

NÖVÉNYÉLETTANI VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

Dr. TAMÁS LÁSZLÓ
Dr. FODOR FERENC
Dr. NYITRAI PÉTER
Dr. OSZVALD MÁRIA
Dr. RUDNÓY SZABOLCS
Dr. SÁRVÁRI ÉVA
Dr. SOLTI ÁDÁM
Dr. SZIGETI ZOLTÁN
TÓTH GÁBOR

Növényélettani vizsgáló módszerek

**Dr. Tamás László
Dr. Fodor Ferenc
Dr. Nyitrai Péter
Dr. Oszvald Mária
Dr. Rudnóy Szabolcs
Dr. Sárvári Éva
Dr. Solti Ádám
Dr. Szigeti Zoltán
Tóth Gábor**

Növényélettani vizsgáló módszerek

írta Dr. Tamás László, Dr. Fodor Ferenc, Dr. Nyitrai Péter, Dr. Oszvald Mária, Dr. Rudnóy Szabolcs, Dr. Sárvári Éva, Dr. Solti Ádám, Dr. Szigeti Zoltán, és Tóth Gábor
Szerzői jog © 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Tartalom

1. Növénynevelés laboratóriumi kísérletekhez	1
1.1. A környezeti tényezők kontrollja	1
1.2. A tápelemek	2
1.3. Növénynevelés talajban	3
1.3.1. Homogén talaj víztartalmának meghatározása	3
1.3.2. Homogén talaj vízkapacitásának meghatározása	3
1.4. Növénynevelés tápoldatban	3
1.4.1. Tápoldatok összeállítása	4
1.4.2. A növények csíráztatása	4
1.4.3. Az ültetés	5
1.5. Feladatok	6
1.5.1. Uborka növények nevelése különböző tápoldatokban	6
1.5.2. Uborka és búza nevelése talajon	6
2. Porometria: a transpiráció mérése	7
2.1. Az AP4 porométer	8
2.1.1. A kalibrálás	8
2.1.2. A mérés	9
2.2. Feladatok	10
3. Infravörös gázanalízis	11
3.1. Az infravörös gázanalízátor	11
3.1.1. ADC 225 MK3 típusú infravörös gázanalízátor	12
3.1.2. Gázkeverék szén-dioxid koncentrációjának mérése	13
3.1.3. Levelek CO ₂ leadásának, illetve elnyelésének mérése	13
3.2. Feladatok	15
4. Radioaktív izotópok alkalmazása a növényélettani kutatásokban	16
4.1 Egyes alapfogalmak dióhéjban	16
4.2 Radioaktív izotópok, mint a biológiai nyomjelzés eszközei	16
4.3 Az izotópválasztás szempontjai	17
4.4 A radioaktív sugárzás mérése	18
4.5 A folyadékszintillációs mérés technikáról röviden	18
4.6 Az izotópokkal végzendő munka biztonsági előírásai	19
4.7 Zöld növények in vivo fotoszintetikus széndioxid fixációjának meghatározása	20
4.7.1 Feladatok	21
4.8 Ionfelvétel mérése gabonafélék levágott gyökerével	21
4.8.1. Feladatok	22
4.9 ⁵⁹ Fe adszorpciójának és felvételének mérése	22
4.9.1 Feladatok	23
4.10 Felhasznált irodalom	24
5. A fluoreszcencia leképezés alkalmazása a növényi stresszek detektálásában	25
5.1. Röviden a növényi stresszről általában	25
5.2. A növények fluoreszcencia sajátosságai	25
5.3. A stresszelt növények fluoreszcenciája	26
5.4. A fluoreszcencia leképező rendszer működése vázlatosan	28
5.5. A fluoreszcencia leképezéssel kapott képek kiértékelése	29
5.6. A mérés menete	32
5.7. Feladatok	33
5.8. Felhasznált irodalom	34
6. A fotoszintetikus oxigén evolúció és a légzés intenzitásának mérése polarográfias módszerrel	35
6.1. A Clark-típusú O ₂ -elektród	35
6.2. Joliot-féle O ₂ -elektród	36
6.3. Készülék típusok	36
6.3.1. A Hansatech gyártmányú O ₂ -elektród (6.1. ábra)	36
6.4. Függelék	39
6.5. Kloroplasztizsok intaktságának mérése K ₃ [Fe(CN) ₆] redukció alapján	39
6.6. Tesztfeladatok	40

6.7. Irodalom	40
7. A fluoreszcencia indukció felhasználása a fotoszintetikus apparátus működésének vizsgálatában	41
7.1. A fotoszintetikus apparátus alapvető működése	41
7.2. Klorofill-a fluoreszcencia indukció	41
7.2.1. A nem-fotokémiai kioltás (NPQ)	44
7.2.2. Hibalehetőségek a mérésben	46
7.3. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése pulzus amplitúdó modulációs (PAM) fluorométerrel	46
7.3.1. Mérés PAM fluorométerrel	48
7.4. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése diszkrét hullámhosszokon mérő fluorométerrel (FMM)	51
7.4.1. Mérés FMM fluorométerrel	52
7.5. Ajánlott irodalom	52
8. Növényi fehérjék vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel	53
8.1. Elméleti bevezetés	53
8.1.1. Az elektroforézis alapjai	53
8.1.2. A poliakrilamid gélek összetétele, struktúrája és előállítása	54
8.1.3. Mintakészítés a poliakrilamid gélelektroforézishez	55
8.1.4. A poliakrilamid gélelektroforézis körülményei	57
8.1.5. Gélelektroforézis módszerek	60
8.1.6. A proteinek detektálása	63
8.1.7. A gélek tárolása	66
8.1.8. Az elválasztott proteinek jellemzése/azonosítása	66
8.2. PAGE gyakorlatok	68
8.2.1. A fehérjék elválasztása denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE)	69
8.2.2. Enzimek elválasztása natív poliakrilamid gélelektroforézissel	70
8.2.3. Izoelektromos fókuszálás (IEF)	70
8.2.4. Natív állapotú fehérjekomplexek elválasztása „blue-native” poliakrilamid gélelektroforézissel (BN-PAGE)	71
8.2.5. Western blotting	72
8.2.6. Proteinek elektroforézisekor felmerülő gyakori problémák	72
8.3. Irodalom	73
8.4. Függelék	74
9. RNS kinyerése növényekből	78
9.1. Miért pont az RNS?	78
9.2. Néhány szó az RNS-ről	78
9.2.1. Az RNS általában	78
9.2.2. Az RNS a növényekben	79
9.3. Az RNS kinyerése	80
9.3.1. A kinyerés általános jellemzői	80
9.3.2. A minta feltárása és a makromolekulák denaturációja	81
9.3.3. A fehérjék eltávolítása és az RNS tisztítása	82
9.3.4. Az RNS koncentrációja	83
9.3.5. mRNS-ek és kis RNS-ek kinyerése	84
9.4. A kivonat ellenőrzése	85
9.4.1. UV-spektrofotometria	86
9.4.2. Agaróz gélelektroforézis	87
9.4.3. Egyéb ellenőrzési lehetőségek	88
9.5. Az RNS tárolása	89
9.6. Egy gyakran alkalmazott kinyerési recept	89
9.7. Feladatok	90
9.8. Ajánlott irodalom	90
10. DNS kinyerés növényekből	91
10.1. A DNS izolálás	91
10.2. DNS izolálás lépései	91
10.2.1. A sejtek/ szövetek feltárása	91
10.2.2. Fehérje denaturáció	92
10.2.3. RNS eltávolítása	92

10.2.4. A DNS elválasztása a fehérjétől és a további sejtselektóktól	92
10.3. Egyéb DNS tisztítási módszerek	94
10.4. DNS mennyiségi meghatározási módszerek	95
10.5. A gyakorlat menete	95
11. Nukleinsavak elválasztásának módszerei	96
11.1. A gélelektroforézis	96
11.2. Agaróz	97
11.3. Váltott elektromos mezéjú gélektroforézis (Field Inversion Gel Electrophoresis)	100
11.4. Feladatok	102
11.5. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	102
11.6. A gyakorlat menete	103
12. PCR a növényi molekuláris biológiában	105
12.1. A PCR módszer	105
12.1.1. A gyakorlaton alkalmazott két PCR módszer ismertetése	105
12.1.2. A szintetizált termék vizsgálata	106
12.2. A PCR reakció optimalizálása	107
12.2.1. Templát DNS kinyerése, tisztítása	108
12.2.2. Mg ion koncentrációja	108
12.2.3. Oligonukleotidok koncentrációja	108
12.3. Polimeráz enzim tulajdonságai	108
12.4. A reakcióelegy összemérése	109
12.4.1. Primer-dimer keletkezésének elkerülése, 'hot-start'	109
12.5. A PCR hőmérsékleti programja	109
12.6. A búzaliszt és a tészta	110
12.6.1. A liszt összetétele	110
12.7. A gyakorlaton vizsgált nukleinsav szekvenciák kapcsolata a liszt tulajdonságaival	112
12.7.1. A D genom alegységfehérjei	112
12.7.2. A Bx7 HMW-GS fehérje	113
12.8. Gyakorlat	114
12.8.1. Genomi DNS kinyerése a 12.1. táblázatban megadott négy búzafajta leveléből	114
12.8.2. DNS minták ellenőrzése	114
12.8.3. Határozza meg gradiens PCR program alkalmazásával, hogy mely DNS mintában van az 1Dx2, illetve az 1Dx5 HMW-GS allél!	115
12.8.4. Határozza meg nested PCR módszerrel, hogy mely DNS mintában van a normál, illetve a nagy mennyiségben termelődő Bx7 HMW-GS fehérje génje!	116
12.8.5. Határozza meg mely minta tartalmazza a GM búzára jellemző uidA gént!	118
13. Kvantitatív Real-Time PCR	120
13.1. Elméleti áttekintés	120
13.1.1. PCR kinetika és fluoreszcens detekció	120
13.1.2. Real-Time PCR készülék	121
13.1.3. Az amplifikációs görbe és az alapvonal, küszöbérték, Ct fogalma	121
13.1.4. Standard görbe és PCR hatékonyság	123
13.1.5. Normalizáció	126
13.1.6. A kísérleti Kontroll és Kalibrátor minta	127
13.1.7. Olvadási pont meghatározás	127
13.1.8. Relatív mennyiségi meghatározási módszerek	128
13.2. Példafeladatok	130
13.2.1. Előkíséreltek	130
13.2.3. I. Példafeladat	131
13.2.4. II. Példafeladat	144
14. Detergensek	151
14.1. A detergensek osztályozása	151
14.2. A detergensek fizikai-kémiai tulajdonságai	151
14.2.1. Kritikus micelláris hőmérséklet (CMT – Critical Micellar Temperature)	152
14.2.2. Kritikus micelláris koncentráció (CMC – Critical Micellization Concentration)	152
14.2.3. Az aggregációs szám (N)	152
14.2.4. Micelláris molekulatömeg (micellar Mr)	153
14.2.5. Felhő-pont (cloud-point)	153

14.2.6. Hidrofil-hidrofób egyensúlyi szám (HLB – hydrophile-lipophile balance number)	153
14.3. A detergensok viselkedését befolyásoló tényezők	154
14.4. A detergensok alkalmazásai	155
14.5. A detergensok kiválasztása	155
14.6. A detergensok eltávolítása	156
14.7. Megjegyzések	157
14.8. Függelék	158
14.9. Irodalom	158
15. Centrifugálás	159
15.1. Elve	159
15.2. A centrifugális elválasztás típusai:	160
15.2.1 Differenciál centrifugálás	160
15.2.2. Sűrűség-gradiens centrifugálás	160
15.3. A centrifugák típusai	160
15.3.1. Preparatív centrifugák	160
15.3.2. Analitikai ultracentrifugák	161
15.3.3. Egyéb centrifugák	161
15.4. Centrifuga rotorok	161
15.5. Centrifuga csövek	162
15.6. A centrifugálás közege	163
15.7. Gyakorlat	164
15.8. Irodalom	165

1. fejezet - Növénynevelés laboratóriumi kísérletekhez

szerző: Dr. Fodor Ferenc

1.1. A környezeti tényezők kontrollja

A szabad természetben élő növények életük során adaptálódtak az élőhelyükre jellemző környezeti tényezőkhez. E tényezők közül legmeghatározóbbak a fény, a hőmérséklet, a vízellátás és a levegő gázösszetétele. A fény intenzitása, összetétele egy adott helyen a napszakok, illetve az évszakok váltakozásától és az útjában lévő akadályoktól (pl. árnyékoló fák koronája) függ. A hőmérsékletre is ehhez hasonló változékonyság jellemző. A vízellátást meghatározzák a csapadékviszonyok és a talaj vízmegtartó képessége, míg a levegő gázösszetétele (páratartalom, CO₂, mérgező gázok koncentrációja) a légmozgástól függ. A talaj is számos pontról pontra változó paramétert mutat. Ezek közül kiemelkedik a szilárd talajrészecskék és a talajodat elemtartalma, a pH és a szerves anyag tartalom.

