fehérjeösszetételét vizsgálták foszforhiányos és normál körülmények között, hogy jobban megértsék a növények alacsony foszforszinthez való alkalmazkodását. A foszfátstressz hatására a fehérjék mintegy 20%-ának mennyisége legalább kétszeres mértékben változott, a MALDI-TOF MS módszerrel 106 eltérő expressziójú fehérjét azonosítottak. Ezek a fehérjék többek között a fitohormon-termelésben, a szén- és energiatermelésben, a fehérje-anyagcserében, a jelátvitelben, a sejtciklusban és a védekezési mechanizmusokban játszanak szerepet. Az eredmények szerint ezek kulcsfontosságúak a foszforhiány érzékelésében és az ahhoz való alkalmazkodásban, és alapot adhatnak a növényi foszfor-anyagcsere további genetikai vizsgálataihoz (Li *et al.* 2007). Négy bio napraforgóméz minőségi fizikai-kémiai paramétereit, mikrobiológiai biztonságát és antibakteriális hatását vizsgálta. A mikrobiológiai izolátumokat MALDI-TOF MS módszerrel azonosították. Az eredmények szerint a mézek megfelelnek a nemzetközi minőségi előírásoknak, mikrobiológiai szennyeződés nem volt kimutatható, és mind az öt vizsgált baktériumtörzs esetében erős gátló hatást mutattak 40-100%-os mézkoncentrációban. Ez megerősíti az organikus napraforgóméz hatékony antibakteriális tulajdonságait (Milosavljević *et al.* 2021). A napraforgó és olívaolaj hőhatás (180 °C, 6 óra) alatti triacil-glicerol oxidációját vizsgálták MALDI-TOF MS módszerrel, a poláris és nem poláris komponensek kromatográfiás szétválasztását követően. Ez a kombináció javította az oxidált vegyületek kimutathatóságát, megszüntette az ionelnyomást, és lehetővé tette kisebb mennyiségben jelen lévő oxidációs termékek detektálását is. Az eljárás gyors, érzékeny és specifikus eszközt nyújt a növényi olajok hőoxidációjának értékelésére (Picariello *et al.* 2009).

MALDI-TOF MS módszerrel vizsgálták a búzához társult baktériumizolátumok sokféleségét, 138 minta teljes sejtkivonatának elemzésével. A tömegspektrumok alapján kapott klaszterezés összhangban volt a génszekvencia-elemzéssel, amely *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* és *Curtobacterium* nemzetségek jelenlétét mutatta. A MALDI-

TOF teljes sejtes profilozás finomabb törzsszintű elkülönítést is lehetővé tett, így ígéretes eszköz a baktériumok gyors és részletes azonosításában (*Stets et al.* 2013). MALDI-TOF MS technikát alkalmaztak izoflavonok azonosítására szója mintákban. A 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB) mátrix bizonyult a legalkalmasabbnak, amely jó ismételtelőséget biztosított. Az izoflavonok főként protonált formában ionizálódtak, és a módszerrel 2 perc alatt készíthető el az izoflavon profil. A módszer hatékony eszköz a szója termékek izoflavonjainak azonosítására és feldolgozási változásaik vizsgálatára (*Wang és Sporns* 2000).

MALDI-TOF MS segítségével azonosítottak fajtaspecifikus fehérjéket japán és kanadai búzalisztekben, több mint 1600 fehérjepont elemzésével. Közülük 25 fehérje bizonyult fajtaspecifikusnak, ezek a specifikus fehérjék alkalmasak markerként a búzafajták azonosítására kevert lisztmintákban (*Yahata et al.* 2005). Egy optimalizált mintapreparálási módszert a nagy molekulatömegű glutenin alegységek gyors és pontos azonosítására szintén MALDI-TOF MS segítségével dolgoztak ki. Az eljárás stabil tömegspektrumokat és molekulatömegeket biztosított különböző búzafajtákból származó alegységekhez. Ez a módszer ígéretes eszköz a gabonafehérjék szerkezeti és funkcionális kutatásához (*Zhang et al.* 2008). A szójatej feldolgozása során a hőálló baktériumok miatt a termék sterilizációt igényel, ami azonban rontja a textúrát és az ízt. A textúra keményedése hőmérsékletfüggő, magasabb hőkezelés (110–121 °C) jelentősen növeli a keménységet, míg alacsonyabb hőmérséklet (85 °C) nem. A fő szennyező baktériumok a *Bacillus*, *Clostridium*, *Lysinibacillus* és *Brevibacillus* nemzetségek. Többek között MALDI-TOF MS technika segítségével megállapították, hogy a levegőnek kitett felületekről származik a legtöbb nem spóráképző baktérium, míg a nyersanyagok és feldolgozási segédanyagok hőálló baktériumokat juttatnak be, melyek biofilmet képezve tartós szennyeződést okoznak (*Zhao et al.* 2021).