A növények fiziológiai vizsgálatához megmérhetjük különböző tulajdonságaikat a szabad természetben is, illetve mintákat gyűjthetünk, hogy ezeket utóbb a laboratóriumokban elemezzük, de az egyes mért értékek, pl. fotoszintetikus pigment koncentráció vagy a tápelem tartalom igen széles határok között változnak annak függvényében, hogy az adott növények milyen környezeti tényezőkhez alkalmazkodtak. Ugyanazon növényfaj egyedeinek akár egyetlen réten is eltérő lehet pl. a klorofill koncentrációja, így egy átlagos érték megállapításához nagyon sok mérést kell átlagolnunk, hiszen a környezeti tényezők befolyásolják a mért értéket. Ahhoz, hogy a genetikailag meghatározott optimális értéket meg tudjuk mérni egy-egy paraméterből, illetve két fajt/változatot össze tudjunk hasonlítani, előbb a környezeti tényezőket kell egységesíteni, optimalizálni. A növénynevelés során tehát mindenekelőtt erre törekszünk. Ennek érdekében a kísérletekhez úgynevezett kísérleti parcellákat hoznak létre, amelyekben az egymás melletti sorokban vagy parcellákban növekedő növényeket hasonló környezeti hatások érik. Ám ezek is talajban nőnek és a talaj elemtartalma pontról pontra változhat. Ezért a talajból mintát lehet venni, majd összekeverni, homogenizálni, és tenyészedényekbe tenni, ami nagyjából azonos tulajdonságú talajt biztosít a növényneveléshez. A környezeti tényezők egységes, állandó szinten tartását azonban az biztosítja leginkább, ha bevisszük a tenyészedényeket a laboratóriumba, pontosabban klimatizált növénynevelő helyiségekbe, kamrákba és ott kezdjük meg a nevelést. Ez már lehetővé teszi, hogy a növények különböző fiziológiai válaszreakcióit különböző kezelésekre biztonsággal tudjuk mérni csupán néhány, minimum 3-5 ismételt mérés segítségével is. Vannak azonban olyan paraméterek, amelyek még így is nehezen mérhetők. Például, ha azt szeretnénk megtudni, hogy a vizsgált növény gyökere mennyi káliumot vesz fel, akkor a talajban történő nevelés több szempontból sem a legjobb módszer. A méréshez ugyanis a gyökeret el kell távolítani a talajból. Az oldalgyökerek és gyökérszőrök azonban olyan mértékben belenőnek a talaj pórusaiba, és behálózják a talajrészecskéket, hogy csaknem lehetetlen megtisztítani őket. Ezért mosást alkalmaznak, ami viszont a gyökérből is eltávolíthatja a kálium egy részét. Így a tápelem felvételi vizsgálatokhoz a legalkalmasabbak a talaj nélküli, csak tápoldatot alkalmazó, úgynevezett hidropónikus növénykultúrák, vagy vízkultúrák.

A kutatáshoz felhasználható növények előállításának tehát alapvető követelménye, hogy a növény növekedéséhez szükséges feltételeket optimalizáljuk. Ehhez először is megfelelő intenzitású és hullámhosszú fényt kell biztosítanunk a nevelőkamrákban. A rendelkezésre álló sokféle világítóeszköz (fémhalogén, kvarc és LED izzók, fénycsövek stb.) közül a legmegfelelőbbek azok, amelyek a nappali fényhez leginkább közelálló spektrumú fényt biztosítják. A napfény intenzitását (kb. 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD, fotoszintetikus fotonáram sűrűség, lényegében fényintenzitás) a mesterséges világítóeszközök azonban általában nem érik el, de nincs is rá feltétlenül szükség, ugyanis a termesztett növények többsége jóval alacsonyabb (akár 150 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fényintenzitáson is gyorsan megnő. (A fény intenzitásának növekedésével a fejlődő hő mennyisége is nő, amit nehéz elvezetni – erre a problémára az új fejlesztésű világítóeszközök jelenthetnek megoldást.) Fontos még a fényperiódus, vagyis a sötét és megvilágított időtartam naponkénti aránya, amely befolyásolja a növények fejlődését (pl. virágzás). Ezt időzített kapcsolóórákkal lehet szabályozni.

A hőmérséklet szabályozását termosztáttal irányított hűtő és fűtő klímarendszerrel oldják meg. Nappal a hazai termesztett növények igénye szerint 25-27 °C-ra, míg éjjel 20-22 °C-ra állítjuk be a hőmérsékletet. Ezeken túl

biztosítani kell a légtérben az állandó páratartalmat (70%). Erre vagy olyan klímarendszer képes, amely a befűjt levegőt párasítja, vagy külön szabályozórendszerrel működtetett vízporlasztóra van szükség, amely desztillált víz permetet juttat a helyiségbe/kamrába. A növények neveléséhez egyes cégek kisebb vagy nagyobb méretű, akár szoba nagyságú, klimatizált ún. fitotron kamrát gyártanak (1.1. ábra). Ezekben, igény szerint, akár a levegő gázösszetételét is szabályozni lehet. A többi környezeti tényező mesterséges szabályozása a növénynevelés módjától függ: talajban vagy tápoldatban más tényezőkre kell figyelemmel lennünk.



1.1. ábra Kísérleti növények klímakontrollált nevelésére szolgáló, kis méretű, fitotron kamra

A talajkultúrák esetén csupán a megfelelő vízellátást kell biztosítanunk. A hidroponikus kultúrában a növény gyökere talaj helyett tápoldatba merül. Itt természetesen a növény vízellátása folyamatos, de problémaként merül fel a gyökér oxigénellátása és a tápanyag utánpótlás. A megfelelő oxigénellátást biztosíthatjuk a tápoldat időnkénti cseréjével, vagy levegő átbuborékolásával. A növény víz- és tápanyagfelvétele (ill. ionleadása) koncentrációváltozást okoz az oldatban, és emellett az oldat állandó pH-változásával is számolni kell. Ennek kiküszöbölésére szintén alkalmas a tápoldat csere, de használnak folyamatosan áramoltatott vagy átfolyó kultúrát is, amelyben az oldat tápanyagtartalmát állandó szinten tartják. A növény gyökere így mindig friss folyadék réteggel érintkezik. A növénynevelés ideális, ámde költséges módszere az ún. aeroponikus kultúra, amelyben egy rotor folyamatosan tápoldatot porlaszt egy kamra légtérébe. Ezzel a permettel érintkezik a gyökér.

A vízkultúrákat nemcsak laboratóriumi körülmények között használják, hanem nagyterületű, tökéletesen kontrollálható kereskedelmi áruterelésre is. Ezek az átfolyó kultúrák különösen ott gazdaságosak, ahol a fűtést a geotermikus energia szolgáltatja. Az átfolyó kultúra pH-ját és ion összetételét ion-szelektív elektródokkal ellenőrzik és a hiányzó ionokat automatikus rendszerek pótolják. Ezzel a technikával előre megrendelhető az érett, szállítható termés. A termésérés idejét a növényfajtákra vonatkozóan meg tudjuk állapítani ismert fény-, hőmérséklet viszonyok és tápanyag-összetétel esetén. Ilyen rendszerű paradicsom-termesztés megtalálható például Szentesen.

1.2. A tápelemek

Az autotróf növényeknek a szénen, oxigénen és hidrogénen kívül, amit CO_2 -ból és H_2O -ból nyernek, még 13 elemre van szükségük. Közülük a nitrogén, foszfor, kén, kálium, kalcium, magnézium nagyobb mennyiségben, a bór, mangán, cink, molibdén, réz, vas, klór kis mennyiségben esszenciális a legtöbb autotróf növény növekedéséhez.

A felsoroltakon kívül néhány elemre csak néhány fajnak van szüksége, pl. a kék alga fajoknak, sótűrő növények némelyikének nátriumra, néhány mikroorganizmusnak és szimbiontának kobaltra, a kovamoszatoknak szilíciumra, a *Scenedesmus obliquus*-nak vanádiumra van szüksége.

Az esszenciális elemek hiányában a növények növekedésében zavar támad, az egyes elemek hiányára jellemző tünetek jelennek meg. Korunk egyik jelentős környezeti-mezőgazdasági problémája, hogy az intenzív műtrágyázás relatív makro- és mikroelem hiányokat, vagy toxikus koncentrációkat hozhat létre. A növények optimális növekedéséhez nem elég csupán az esszenciális mikroelemek biztosítása, ugyanilyen fontos a tápanyagok aránya is a talajoldatban. Laboratóriumi körülmények között a tápanyagszükségletet legkönnyebben és legjobban kontrollálható módon vízkultúrában tanulmányozhatjuk.

1.3. Növénynevelés talajban

A kísérletek megkezdése előtt a felhasznált talaj jellemzőit meg kell határozni. Az alkalmazott mérések rendkívül sokfélék lehetnek, ezért itt csak a legfontosabbakat említjük. Megvizsgálják a talajt alkotó szemcsék méret szerinti eloszlását, a talaj fajlagos felületét, higroszkóposágát, vízfelvevő kapacitását és nedvesség tartalmát. A talaj szervesanyag tartalmát 600 °C-ra történő hevítés után tömegméréssel határozzák meg, pH-ját desztillált vizes vagy CaCl_2 -os kivonat segítségével mérik. A kémiai elemek koncentrációja a talajban széles határok között változhat. Az sem mindegy, hogy milyen formában vannak jelen, hiszen az oldható sókat a növények felvehetik, az oldhatatlanokat azonban nem. Így egyrészt meghatározható a talaj összes elemtartalma, amelyhez tömény salétomsavas kezeléssel kioldják a talajrészecskékből az oldható sókat. Másrészt a növénynevelés szempontjából fontosabb tudni, hogy a növények a talaj összes elemtartalmából mennyit képesek hasznosítani, illetve felvenni, azaz meg kell határozni a felvehető elemtartalmat. Ezt háromféle eljárással vizsgálják, majd az eredményeket összegzik: desztillált vizes, CaCl_2 -os és EDTA-s (etilén diamino teraacetsavas) kivonással. Magát a mérést atomabszorpciós spektrofotométerrel, vagy ICP-MS-sel (induktívan csatolt plazma tömegspektrométerrel) és hasonló analitikai eszközökkel végzik. A röntgenfluoreszcens méréstechnika azonban ma már jó közelítéssel akár a terepen is képes kis mennyiségű talajból megadni a benne található csaknem összes elem koncentrációját. Azt, hogy ezek az elemek milyen sók formájában vannak jelen, további analitikai mérésekkel határozhatjuk meg.

1.3.1. Homogén talaj víztartalmának meghatározása

Egységnyi tömegű homogén talajt helyezzük 105 °C-os termosztátba 24 órán át, majd mérjük vissza a tömegét. (Az így kezelt talajt légszáraznak tekintjük.) A két érték különbsége a talaj víztartalma, melyet a kiindulási talaj százalékában adunk meg.

1.3.2. Homogén talaj vízkapacitásának meghatározása

A megfelelő oxigén és vízellátás érdekében általában meghatározzák a talaj vízfelvevő képességét, vagyis vízkapacitását. Az a vízmennyiség, amelyet a talaj magába fogadni és megtartani képes, különböző talajoknál más-más érték. Nagysága függ a talajrészecskék méretétől, alakjától, valamint a kolloidális összetevők arányától. Értékét 100 g légszáraz talaj százalékában fejezzük ki. A talaj víztartalmát az ún. szántóföldi vízkapacitás 60%-ára kell a növénynevelés során beállítani.

A vízkapacitás meghatározásához lemérjük egy 10-12 cm hosszú és 3 cm átmérőjű, előzetesen 3 réteg gézzel lezárt üvegcső tömegét. Majd megtöltjük légszáraz talajjal, tömörítjük, lefedjük egy szűrőpapír koronggal, és a tömegét újra megmérjük. A csövet függőleges helyzetben állványra szereljük, majd szűrőpapír korongra lassan vizet csepegtetünk, amíg az alján a gáz átnedvesedik. Megvárjuk, míg a gravitációs víz lecsepeg, miután abbamaradt a csepegés, tömegét újra mérjük és a talaj, illetve az általa felvett és megtartott víz tömegének ismeretében kiszámítjuk a vizsgált talaj szántóföldi vízkapacitását.

1.4. Növénynevelés tápoldatban

A talaj a növények számára nem csupán tápelemeket és vizet, hanem megfelelő támasztékot is biztosít, amelyhez a gyökerek rögzítik a növényt. Ezt a funkciót a tiszta kvarchomok (SiO_2) ill. a perlit (vagy vermikulit) is betölti, de nem tartalmaz a növények számára felvehető elemeket. Éppen ezért, ezeket sokkal kontrolláltabban, ismert mennyiségben és arányban lehet a növénykultúrához adagolni, az öntözéshez használt tápoldatban. A tápoldatot

kombinálhatjuk kavicskultúrával is. Ennek lényege, hogy tisztára mosott kvarckavicsot ill. előre gyártott, égetett agyaggyalócskákat helyezünk a növénynevelő edénybe, majd tápoldatot öntünk rá, úgy hogy a folyadék szintje alacsonyabb legyen. A kavicsok ill. golyócskák felületén folyadékfilm képződik, amelyből a gyökér könnyedén felveheti a tápanyagot, ugyanakkor oxigénellátása is ideális.

1.4.1. Tápoldatok összeállítása

A tápoldat összeállításánál ügyelnünk kell arra, hogy a foszfát oldhatatlan csapadékot adhat a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionokkal, tehát ha só formájában adjuk a desztillált vízhez a bemért anyagot, várjuk meg, míg minden egyes anyag feloldódik, rázzuk össze az oldatot, és csak utána mérjük be a következő tápsót. A mikroelemekből, mivel koncentrációjuk nagyon kicsi, általában törzsoldatot készítünk, és ebből pipetázzuk ki a szükséges mennyiséget. A mikroelemek esetében ügyelnünk kell arra, hogy az optimális koncentráció nagyon szűk intervallum, könnyen jelentkezhet hiánytünet, és a mérgezés hatása is.

A tápelemek felvételének vizsgálatához a tápoldatból kihagyhatunk egy vagy több elemet is. Az ilyen ún. hiánytápoldatok összeállításánál ügyelnünk kell arra, hogy a különböző tápsók arányát helyesen válasszuk meg, pl. a lassan felvevődő SO_4^{2-} -tal nem pótolhatjuk teljesen a gyorsan mozgó NO_3^- aniont, hanem Cl^- -ot tartalmazó sókat is kell választanunk mellé. Az egyes anionoknak nemcsak az anyagcserében van szerepük, hanem ozmotikumként is befolyásolják a víz mozgékonyosságát, és emiatt a gyökérszívás által szállított víz mennyiségét. A hatások értékelésénél ezeket a tényezőket is figyelembe kell venni.

A különböző növények neveléséhez eltérő összetételű, tapasztalati úton összeállított tápoldat receptek állnak rendelkezésre az irodalomban. Ezeket a növényekben mérhető elemkoncentrációk segítségével alakították ki. Itt a legegyszerűbb Hoagland-tápoldatot mutatjuk be, amelynek összetételében a saját méréseink alapján határoztuk meg a mikroelemek arányát (1.1. táblázat). A tápoldatokhoz nem használhatunk csapvizet, mert az számos elemet tartalmaz, ami befolyásolná az oldat tervezett összetételét. Ezért kétszer desztillált vagy ioncserélt vizet alkalmazunk, mely utóbbinak rendszerint enyhén savas a pH-ja. A kész tápoldat pH-ja 5-5,5 függően a kiindulási víztől és az alkalmazott vasformától (Fe-EDTA vagy Fe-citrát).

1.1. táblázat: A módosított, 4-szeresére hígított Hoagland tápoldat összetétele

tápsó	molekulatömeg	koncentráció
KNO_3	101,1	$1,25 \cdot 10^{-3}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	236,15	$1,25 \cdot 10^{-3}$
MgSO_4	246,46	$0,5 \cdot 10^{-3}$
KH_2PO_4	136,09	$0,25 \cdot 10^{-3}$
Fe-EDTA / Fe-citrát	367,1	$1,0 \cdot 10^{-5}$
H_3BO_3	61,83	$1,156 \cdot 10^{-5}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,91	$4,60 \cdot 10^{-6}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,54	$1,9 \cdot 10^{-7}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,95	$1,2 \cdot 10^{-7}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	$8,0 \cdot 10^{-8}$

1.4.2. A növények csíráztatása

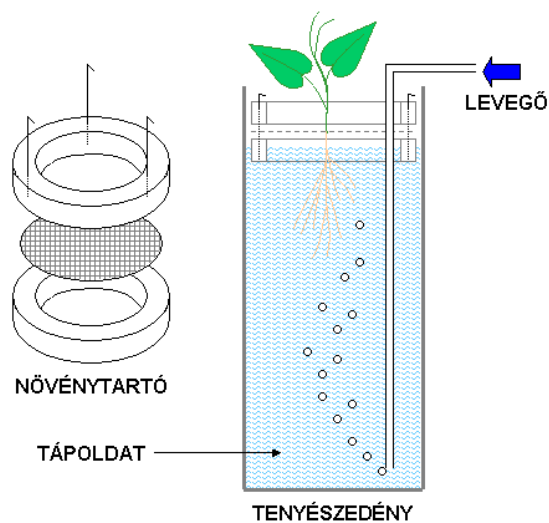
Tudományos munkához, iskolai bemutató kísérletekhez a magasabbrendű növények közül a jól, azonos idő alatt csírázó növényeket válasszuk ki. Leggyorsabban és legegyszerűsebben csírázik a búza és rozs, az árpa gyakran tartalmaz csírázást gátló anyagokat, amit 24 órás mosással el lehet távolítani. A kukorica csírázása gyakran egyenetlen, de a gyökere gyorsan nő. Jól használható olyan kísérletekben, ahol a sztélét (központi hengert) el kell választani a gyökér kéregrésztől.

A kétszikű növények közül jól használható a paradicsom és az uborka. Egy-egy növény kísérletbe való beállítása előtt mindig meg kell vizsgálni a rendelkezésünkre álló mag csírázási százalékát, a csírázás egyenetlenségét (fiziológiai, genetikai heterogenitás).

Az egyenletes növényi anyag kiválogatása érdekében a magokat Petri-csészében, 2 réteg desztillált vízzel nedvesített szűrőpapíron, sötét termosztátban csíráztatjuk, (ha a mag csírázása nem fényigényes).

1.4.3. Az ültetés

A csíranövények ültetése szintén sokféle módon történhet a növényfajtól, a nevelés tervezett időtartamától és a nevelés módjától függően. Itt egy házilag is könnyen elkészíthető nevelőeszközt mutatunk be, amely tetszőleges méretű, vízhatlan tenyészedényben alkalmazható, pl. uborka, paradicsom vagy búza esetében. 2 cm vastag polisztirol lapokból 4,5 cm átmérőjű és 0,5 cm vastag karikákat vágunk a polisztirol olvadási hőmérsékletére melegített 0,2 mm vastag dróttal. (A kivágó szerkezet gyermekjátékként forgalomba került, de házilag is könnyen összeállítható). Két karika közé megfelelő lyukméretű műanyaghálóból vágott korongot teszünk, és a polisztirol karikákat rozsdamentes acélútkkel néhány helyen összetűzzük. Az így elkészített növénytartó a víz felületén úszik, a tápoldatból bármikor könnyen kiemelhető és áthelyezhető egy másik kísérleti oldatba anélkül, hogy a növény gyökere bármilyen sérülést szenvedne (1.2. ábra).



1.2. ábra A növények neveléséhez használt növénytartó szerkezete és elhelyezése a tenyészedényben

A növények neveléséhez 500 ml űrtartalmú műanyag edényeket használunk, amelyekből két sorozatot készítünk elő a tápoldatok cseréjéhez. A polisztirol növénytartókat ültetéskor ezekben az edényekben helyezük el.

A kicsírázott magvak közül azokat válogatjuk ki, amelyeknek 2 cm-es gyököcskéjük van. A növényeket a neveléshez kiválasztott, felirattal ellátott edényekbe, 0,5 mM koncentrációjú CaSO_4 -oldatra helyezzük. Annak érdekében, hogy a gyököcske ki ne száradjon, több réteg, desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírral borítjuk, majd termosztátba helyezzük.

A növényeket addig tartjuk a sötét termosztátban, megfelelő hőmérsékleten, amíg a koleoptil, vagy a hipokotil 1-1,5 cm-es lesz. Ehhez maximálisan 48 órára van szükség. Ezután a CaSO_4 -oldatot tápoldatra cseréljük és a növényeket a nevelőkamrába helyezzük. A tápoldatot hetenként háromszor frissre cseréljük, de ha szükséges, akkor akár naponta is. A cserék gyakoriságát a növények mérete, növekedési üteme határozza meg, ill. az, hogy levegőztetjük-e a tápoldatot vagy sem.