Anyag és módszer

A genetikai homogenitás meghatározás előtt extrakciós kísérleteket végzünk, több napraforgószemből készült ún. átlagmintával. Ezek alapján határozzuk meg, jelöljük ki a vizsgált napraforgó minta genetikai vonalára jellemző marker fehérjéket. Az extrakciós kísérletek célja egyrészt az, hogy minél több információt kapjunk a vizsgált napraforgó vonalról és hibridről, minél több fehérje csúcsot azonosítsunk az extraktumok tömegspektrumában. Másrészt

meg kell találnunk azokat a marker fehérjéket, amelyeket a genetikai homogenitás vizsgálata során monitoroznunk kell. Az előki séreltek alapján választottuk ki a genetikai homogenitás vizsgálathoz alkalmazandó extrakciós eljárást is (Bojté 2022). Nincs univerzálisan alkalmazható mintaelőkészí tési módszer (Kussmann *et al.* 1997).

A mintákat a Debreceni Egyetem laboratóriumában egy Autoflex Speed tí pusú MALDI-TOF-TOF spektrométerrel vizsgáltuk. Az eredmények kiértékelése FlexAnalysis szoftverrel történt, amely biztosítja a zajszűrést, alapvonal korrekciót és a csúcsintenzitások elemzését.

Eredmények és értékelés

A genetikai homogenitás vizsgálatához meg kell határozni az adott tételekre jellemző fehérjeprofilokat. Ezek alapján markerfehérjéket azonosítunk, amelyek jellemző tömegszámú csúcspárok formájában jelennek meg. E csúcsok jelenléte vagy hiánya alapján következtettünk a vizsgált minták genetikai homogenitására.

A tömegspektrométeres mérés eredménye a tömeg/töltés arány (m/z) szerint ábrázolható. Az X-tengely az m/z értékeket mutatja, amelyek a detektált ionok tömegére utalnak, így meg tudjuk határozni, mekkora tömegű molekulák, például peptidek vagy fehérjék, illetve azok fragmentumai vannak jelen a mintában. Mivel az ionok általában egyszeresen töltöttek, az m/z értékek gyakorlatilag megegyeznek a fehérjék tényleges molekulatömegével daltonban (Da). A Y-tengely az intenzitást jelzi tetszőleges egységekben (a.u.), vagyis azt, hogy az adott m/z értékhez hány iont detektáltunk, tehát mennyi van belőle a mintában. A spektrumban található csúcsok a különböző molekulák jelenlétét tükrözik.

A spektrumon gyakran megjelennek zajos jelek, amelyek nem valódi ionokra utalnak. Ennek oka lehet az elektromos zaj a detektorban, háttéranyagok, például oldószerek vagy sók jelenléte, mérési instabilitás, vagy a minta előkészí tése során bekerült szennyeződés. A zaj apró, szabálytalan csúcsok formájában jelenik meg, amelyek nem kapcsolhatók konkrét molekulákhoz. A valódi jelek ezzel szemben élesek, magasak és ismételhetőek egy adott m/z értéknél, míg a zaj szabálytalan, alacsony intenzitású és nem jól definiált csúcsformájú. Minden vetőmagból kapott spektrum egyedi „fehérje ujjlenyomatot” ad, amely az m/z értékekből és azok intenzitásából áll. Ha a

vetőmagok homogének, a spektrumok nagyon hasonlóak lesznek, szinte azonos csúcsokkal és intenzitásokkal, míg a heterogén minták esetén a spektrumok eltérnek, ami a változatosságra utal. Egy adott csúcs jelenléte vagy hiánya jelzi a genetikai különbségeket, míg a csúcsok relatív intenzitása további információt nyújt a változatosság mértékéről.

A csúcslistában szereplő mérési paraméterek a mérés minőségéről és a csúcsok jellegéről adnak további információt. A Rel. Intens. (%) a legintenzívebb csúcshoz viszonyított százalékos érték, ami a csúcs dominanciáját jelzi. Az Intens. a detektált ionok abszolút számát jelenti. A S/N a jel/zaj arányt adja, tehát minél magasabb, annál megbízhatóbb a csúcs. A Res. (rezolúció) a csúcs élességét és elkülöníthetőségét jelzi, míg az Area, a csúcs alatti terület, a jel teljes mennyiségét mutatja, figyelembe véve mind a magasságot, mind a szélességet. Ezek az adatok együtt lehetővé teszik a spektrum minőségének és a minták homogenitásának megbízható értékelését.