A gabonaféléket (pl. búza, rozs) ettől eltérően neveljük. A búza-, rozs szemeket sterilizálás céljából, 3%-os H_2O_2 -dal 5 percig rázzuk. A mag : oldat arány 1 : 5. A magokat fertőtlenítés után először csapvízzel, majd desztillált vízzel alaposan átmoszuk. Ezt követően, átfolyó csapvízben, 24 órán át megduzzasztjuk és az ültetést a fentebb ismertetett módon elvégezzük.

1.5. Feladatok

1.5.1. Uborka növények nevelése különböző tápoldatokban

Vetés: 15 cm átmérőjű Petri-csészébe két réteg szűrőpapírt helyezünk, és 12 ml ioncserélt desztillált vízzel (vezetőképessége max. 3 μ S) megnedvesítjük. A Petri-csészébe körkörös elrendezésben 50 uborkamagot helyezünk el és 30 °C-os sötét termosztátban egy napig csíráztatjuk.

Ültetés: Műanyag edényekbe 200-200 ml 0,5 mM-os CaSO_4 -oldatot öntünk. Edényenként 3-3 db csiranövényt ültetünk a korábban összeállított növénytartóra. A növényeket desztillált vízzel nedvesített szűrőpapír korongokkal fedjük be. Az edényeket is takarjuk be nedvesített szűrőpapírral és helyezzük vissza a sötét termosztátba.

A növények fényre és tápoldatra helyezése: A növényeket egy nap múlva 400 ml tápoldatot tartalmazó edényekbe tesszük, és átvisszük a növénynevelő helyiségbe. A kísérletekhez négyszeresére hígított Hoagland-tápoldatot használunk, amelyhez a szükséges makrosókat általában 1000-szeres, a mikrosókat 4000-szeres töménységű törzsolatok formájában készítünk elő. Hiánytápoldatot vagy a kísérleti célnak megfelelő adalék anyagokat tartalmazó tápoldatokat készítünk az alábbiak szerint.

kontroll: Fe-EDTA-t vagy Fe-citrátot tartalmazó teljes tápoldat

Fe hiánytápoldat: a teljes tápoldatból kihagyjuk a vasat,

Cd kezelés: a teljes tápoldathoz 0,01 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot adunk,

Pb kezelés: a teljes tápoldathoz 0,01 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -ot adunk,

Cu kezelés: a teljes tápoldathoz 0,01 mM CuSO_4 -ot adunk,

Cu-EDTA kezelés: a teljes tápoldathoz 0,01 mM CuSO_4 -ot és 0,01 mM K_2EDTA -t adunk

NH_4 -tápoldat: a teljes tápoldatból kihagyjuk a nitrátot tartalmazó sókat és helyettük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot, K_2SO_4 -ot és CaCl_2 -ot mérünk be a szükséges koncentrációban,

KHCO_3 -pufferolt tápoldat: az NH_4 -tápoldathoz mérjük be 10 mM KHCO_3 -ot.

Mérés, értékelés: Mérjük meg a friss és a használt (2 napos) tápoldatok pH-ját! Mérjük meg a két hetes növények részeinek (gyökér, szár, sziklevel, levelek) friss tömegét, majd 80 °C-on tömegállandóságig történő szárítás után a száraz tömegét! (A gyökér friss tömegének méréséhez több réteg szűrőpapír segítségével távolítsuk el a tápoldatcseppeket!) Számítsuk ki a száraztömeg százalékos értékét! Minden adathoz számítsuk ki az egyes növényekből (növényi részekből) mért átlagot és a szórást! Értékeljük a kezelések hatását a gyökér anyagcseréjére (elsősorban H^+ leadás), a növény víztartalmára és növekedésére!

1.5.2. Uborka és búza nevelése talajon

Talaj előkészítése: Határozzuk meg a felhasznált talaj víztartalmát és szántóföldi vízkapacitását. Számítsuk ki a vízkapacitás 60 %-át egységnyi talajra nézve. Az ültetéshez előkészített tenyészedenyeket töltjük fel a szükséges mennyiségű talajjal, majd nedvesítjük meg.

Ültetés, nevelés: Ültessünk el cserepenként (15 cm átmérő esetén) 5-5 uborkamagot, illetve 10-10 búzaszemet. Helyezzük el a cserepeket a növénynevelő kamrában.

Mérés, értékelés: Két hét nevelés után mérjük meg a növények részeinek (gyökér, szár, sziklevel, levelek) friss tömegét, majd 80 °C-on tömegállandóságig történő szárítás után a száraz tömegét! (A gyökér friss tömegének méréséhez távolítsuk a talajt csapvizetes mosás segítségével, majd több réteg szűrőpapírral távolítsuk el a felületéről a vízcsseppeket!) Számítsuk ki a száraztömeg százalékos értékét! Minden adathoz számítsuk ki az egyes növényekből (növényi részekből) mért átlagot és a szórást! Értékeljük a növények növekedését a talaj és a tápoldat viszonylatában!

2. fejezet - Porometria: a transpiráció mérése

szerző: Dr. Fodor Ferenc

A transpiráló levelekben a víz a sejtfalából párolog el, majd diffúzióval a sztomák alatti légudvarba kerül, áthalad a légrésen, kijut a levegő nem keveredő rétegébe, végül az atmoszférába. A fotoszintézisben felhasználódó széndioxid ugyanezt az útvonalat követi ellentétes irányban. A gázcsere nyílásokon keresztül történő gázáramlása a porometria.

Valamely levéllemezben, a légrés ellenállása egy bizonyos gázra nézve csupán a légrés geometriájától, méretétől és egymástól való távolságától függ, míg a levegő nem keveredő rétegének ellenállása függ a levél tulajdonságaitól és a szélességtől.

Különböző növényfajokban az átlagos sztomaszám mm^2 -enként 100-200, melyek lehetnek a levél színén és fonákán egyaránt (amfisztomatikus levél), csak az abaxiális epidermiszben (hiposztomatikus levél), vagy ritkábban csak az adaxiális epidermiszben (episztomatikus levél). A légrés mélysége 10 és 30 μm , mérete a zárósejtekkel együtt 10 és 80 μm .

A sztomák mérete fordítottan arányos a sűrűségükkel, így az általuk által elfoglalt levélfelület kevésbé váltakozik fajonként, és általában 1% körül mozog (6 μm átlagos légrésszélesség esetén). A sztomák formája és eloszlása annál változatosabb: az egyszerű fűféléken hosszúak és keskenyek, sorokba rendeződnek, melyek párhuzamosan futnak a főérrel, míg a kétszikűek levelein ellipszis alakúak és látszólag véletlenszerűen, de egymástól nagyjából egyenletes távolságra helyezkednek el.

A sztomák nyitódását, illetve záródását befolyásolja a fény, a széndioxid, a hőmérséklet, a szennyező anyagok, a szárazság- és vízstressz, valamint a patogének. A porometria alkalmas a különböző növényfajok és változatok környezeti tényezők változására adott válaszreakciójának összevetésére. A porometriás mérés során a levél felületnek vízgőzleadással szembeni ellenállását, rezisztenciáját mérjük. Ez a levél, illetve növény fiziológiai állapotára jellemző érték. A mérés során a levélből távozó vízgőz megnöveli a páratartalmat a cellában, amit egy mikroszenzor érzékel. A szóban forgó készülék tehát csupán a vízgőzleadást méri, más gázokat nem. A készülék a gyakorlatban, az adott környezeti tényezők mellett történő kalibráció során, az alkalmazott cellához előre beállított páratartalom érték eléréséhez szükséges időt méri. Ezt azután összeveti a gyári kalibrációs lemezhez tartozó értékekkel. Ebből következően az adatokat rezisztencia egységekben kapjuk meg. A növények vízgőzleadása szempontjából azonban sokkal egyszerűbben értelmezhető az egységnyi felületen és idő alatt távozó víz moljainak száma, amely az alábbiak szerint számítható.

Az ellenállást, rezisztenciát az alábbi összefüggés írja le:

$$E = \frac{\delta\Phi}{r}$$

ahol E a vízgőz áram mértéke, mely kifejezi, hogy egységnyi idő alatt, egységnyi felületen keresztül mennyi víz halad át [$\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$] vagy [$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$], $\delta\Phi$ pedig a koncentráció különbség, az r pedig a vízárammal szembeni ellenállás értéke. Φ [g m^{-3}] vagy [mol m^{-3}]. A vezetőképesség, vagyis konduktancia, a rezisztencia reciprokaként értelmezhető:

$$c = \frac{1}{r}$$

Fentiekből következik, hogy r mértékegysége [s m^{-1}] és c mértékegysége [m s^{-1}]. Ha a koncentrációt (Φ) a víz és a levegő móljainak hányadosaként adjuk meg, [mol mol^{-1}], akkor a rezisztencia mértékegysége is tartalmazni fogja az anyagmennyiséget [$\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$]. Ekkor $E = [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}]$, $c = [\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}]$. A növények transpirációjának

jellemzésére a legkézenfekvőbb a konduktancia és ez utóbbi mértékegység használata, amely a mérőkészülékben közvetlenül beállítható és az idő és felületegységen át leadott víz mennyiségét jelenti.

2.1. Az AP4 porométer

A mérés előtt a készülékhez (AP4 porométer) csatlakoztatnunk kell a mérőcellát tartalmazó fejet és egy száraz szilikagéllel feltöltött műanyagoszlopot. A készülék hordozható, akkumulátor üzemelteti, de a hálózatra csatlakoztatva is működtethető. A kalibráláshoz szükség van egy gyári (műanyag) kalibrációs lemezre, méretere vágott szűrőpapír lapocskákra, szűrő- vagy vatta papírra, széles, vízhatlan ragasztószalagra, egy egyenes ollóra és kevés vízre. A mérés után a porométerből az adatokat RS232 kábelen keresztül számítógépre menthetjük, amelyhez előzőleg telepítenünk kell a letöltő szoftvert (2.1. ábra).

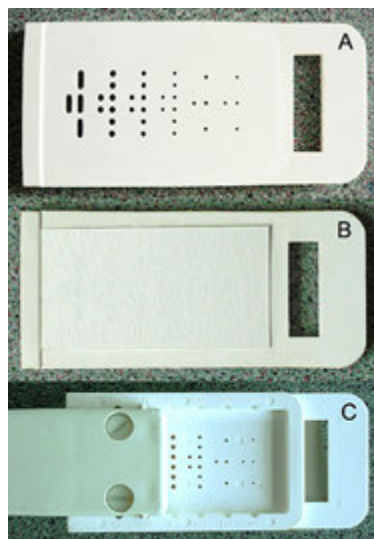
A porométer legérzékenyebb része a mérőfej, amely a kalibrációs lemezre, illetve a levelekre csíptethető. Ez tartalmazza a páratartalom-mérő felületet a cellában. Emellett található egy mikrochip termisztor (miniatűr hőmérő), amely a cella hőmérsékletét méri, illetve a „csipesz” másik oldalán, egy hajlékony szilikongumi lapba ágyazva egy másik termisztor, amely a levél hőmérsékletét méri. (A szilikongumi biztosítja, hogy a levelet sérülés- és légmentesen lehessen a mérőcellára szorítani.) Végül, a fej tartalmaz még egy fénymérőpanelt is.



2.1. ábra AP4 porométer és tartozékai (a Delta-T Devices Ltd. engedélyével) (A) és a mérőfej nyitott állásban (B)

2.1.1. A kalibrálás

A mérés előtt legalább egy órával nedvesítsünk meg egy előre elkészített szűrőpapír lapocskát, majd két réteg szűrő- vagy vattapapír között itassuk le róla a felesleges vizet, majd ismételjük meg ezt a lépést még háromszor friss (száraz) felületek között. A kész lapocskát helyezzük rá a gyári kalibrációs lemezre a 2.2. ábra szerint, majd ragasszuk le a ragasztószalaggal és vágjuk le a felesleges részeket. Az így előkészített kalibráló lemez akár napokig is tárolható a műanyag tokjában.



2.2. ábra AP4 porométerhez tartozó kalibráló lemez összeállítása és a mérőfej elhelyezése a lemezen. A. A műanyag kalibráló lemez, B. A szűrőpapír csík elhelyezése a kalibráló lemezen, C. A mérőfej elhelyezése a lemezen.

A készülék bekapcsolása előtt várjuk meg, amíg az felveszi a környező levegő hőmérsékletét. Kapcsoljuk be a készüléket, ellenőrizzük az elem töltöttségét és a memóriát, állítsuk be a dátumot és az időt, majd válasszuk ki a kalibráció üzemmódot. Mérjük le a légköri nyomást, a környező levegő páratartalmát és állítsuk be a mért értékeket. A fej csipesz-részének kismértékű nyitásával helyezzük el a kalibrációs lemezt az első vagy a hatodik, majd az ezt követő pozíciókba (2.2. ábra). (A különböző pozíciókban növekvő átmérőjű fűrt lyukak találhatók a lemezen.) A kalibráló mérés elindítása után a készülék belső pumpája segítségével a kívülről beszívott levegőt átnyomja a szilikagéllel feltöltött oszlopon, majd a mérőcellát tartalmazó fejhez vezető csövön, végül feltölti a cellát vízgőzmentes levegővel. Ezután a megnedvesített szűrőpapírból elpárolgó vízgőz telíti a cellát a kalibráló lemez furatain át és a gyárilag előre beállított érték elérésekor a készülék leállítja a mérést, kijelzi az integrációs időt, majd újraindítja az egész folyamatot. További beavatkozás nélkül ez ismétlődik ciklikusan mindaddig, amíg a két egymást követő mérési ciklus között a különbség megszűnik (vagy lecsökken), tehát a kijelzett érték stabilizálódik, amit a készülék egy dupla sípolással is jelez. Ekkor, tetszés szerinti ciklusszám után leállíthatjuk a mérést és továbbléphetünk a következő pozícióba. Az összes pozíció lemérése után a készülék kalibráló görbére illeszti az adatokat és amennyiben a beállított páratartalom és hőmérséklet értékek mellett kisebb a különbség a gyári értékekhez képest, mint 5 %, akkor elfogadjuk és átlépünk a mérési funkcióba. Amennyiben ennél nagyobb a különbség, akkor újra kezdjük a kalibrációs mérést, melyhez elegendő csupán a kijelzőn olvasható összehasonlító lista szerinti legrosszabb adatokhoz tartozó pozíciókban ismételni.

2.1.2. A mérés

A levél formájának megfelelően a porométerhez (AP4, Delta-T Devices, Cambridge, U.K.) kétféle mérőcellát alakítottak ki: egy hosszú, keskeny és egy kör alakú cellát. A cellát tartalmazó mérőfejet úgy rögzítjük a levélen, hogy annak szilikongumival körülhatárolt része a levéllemez kiválasztott szegmensét teljes egészében lefedje a megfelelő oldalon (2.3. ábra). Egy-egy mérésnél tehát erre a kis levélfelületre jellemző értéket mérjük. A levelek azonban eltérő fejlettségűek, árnyékolhatják egymást és különböző mértékben lehetnek érintettek a környezeti stresszhatások által. Ezért az egész növényre, illetve levélre jellemző érték eléréséhez célszerű több pozícióban, a sztómák eloszlásának függvényében az alsó és felső epidermiszen is megismételni a mérést, melyet később átlagolunk. A mérés indítása után ugyanaz történik, ami a kalibráció során és minden automatikus mérési ciklus után leolvashatók az aktuális adatok az előzőleg beállított mértékegységben. A készülék tehát addig ismétli a ciklusokat ebben az üzemmódban is, amíg a stabilnak tekinthető, egymástól nem vagy alig különböző értékeket (melyek elérését itt is dupla sípolás jelzi) el nem fogadjuk és a ciklust le nem állítjuk. A mérés során leolvasható a cella és a levél hőmérséklete közötti különbség, mely nem lehet több 1°C-nál, bár a készülék korrigálja a különbséget. Ennek érdekében várjuk meg, míg a hőmérsékletek kiegyenlítődnek. Eltárolás előtt megjegyzést fűzhetünk az adathoz (pl. klorotikus levélszegmens), majd a fejbe épített fénymérő segítségével, melyet a levél eredeti pozíciójának megfelelő irányba forgatunk, lemérjük a PPF (fotoszintetikus fotonáram sűrűség, [$\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$]) értékét is.



2.3. ábra AP4 porométer mérőfejének elhelyezése a levélen a transpiráció levél fonákján végzett méréséhez

A mért adatok átlagolásánál ügyeljünk arra, hogy több növényen végzett mérések esetén, csak azonos pozícióban található leveleket átlagoljunk. Laboratóriumban nevelt növények esetén, ahol a környezeti tényezők stabilak, az alacsony szórás és a statisztikailag szignifikáns különbségek eléréséhez elegendő lehet 9 átlagolható adat, de a szabadföldi mérések esetén ennél jóval nagyobb adatmennyiségre van szükség.

Az AP4 porométer mikroprocesszorral vezérelt műszer, ami lehetővé teszi, hogy a kalibrálást nem kell a környezeti tényezők kis megváltozása esetén is újra elvégezni, hanem automatikusan korrigálja a mért adatokat. Ennek ellenére mégis szükség van ismételt kalibrálásra, ha a hőmérsékletváltozás meghaladja az 5 °C-t, vagy megváltozik a levegő páratartalma az előzőleg beállított értékhez képest. 80% relatív páratartalom felett a mérés bizonytalanná válik, a porométer használata csak ez alatt az érték alatt javasolt.

2.2. Feladatok

Kalibráljuk a készüléket! Mérjük meg az uborka levelének transpirációját (sztóma konduktanciáját vízgőzre nézve a transpiráció és a sztóma konduktancia nem azonos) $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ egységekben, mind a levél színén, mind a fonákán. Átlagoljuk az adatokat és számítsuk ki a szórást! A méréshez kontroll, vashiányos és kadmiummal kezelt növényeket használjunk. Magyarázzuk meg a különbségeket a vashiány és a Cd vízháztartásra gyakorolt hatása alapján!

3. fejezet - Infravörös gázanalízis

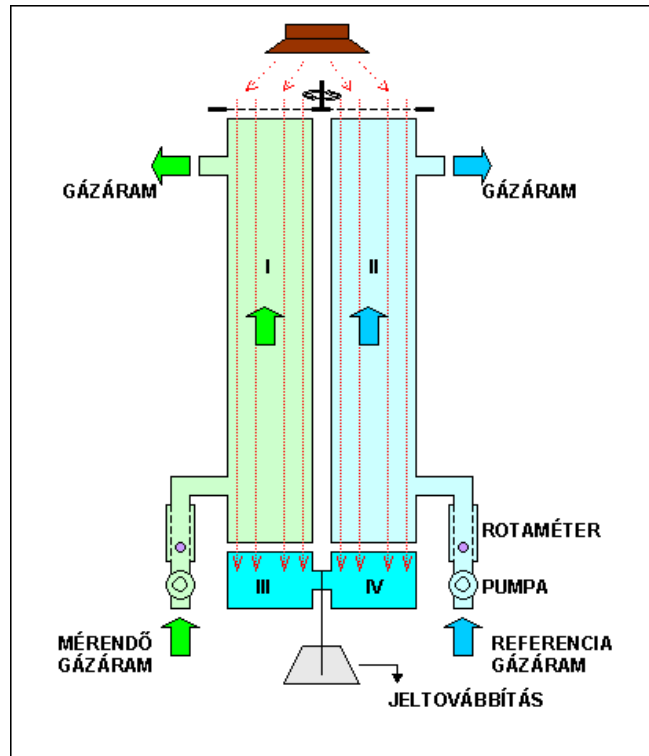
szerző: Dr. Fodor Ferenc

A növényi gázcsere vizsgálatának egy másik eszköze az infravörös gázanalízis (angolul infra red gas analysis, IRGA). Ez a módszer azonban nem csupán a levelek vízleadását, hanem a fotoszintetikus szén-dioxid fixációt, illetve a légzési szén-dioxid leadását is képes mérni. Sőt, ezeken túl, mérni lehet vele a levegő (gáz) minta kén-dioxid, nitrogén-oxid, ammónia és szén-monoxid koncentrációját is. Ennek köszönhetően az IRGA az ökofiziológiai mérések fontos eszköze.

A 800 nm feletti, infravörös fény elnyelése az egyes gázok esetében jellegzetes abszorpciós spektrumot mutat, amit az elektromos töltések egyenlőtlen eloszlása, vagyis a dipólus momentum okoz a molekulákban. Ezeket a molekulákat az infravörös sugárzás gerjeszti. Csak olyan gázok képesek erre, amelyek molekulái különböző atomokból épülnek fel, vagy amelyek több mint két azonos atomból állnak. Ez utóbbiak ugyanis szintén dipólus momentumra tehetnek szert azért, hogy az atomjaik hol közelednek, hol pedig távolodnak egymástól, vagyis oszcillálnak. Ilyen gázra példa a három oxigén atomból álló ózon, amelyben a két-két oxigén közti távolság váltakozó, ezáltal időlegesen pozitív és negatív pólus alakul ki a molekulákban. Ennek megfelelően a két azonos atomból álló gázok inszenzitívek az infravörös sugárzásra, mert bár molekuláikban az atomok távolsága változhat, de nem változik a töltéseloszlás. Ilyen gáz pl. az oxigén, a nitrogén vagy a hidrogén.

3.1. Az infravörös gázanalizátor

Az infravörös gázanalizátor elvi felépítését a 3.1. ábra mutatja. A készülék négy gázkamrából áll. Az I. és II. kamra inkább tekinthető csőnek, amelyen a referencia, ill. a mérő gázáram halad át. A referencia gázáram ismert, állandó összetételű gáz adott sebességgel történő áramoltatását jelenti, amelyet egy gázpumpa biztosít, és egy rotaméter (gázáramlás mérő) segítségével mérünk, illetve szabályozunk. A mérendő gázt ugyanilyen sebességgel áramoltatjuk át a másik oldalon. Az előbbi kamrák alatt helyezkedik el a III. és IV. kamra, amelyek zártak és azzal a gázzal vannak feltöltve, amit mérni szeretnénk. E két utóbbi kamrát egy membrán választja el egymástól, amely alaphelyzetben – amikor a két kamrában azonos a gáz nyomása – semelyik irányban sem domborodik ki. Az infravörös fényforrásból származó és a mérendő gáznak megfelelő hullámhosszú sugárzás egyenletes eloszlását a referencia- és a mérő oldal között egy forgó korong biztosítja, amely azonos ritmussal szakítja meg a sugárzást mindkét oldalon. A mérés során a referencia- és a mérő kamrában áramló gázkeverékben a vizsgált gáz molekulái koncentrációjuknak megfelelő mértékben elnyelik az infravörös sugárzást, amelyből így kevesebb jut át az alsó kamrákba. Az ezekben lévő gáz nyomását az odaérkező sugárzás a zárt térben megnöveli. A két gázkörben mérhető gázkoncentráció különbséget az alsó kamrák közti membrán a nyomáskülönbségnek megfelelő alakváltozása jelzi, amelyet jelerősítés után analóg vagy digitális kijelzőn olvashatunk le.