A vizsgált napraforgó hibrid fehérje ujjlenyomata (1. ábra) a 2 000–22 000 m/z tartományban számos, jól elkülöníthető csúcsot tartalmaz.

1. ábra. Napraforgó hibrid fingerprintje

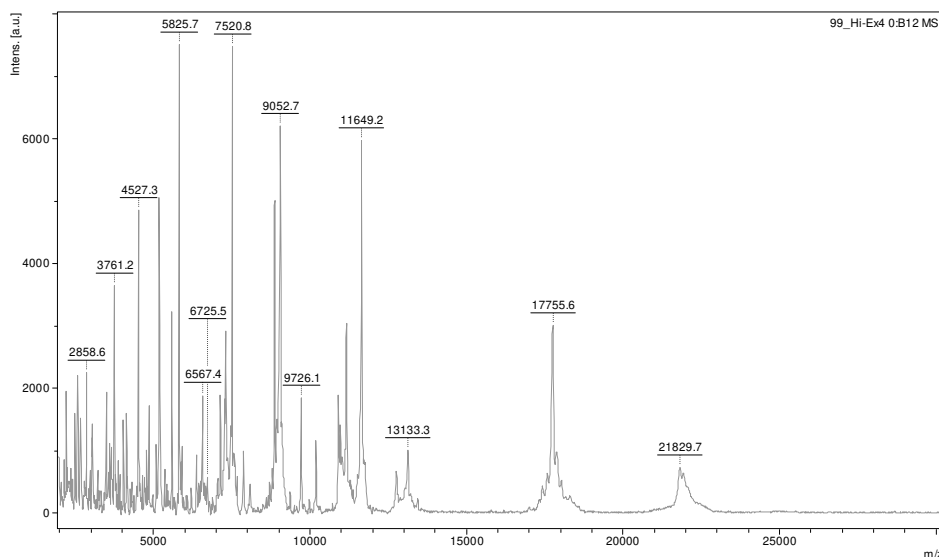


Figure 1. Sunflower hybrid fingerprint

Összesen mintegy 100 releváns jel azonosítható a csúcslista alapján (1. táblázat – a nagy terjedelem miatt csak részlegesen megjelenítve), amelyek közül több kiemelkedően magas intenzitást mutat.

1. táblázat. Az öt legjelentősebb csúcs csúcslistája

m/z (Da)	Rel. Int. (%)	Intensity	S/N	Res.	Area
5825,7	100	7513,94	26,7	949	74 894
7520,8	99	7475,51	31,1	955	87 480
9052,7	83	6211,45	29,9	706	229 795
11 649,2	80	5978,08	45,4	688	225 827
5195,9	67	5065,70	17,3	729	51 386

Table 1. Top five most significant peaks

A legdominánsabb csúcsok a 4527,3; 5195,9; 5825,7; 7520,8; 8878,7; 9052,7; 11 649,2 és 17 755,6 m/z értékeknél jelentkeztek, közülük a 5825,7 és 7520,8 m/z csúcsok közel 100%-os relatív intenzitással vannak jelen, míg a 9052,7 m/z 83%-os relatív intenzitású.

A csúcsok jel/zaj aránya (2–59), a rezolúció (>500 a legtöbb csúcsnál) a mérés jó minőségét jelzi. A spektrum dinamikartományja széles, a domináns csúcsok intenzitása több nagyságrenddel haladja meg az alacsonyabb jeleket. A csúcsok élessége, valamint a háttérjel minimális jelenléte egyértelműen a jó mintaelőkészítéssel és stabil ionizációra utalnak.

Következtetések

A spektrum alapján a vizsgált minta jól meghatározott, karakteres fehérje-ujjlenyomattal rendelkezik, amely alkalmas összehasonlító faj- vagy fajtaszintű azonosításra, illetve a homogenitás vizsgálatára. A 5–12 kDa (=m/z értékek) közötti fő markerek (pl. 5826, 7521, 9053, 11649 Da) és a 17–18 kDa régióban megjelenő erős jel (17756 Da) együttesen egyedi és könnyen reprodukálható profilt biztosítanak. A jel/zaj arány, a széles dinamikartomány és a csúcsok jó felbontása alapján a minta előkészítése és mérése technikailag sikeres volt. A kiegészítő mutatók (res, S/N, Area) egyaránt megerősítik, hogy a fő csúcsok stabilak és dominánsak. A közepes és nagy tömegű domináns

fehérjék jelenléte különösen értékes markereket biztosít, amelyek a későbbi homogenitás-vizsgálatok során kulcsszerepet játszhatnak. Az eredmények megbízható alapot adnak további statisztikai vagy klaszterezési elemzésekhez.