3.1. ábra Az infravörös gázanalizátor egyszerűsített modellje és működésének vázlatja. (I. mérő gázkamra, II. referencia gázkamra, III-IV. a mérendő gázzal feltöltött, zárt gázkamrák)

Az IRGA segítségével a gyakorlatban megmérhetünk gázmintákat, melyeket a környezetben gyűjtöttünk be, de megmérhetjük egy-egy növény, vagy csupán egy levélrészlet gázcserejét is. A mérés menetét egy laboratóriumi (nem szállítható) készüléken, az ADC 225 MK3 típusú infravörös gázanalizátoron mutatjuk be, amelyet szén-dioxid mérésére állítottunk be.

3.1.1. ADC 225 MK3 típusú infravörös gázanalizátor



3.2. ábra ADC 225 MK3 infravörös gázanalizátor

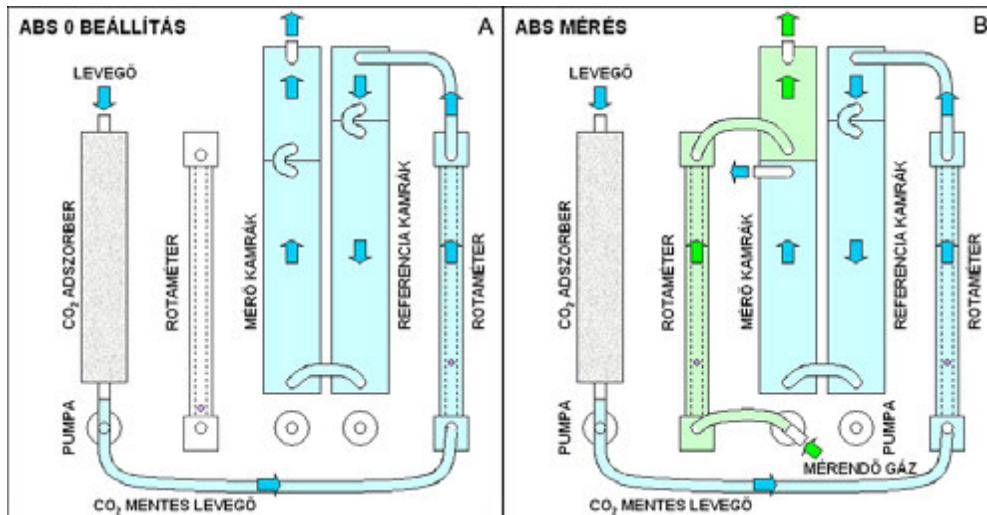
A mérés fentebb olvasható elvét szem előtt tartva a készülékben az I. és II. gázkamra további két részre osztható. A referencia gázkörben az I. kamra egy 98 és egy 2 %-os, a mérő gázkörben a II. kamra egy 95 és egy 5 %-os szeparálható szakaszból áll. Ezek a szakaszok együtt és külön is üzemeltethetők úgy, hogy szilikonsövegekkel kötjük össze őket. A készülék egy pumpa segítségével a környezetében található levegőt be tudja szívni és áthajtani egy adszorbenssel (CaO/NaOH) töltött üvegsövön. Az adszorbens megköti a levegőből a szén-dioxidot, így ennek

segítségével a gázkamrákon szén-dioxid mentes gázt tudunk átáramoltatni. A kamrák szakaszolására és a szén-dioxid mentesítésre a készülék kalibrálásakor van szükség.

3.1.2. Gázkeverék szén-dioxid koncentrációjának mérése

1. Kapcsoljuk be a készüléket a „Power On” gomb segítségével, legalább egy órával a mérés előtt, majd kapcsoljuk a mérésmód választó kapcsolót „ABS” állásba.

2. Állítsuk be a 3.8.A ábrán látható összeköttetést szilikoncövekkel úgy, hogy a szén-dioxid mentesített levegő áthaladjon mind a referencia gázkörön, mind pedig a mérő gázkörön, a kamrák teljes hosszában. A készüléken most tehát nem halad át szén-dioxid, így beállíthatjuk a „0” értéket a „zero control” gombbal.



3.3. ábra ADC 225 MK3 infravörös gázanalizátor mérőkamráinak kapcsolási rajza gázelegyek CO₂ koncentrációjának méréséhez. A. A „0” érték beállítása CO₂-mentes gázelegy (levegő) átáramoltatása során. B. Ismert (kalibráláskor) és ismeretlen összetételű gázelegy mérése CO₂-mentes levegővel szemben.

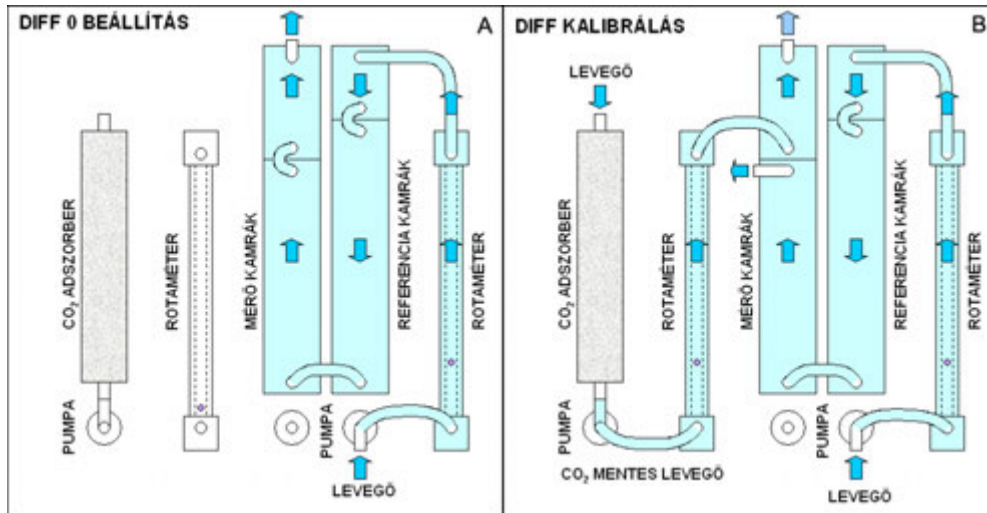
3. Állítsuk át a gázkamrák kapcsolását a 3.3.B ábra szerint. Így a szén-dioxid mentesített levegő áthalad a referencia gázkör teljes hosszán, majd továbbhalad, és átáramlik hosszabbik mérő kamrán (amely a teljes szakasz 95%-át teszi ki). Vezessünk át ismert összetételű (300-500 ppm CO₂ tartalmú) gázkeveréket a rövidebb mérőkamrán (vagyis a teljes hossz 5%-án). A két gázkörön a gázáram sebességét azonosra kell beállítani a rotaméter segítségével. Végül állítsuk be a megfelelő értéket a „SPAN ABS” gomb segítségével.

4. Cseréljük ki az ismert összetételű gázt tartalmazó palackot a mérni kívánt gázt tartalmazó tartályra. (Tehát a mérendő gáz is csupán a mérőkamra 5%-án halad át.) Majd olvassuk le a mért értéket. A „Power on” gomb mellett található „A-B kapcsoló” segítségével méréstartományt válthatunk. „A” esetben 0-500 ppm, míg „B” esetben 0-1000 ppm között olvashatjuk le a kijelző alsó skáláján látható értéket.

3.1.3. Levelek CO₂ leadásának, illetve elnyelésének mérése

1. Állítsuk át a mérésmód választó kapcsolót „DIFF” állásba.

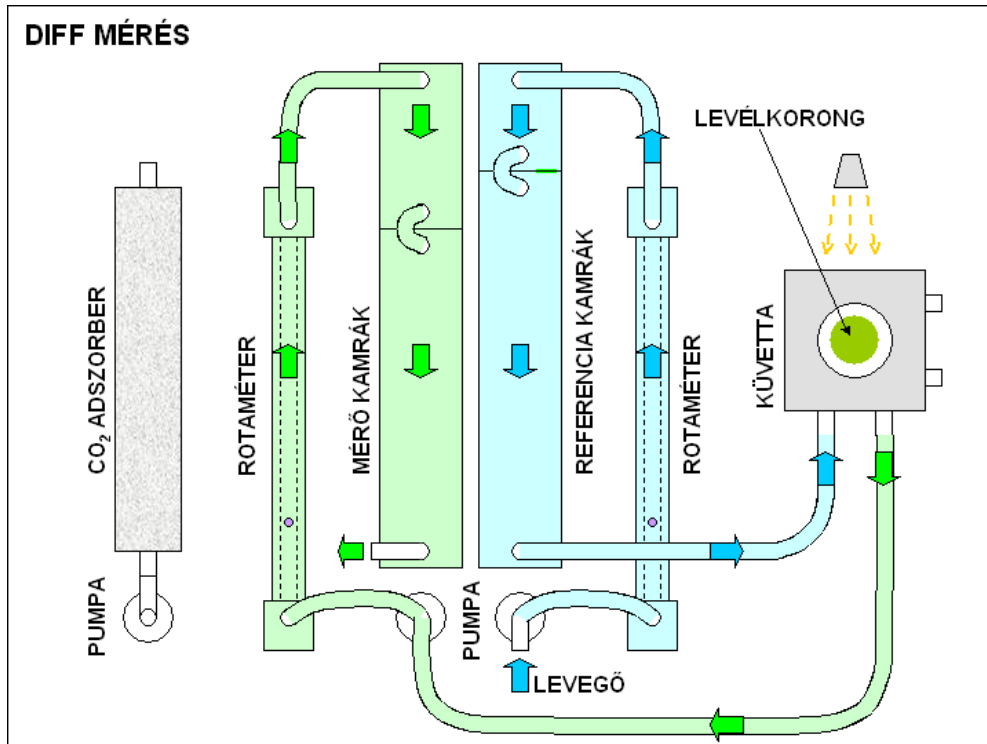
2. Állítsuk be a 3.3.A ábrán látható összeköttetést úgy, hogy a készüléken (illetve a növény környezetén) átáramoltatni kívánt, ismert szén-dioxid koncentrációjú levegő (ill. gázkeverék) áthaladjon mind a referencia gázkörön, mind pedig a mérő gázkörön, a kamrák teljes hosszában. A készüléken most tehát nem CO₂-mentes gáz halad át, de a referencia és mérő gázkör között nem lehet különbség, hiszen azonos összetételű gáz, azonos méretű kamrákon megy át. Az így leolvasható érték a kijelző felső skáláján nulla kell legyen. (Ha kis eltérés mutatkozik, beállíthatjuk a „0” értéket a „zero control” gombbal.)



3.4. ábra ADC 225 MK3 infravörös gázanalizátor mérőkamráinak kapcsolási rajza gázelegyek CO₂ koncentrációjában történő változások méréséhez: kalibrálás. A. A „0” érték beállítása kiindulási gázelegy (levegő) átáramoltatása során. B. A referencia-érték beállítása kiindulási gázelegy (levegő) átáramoltatása során.

3. Állítsuk át a gázkamrák kapcsolását a 3.4.B ábra szerint. Így a mérő gázkör rövidebb, 5%-os szakaszán széndioxid mentesített levegő halad át, míg a referencia gázkör teljes hosszán, majd továbbhaladva a mérő kamra hosszabb, 95%-os szakaszán távozik a készülékből. Az előző lépésben alkalmazott gázkeverék széndioxid koncentrációjának ismeretében kalibrálhatjuk a készüléket a differenciális üzemmódra. Miután a mérő gázkör 5%-ával csökken a mérőkamra hossza, ez ilyen arányban csökkenti a mért értéket. Abban az esetben ha mondjuk az alkalmazott gáz 400 ppm CO₂-ot tartalmaz ez azt jelenti, hogy a különbség 20ppm-nek felel meg. Ezért állítsuk be ezt az értéket a „SPAN DIFF” gomb segítségével. Ezzel a készülék mind pozitív (képződés), mind negatív (elnyelés) irányba mérni képes a CO₂ koncentráció változását a kiindulási gázkeverékhez képest. A „Power on” gomb mellett található „A-B kapcsoló” segítségével méréstartományt válthatunk. „A” esetben –25 és +25 ppm, míg „B” esetben –50 +50 ppm között olvashatjuk le a kijelző felső skáláján látható értéket.)

4. Végül állítsuk be a 3.5. ábra szerint úgy a gázkamrák kapcsolását, hogy a referencia és a mérő gázkör között a levegő (gázkeverék) egy zárt mérőküvetán is áthaladjon. Ebbe a mérőküvetába helyezhetjük el a vizsgált levélből kivágott darabot. Így a két gázkör teljes hosszán áthalad a levegő, először a referencia körön, majd a levélmintát tartalmazó küvetán, végül a mérő körön. A gázáram hosszúságára való tekintettel különösen figyelni kell arra, hogy a pumpák és a rotaméter segítségével mindkét gázkörön azonosra állítsuk a gáz áramlási sebességét.



3.5. ábra ADC 225 MK3 infravörös gázanalízátor mérőkamráinak kapcsolási rajza a levegő CO₂ koncentrációjában levélkorong gázcsereje hatására bekövetkező változások méréséhez.

A levélszövet szén-dioxid leadásának vagy felvételének méréséhez attól függően, hogy milyen levélről van szó, mennyi ideig akarunk mérni, illetve akarunk-e kezelést alkalmazni, eltérő módon veszünk mintát. A levélszövet gázcserejének az adott fiziológiai állapotban történő gyors méréséhez vágjunk dugófúróval egy 2 cm átmérőjű korongot vagy fűféléből egy vagy több 2 cm hosszúságú darabot. Tegyük a mintát a mérőküvetta-ba és zárjuk le légmentesen. Indítsuk el a pumpát, majd ellenőrizzük és állítsuk azonosra a két gázkörön a gázáram sebességét. Világítsuk meg a szövetdarabot a kívánt intenzitású fényel és olvassuk le a maximális értéket a kijelzőről. A megvilágító fény lehetőség szerint fotoszintetikusán aktív sugárzás (PAR) legyen és intenzitása az adott növényre nézve érje el a telítési fényintenzitást, vagyis azt az értéket, amely a maximális fotoszintetikus aktivitást biztosítja. Ilyen beállítások mellett azonban csak pár percig mérhetünk, mert a szövetdarab kiszárad. A mérendő növénymintát közvetlenül a nevelőkamrából vegyük, nehogy a laborban történő tárolás során bekövetkező fény, páratartalom stb. változás hatására megváltozzon a sztómák nyitottsága. Ügyeljünk a sztómaműködés napi ritmusára is: a mérést célszerű a délelőtti órákban elvégezni. A mérés után a szövetminta felületét meg kell határoznunk.

A mérőküvetta egyéb vizsgálati lehetőségeket is biztosít. Ha a mérendő levél elég nagy, akkor vágathatunk a küvetta teljes körfelületének megfelelő méretű korongot. Ez rögzíthető úgy a küvetta-ban, hogy az alsó és a felső epidermisz feletti légtér szeparált maradjon. Így a levegő (gáz) áramot be lehet úgy kötni a küvetta-ba, hogy a levélnek csak az alsó vagy csak a felső oldalán történő gázcsere-t mérjük. A levélkorong vágott kerülete ilyenkor egy folyadékkal telíthető, zárt csatornába illeszkedik, amelyen keresztül tápoldatot lehet keringtetni, ezzel biztosítva a levél vízellátását vagy esetleg különböző hatóanyagokkal történő kezelését. Ilyen esetben a mérés időtartama sokkal hosszabb is lehet.

A levélszövet szén-dioxid leadását vagy elnyelését a ppm-ben leolvasott érték, a gázáram sebessége és a szövet felületének figyelembe vételével felületegységre vonatkoztatva számíthatjuk ki.

3.2. Feladatok

Kalibráljuk a készüléket! Mérjük meg a külső levegő CO₂ koncentrációját! Ennek ismeretében határozzuk meg az uborka levélének CO₂-fixációját $\mu\text{l cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ egységekben. Átlagoljuk az adatokat és számítsuk ki a szórást! A méréshez kontroll, vashiányos és kadmiummal kezelt növényeket használjunk. Magyarázzuk meg a különbségeket a vashiány és a Cd anyagcsere-re gyakorolt hatása alapján!

4. fejezet - Radioaktív izotópok alkalmazása a növényélettani kutatásokban

szerző: Dr. Szigeti Zoltán

4.1 Egyes alapfogalmak dióhéjban

Mielőtt a címben jelzett téma tárgyalására rátérnénk, először kémiai tudásuk felfrissítéseként, emlékeztetőként a radioaktivitással összefüggő néhány alapismeretet kell röviden tisztáznunk, melyek az izotópokkal végzendő munkához, annak megértéséhez szükségesek.

Az első az, hogy mik azok az izotópok? *Az izotópok az elemek olyan atomjai, melyekben a protonszám azonos, a neutronszám különböző, azaz az izotópok azonos rendszámú, de eltérő tömegszámú atomok.* A radioaktivitás adott rendszámú és tömegszámú atommagok azon tulajdonsága, hogy spontán sugárzás kibocsátása közben a tömegszámuk, a rendszámuk vagy a magenergiájuk változik. A radioaktív sugárzásnak 3 fajtáját különböztetjük meg: az α -, β - és γ -sugárzást. A radioaktivitás mértékét az aktivitás fogalmával jellemezzük. *Az aktivitás az időegységre eső magbomlások száma (a bomlás sebessége). Mértékegysége a Bq (becquerel) $1 \text{ Bq} = 1 \text{ bomlás s}^{-1}$.* Megkülönböztetjük a specifikus aktivitás fogalmát is, ami nem más, mint tömegre, molra, térfogatra vonatkoztatott aktivitás (Bq g^{-1} , Bq mol^{-1} , Bq cm^{-3}). *A radioaktív elem bomlási valószínűségét a felezési idővel ($t_{1/2}$) jellemezzük. Ez az az idő, amely alatt az aktív atommagok száma a kezdeti érték felére csökken.*

4.2 Radioaktív izotópok, mint a biológiai nyomjelzés eszközei

A radioaktív izotópokkal történő nyomjelzés kémiai, majd orvosi, biológiai, biokémiai alkalmazásainak kidolgozásában, s ezáltal egy új tudományág, a nukleáris medicina létrehozásában úttörő szerepe volt Hevesy Györgynek (1885-1966), aki ezirányú kutatásaiért 1943-ban kémiai Nobel-díjat kapott. Hevesy 1923-ban az élő szervezet számára nem specifikus Pb, Th és Po izotópokat juttatott be kísérleti állatokba. 1935-ben már az élő szervezetekben is előforduló P egyik izotópjával jelölt bizonyos folyamatokat.

A nyomjelzés célja megegyezik a kémiai indikátorokéval, azaz a nyomjelző radioaktív anyagok egy állapotot, vagy egy folyamatot jelölnek, úgy, hogy a vizsgálni kívánt jelenséget, folyamatot lényegében nem befolyásolják, de arról bizonyos információt nyújtanak. Az izotópos nyomjelzés egyik nagy előnye az érzékenység, a másik az, hogy az izotóp, mint jelző anyag akár a vizsgálandó reakcióban részt vevő partner is lehet. Az izotóp legtöbbször csak radioaktív sugárzó mivoltában különbözik a stabil elemtől, más lényeges tulajdonságában nem.

A radioaktív elemeknek – nyomjelző tulajdonságaikat figyelembe véve – három fő felhasználási területe van:

1. Lokalizáció vizsgálata, mivel a sugárzás a radioaktív elem atommagjainak bomlásakor egy jól meghatározható helyről emittálódik.
2. Mennyiségmérés, mivel a sugárzás mértéke a radioaktív elem mennyiségévei arányos.
3. Időmeghatározás, mivel a radioaktivitás az idővel arányosan változik.

A lokalizáció céljából történő izotóppalkalmazás jelentheti valamely izotóppal jelölt anyag, vagy prekursor akkumulációjának vizsgálatát valamely szervben, vagy pl. az áramlási sebesség mérését egy zárt rendszerben (pl. vérkeringés). Növényi vonatkozásban ilyen típusú alkalmazás az ionok gyökéren, hajtáson belüli, vagy akár szövetek, sejtek közötti eloszlásának, lokalizációjának vizsgálata.

A mennyiségmérésre az izotóphígításos analízis néhány esete nyújt szemléletes példát. A hígítási elv lényege, hogy a zárt rendszerben levő izotóp összaktivitása nem változik azzal, hogy az inaktív közeg, a hordozók mennyisége megváltozik, specifikus aktivitása viszont igen. A specifikus aktivitás változása lesz az aktív/inaktív anyagmennyiségek arányának mértéke. Ennek az elvnek az alapján lehet például zárt rendszerekben térfogatot meghatározni, fázisok közötti ioncserét vizsgálni. Nyitott rendszerekben – és ilyenek a biológiai rendszerek is – az ún. dinamikus izotóphígítás módszerével határozható meg az akkumuláció, a kiürülés, a turnover, valamely tér, kompartment térfogata, vagy egy folyadék átfolyási sebessége.

Időmeghatározásra azt a példát említhetjük, amikor egy vegyületet *in vivo* jelzetté teszünk és a növény valamely szervében bekövetkező fokozatos aktivitáscsökkenésből következtetünk az adott anyag átlagos biológiai élettartamára az adott szervben. Az aktivitás csökkenése a vegyületnek az adott szervezetben, szervben történő metabolizmusa, kiürülése következtében fellépő biológiai felezésén, valamint a radioaktív izotóp fizikai bomlásán alapul. E két folyamatot együttesen jellemzi a tényleges felezési idő az alábbi összefüggés szerint:

$$T_{\text{eff}} = \frac{T_f \times T_b}{T_f + T_b}$$

ahol T_f a fizikai, T_b a biológiai, T_{eff} a tényleges felezési idő.