IRODALOM

- Ahmad, F.–Babalola, O. O.–Tak, H. I.*: 2012. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404. 4: 1247–1255.
- Bojté Cs.*: 2022. Különböző növényi vetőmagok genetikai homogenitás alkalmazhatóságának vizsgálata MALDI-TOF MS Technológiával. Doktori PhD értekezés. Debreceni Egyetem. Debrecen.
- Calvano, C. D.–Ventura, G.–Cataldi, T. R.–Palmisano, F.*: 2015. Improvement of chlorophyll identification in foodstuffs by MALDI ToF/ToF mass spectrometry using 1,5-diaminonaphthalene electron transfer secondary reaction matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407. 21: 6369–6379.
- Ferreira, L.–Sánchez-Juanes, F.–García-Fraile, P.–Rivas, R.–Mateos, P. F.–Martínez-Molina, E.–Velázquez, E.*: 2011. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS One*. 6. 5: e20223.
- Jergović, A. M.–Peršurić, Ž.–Saftić, L.–Kraljević Pavelić, S.*: 2017. Evaluation of MALDI-TOF/MS technology in olive oil adulteration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 94. 6: 749–757.
- Kussmann, M.–Nordhoff, E.–Rahbek-Nielsen, H.–Haebel, S.–Rossel-Larsen, M.–Jakobsen, L.–Roepstorff, P.*: 1997. Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry*. 32: 593–601.
- Li, K.–Xu, C.–Zhang, K.–Yang, A.–Zhang, J.*: 2007. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics*. 7. 9: 1501–1512.
- Milosavljević, V.–Zugic Petrović, T.–Mladenovic, K.–Grujović, M.–Kolašinac, R.–Orović, D.*: 2021. Quality assessment, antimicrobial activity organic sunflower honey and use of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification bacteria isolated from honey. *Progress in Nutrition*. 23. 2: e2021182
- Nikolić, Z.–Vujaković, M.–Jevtić, A.*: 2008. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins. *Helia*. 31. 48: 47–54.

- Picariello, G.-Paduano, A.-Sacchi, R.-Addeo, F.*: 2009. MALDI-TOF mass spectrometry profiling of polar and nonpolar fractions in heated vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 12: 5391-5400.
- Schiller, J.-Süß, R.-Petkovi, M.-Arnold, K.*: 2002. Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Food Lipids*. 9. 3: 185-200.
- Stets, M. I.-Pinto Jr, A. S.-Huergo, L. F.-de Souza, E. M.-Guimarães, V. F.-Alves, A. C Steffens, M. B. R.-Monteiro, R. A.-Pedrosa, F. de O.-Cruz, L. M.*: 2013. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Biotechnology*. 165. 3-4: 167-174.
- Wang, J.-Sporns, P.*: 2000. MALDI-TOF MS analysis of isoflavones in soy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48. 12: 5887-5892.
- Yahata, E.-Maruyama-Funatsuki, W.-Nishio, Z.-Tabiki, T.-Takata, K.-Yamamoto, Y.-Tanida, M.-Saruyama, H.*: 2005. Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour. *Proteomics*. 5. 15: 3942-3953.
- Zambonin, C.*: 2021. MALDI-TOF Mass Spectrometry Applications for Food Fraud Detection. *Applied Sciences*. 11. 8: 3374.
- Zhang, Q.-Dong, Y.-An, X.-Wang, A.-Zhang, Y.-Li, X.-Gao, L.-Xia, X.-He, Z.-Yan, Y.*: 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). *Journal of Cereal Science*. 47. 2: 252-261.
- Zhao, L.-Jia, L.-Ma, B.-Zhong, W.-Huang, Y.-Duan, F.*: 2021. Heat-resistant bacteria contamination investigation in Chinese soybean curd industrial processing using high-throughput gene sequencing and MALDI-TOF-MS. *LWT*. 147: 111618.

A szerző levelezési címe - Address of the author:

Kristó Attila
Debreceni Egyetem
Kerpely Kálmán Doktori Iskola
Debrecen
Böszörményi út 138.
H-4032
attilakristohun@gmail.com