Az időmeghatározás egyik speciális esete a kormeghatározás. A természetben előforduló radioaktív izotópok lehetőséget adnak arra, hogy valamilyen régen elhalt élőlény halálának időpontját megállapíthassuk. Az adott lény anyagcsereje ugyanis a halál időpontjában leáll, több radioaktív anyag nem jut már szervezetébe a környezetből, a benne lévő bomlása azonban időben állandóan tovább zajlik. Tehát az aktivitás csökkenéséből az anyagcsere leállításának időpontja kiszámítható. Legtöbbször ezt a ^{14}C tartalom alapján mérik, mely módszert radiokarbonos kormeghatározásnak nevezik. A $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ arány a természetben és így az élőlényekben is életük során többé-kevésbé állandó, 12 : 1. Az élőlények elhalása után ez az arány eltolódik, mert a ^{14}C bomlik. A módszer kb. 10-12 ezer éves korig terjedően alkalmazható, bár nem túlságosan pontos, mert a légtér ^{14}C koncentrációja a valóságban nem állandó és a levegő ^{14}C tartalmának pontos meghatározása sem egyszerű.

Biológia kísérletekben nem ritka, hogy szükség van sugárzó radioaktív anyagokra. Itt most nem a diagnosztikai vagy terápiás célú alkalmazásokra gondolunk, hanem kifejezetten a nyomjelzésre, azaz arra, hogy megtudjuk, valamely anyagból mennyi és hol van. Növényélettani, növénybiokémiai kutatások során is gyakran alkalmazzák ezt a módszert, elsősorban akkor, ha nem áll rendelkezésre más, kellőképpen érzékeny analitikai technika valamely funkció, vagy lokalizáció vizsgálatára. Elég csak arra a tankönyvi esetre utalni, ami a fotoszintetikus CO_2 fixáció és redukció útjának feltárását írja le M. Calvin és munkatársainak munkássága alapján. Ennek lényege, hogy radioaktívan jelölt $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -t alkalmazva vizsgálták egyszelű zöldalgákban a fotoszintetikusan megkötött, radioaktívan jelölt C útját, s egy nagyon ötletes kísérletben megállapították, hogy a CO_2 fixáció első stabil terméke a glicerinsav-3-foszfát, melynek karboxilcsoportjában volt a radioaktív jelölés. Ennek segítségével tárták fel a később Calvin-ciklusnak elnevezett folyamat részleteit is.

4.3 Az izotópválasztás szempontjai

Radioaktív izotópokat csak akkor kell alkalmazni, ha az adott feladat más, inaktív módszerrel nem oldható meg. A radioaktív anyagok alkalmazásának erőltetése ugyanúgy indokolatlan, mint az izotóptól való félelem. A megfelelő izotóp kiválasztása azonban alapos megfontolást igényel. Figyelembe kell venni ugyanis az izotóp felezési idejét, a bomlás során keletkező termék atom milyenségét, valamint az izotóp detektálhatóságát és az esetleges sugárhatást.

A biológiai kísérletekben általában használt izotópok esetében a felezési idő rövideje ritkán okoz problémát, mert hiszen például a ^{14}C felezési ideje 5568 év, a ^3H -é 12,26 év, a ^{32}P -é 14,3 nap, a ^{131}I -é 8,04 nap, a ^{24}Na -é 15 óra. Ha a felezési idő nagyon rövid, akkor hosszabb idejű kísérlet nem végezhető, vagy a kiinduló aktivitást kell megnövelni. Egyes izotópok esetében azonban problémát okozhat, hogy bomlásuk eredményeként az azokat tartalmazó molekulák az élő szervezetben funkcióképtelenné, sőt mérgező hatásúvá alakulhatnak és felhalmozódhatnak. Ilyen például a béta-bomlással járó $^{32}\text{P} \rightarrow ^{32}\text{S}$ átalakulás, melynek következményeként pl. a nukleinsavak szerkezetében keletkezhet zavar, mivel a magátalakulás következtében kémiai kötések szakadhatnak fel. Ha a detektálhatóság szempontját vesszük figyelembe, akkor a ^3H - béta-sugárzásának kis energiája miatt - csak folyadékszcintillációs rendszerben detektálható. Mivel a biológiai minták túlnyomó többsége vizes közegű,

bennük a nagyobb béta-energiával rendelkező ^{14}C és ^{35}S mérése a víz erős kioltó hatása miatt még folyadékszcintillációs rendszerrel sem egyszerű.

Az aktivitás ésszerű megválasztásához a kísérlet időtartamával összefüggésben három szempontot kell figyelembe venni: az egyik az, hogy a mintában az aktivitás csökkenését nemcsak a bomlás, hanem az esetleges metabolizálódás is elősegítheti. Másik fontos szempont, hogy az izotópok sugárzása ne okozzon sugárkárosodást. Növények esetében például egy gyors anyagfelvételi vizsgálathoz ^{32}P -ből 74 kBq/l aktivitású tápoldat elegendő. Árpával végzett kísérletekből kitűnt, hogy 370 kBq/l aktivitás esetén már csökkent a gyökérsúly, 3,7 MBq/l aktivitás alkalmazásakor pedig kromoszómaaberrációk voltak megfigyelhetők, részben magátalakulások, részben pedig a DNS által elnyelt sugárzás hatása következtében. Harmadik, ugyancsak praktikus szempont az izotóp vegyületek ára, ami különösen speciálisan jelölt szerves molekulák esetében rendkívül magas is lehet.

4.4 A radioaktív sugárzás mérése

Hogyan tudjuk detektálni a radioaktív sugárzásokat? A radioaktivitás detektálásának alapja a sugárzásoknak az anyaggal való kölcsönhatása. Biológiai minták esetében leggyakrabban β -sugárzó izotópokat használunk melyek kimutatásához a szcintillációs mérés technikát, vagy ha a sugárzó anyagnak a mintában való eloszlását akarjuk detektálni, akkor az autoradiográfia különböző típusait alkalmazzuk. A radioaktív minták mérésekor bármilyen készülékkel is dolgozunk, nem tudjuk az aktív magok bomlásának számát, tehát az aktivitást 100%-os hatásfokkal meghatározni. Amit bármilyen mérőkészülékkel, számlálóval is mérünk, azt beütésszámnak nevezzük. A beütésszám tehát nem más, mint az időegység alatt számlált részecskék száma. Jelölése cps = beütésszám egy másodperc alatt, illetve cpm = beütésszám egy perc alatt).

Az aktivitás szcintillációs meghatározásának az alapja az, hogy a radioaktív sugárzás kinetikus energiája bizonyos anyagokban, azokkal kölcsönhatásba lépve, molekulákat gerjesztve bizonyos hatásfokkal fényenergiává alakul át, a gerjesztett állapot megszűnésekor a felszabaduló energia fényfelvillanásban realizálódik. Az ezzel a tulajdonsággal rendelkező anyagokat szcintillátoroknak, az ilyenkor bekövetkező fénykibocsátást, felvillanásokat pedig szcintillációnak nevezzük. Ezek a fényfelvillanások – melyek száma arányos a mérendő minta radioaktivitásával – egy célszerűen kialakított mérőrendszerrel megszámlálhatók, a minta aktivitása tehát mérhető. A szcintillátor anyaga lehet szilárd vagy folyékony. Biológia minták mérésére általában legalkalmasabb a folyadékszcintillációs mérés technika.

4.5 A folyadékszcintillációs mérés technikáról röviden

A radioaktív anyag által kibocsátott részecskék, energiájuktól függően egy szerves oldószer molekuláit gerjesztik, mely gerjesztett molekulák energiájukat vagy egy foton formájában adják le, vagy átadják azt egy másik, az oldatban jelenlévő molekulának, így az válik gerjesztetté. A molekula ebben a második lépésben is foton formájában adja le a gerjesztési energiáját. Az emittált fotonok száma függ az emittált radioaktív részecskék által gerjesztett molekulák számától. A fotonok egy fotoelektronsokszorozóban gyűlnek össze, amely azokat elektromos impulzusokká alakítja. A különböző típusú ionizáló sugarak különböző hatékonysággal képesek fotonemissziót kiváltani. A relatív fotonhozam negatív β -sugárzó részecske esetében 1,00, a proton esetében 0,20-0,50, míg α -részecske esetében 0,08-0,12. Mindez megszabja, hogy mely sugárzástípus lehet folyadékszcintillációs technikával a legjobb hatásfokkal detektálni.

A folyadékszcintillációs folyamatban az energiaátadás először az aromás oldószerről a primer szcintillátor anyagra történik, amely olyan hullámhosszon emittál fotonokat, amit a detektor érzékelni tud. Ha ennek lehetősége nem áll fenn, akkor olyan további anyagoknak alkalmazására van szükség, melyek a primer szcintillátor által kibocsátott fény spektrumát a detektor érzékenységéhez illesztik. Ezt szekunder oldott anyagokkal lehet elérni. Ezek az anyagok az emittált fény spektrumának a fotoelektronsokszorozó érzékenységével nagyobb átfedését biztosítják, jobb hatásfokú detektálást tesznek lehetővé. Ezeket a szekunder oldott anyagokat a primer szcintillátorhoz képest általában 1/20 koncentrációban alkalmazzák.

A mérés hatásfokát növelni lehet a mérőedénynek a detektorokhoz viszonyított helyzetének változtatásával is. A szcintillációs oldatból minden irányba történik fotonemisszió, a méréshez ezeket össze kell gyűjteni, s a detektorra kell irányítani a nagyobb hatásfok eléréséhez.

Tekintettel kell lenni arra, hogy a mérőrendszerben ne legyen olyan hatás, ami a szcintillációt elnyeli, és így a radioaktivitás meghatározásának hatásfokát csökkenti. Az ilyen ún. kioltást eredményező hatások alapvetően két csoportba sorolhatók: 1. a színkioltás, amelynek során bizonyos pigmentek elnyelik az emittált fotonokat, 2. a kémiai kioltás, amikor az oldatban jelenlévő esetleges szennyező anyagok okoznak csökkenést a mérendő fotonok számában, azáltal, hogy eltérítik a fotonokat a kívánt iránytól.

Ha egy töltött részecske gyorsabban halad valamely közegben, mint amekkora sebességgel a fény halad át az adott közegben, akkor a spektrum kék tartományában emittált ún. Cserenkov sugárzás keletkezik. Ez a sugárzás is alkalmas lehet bizonyos esetekben a radioaktivitás meghatározására. A modern folyadékszintillációs mérőberendezések alkalmasak a Cserenkov sugárzás detektálására. A mérés hatásfoka azonban lényegesen kisebb, mint normál szcintillációs mérés esetén, hiszen csak a küszöb energiát meghaladó részecskék képesek a fényimpulzusok kiváltására, ezért jó hatásfokkal csak az 1 MeV energiánál nagyobb maximális béta-energiájú nuklidok mérésére alkalmazható. Előnye viszont, hogy nem kell esetenként drága szcintillációs kottélt alkalmazni.

4.6 Az izotópokkal végzendő munka biztonsági előírásai

Radioaktív izotópokat csak akkor célszerű használni, ha az adott feladat más, inaktív módszerrel nem oldható meg. A nyitott radioaktív készítményekkel kapcsolatos valamennyi munkafolyamatot csak olyan munkahelyen szabad végezni, ahol, egyrészt biztosítva van a sugárzások elleni védelem, másrészt a munkahelyek speciális kialakítása és felszereltsége megakadályozza a radionuklidok inkorporációját.

Az izotóplaboratóriumokat három csoportba lehet sorolni, attól függően, hogy milyen izotópokkal, milyen aktivitásokkal dolgoznak bennük. Mindez meghatározza a labor kialakítását, felszereltségét, az alkalmazandó védőfelszereléseket, stb. A nyitott radioaktív készítményekből eredő sugárveszély a radionuklidok fajtáján és mennyiségén kívül függ annak fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az elvégzendő műveletek jellegétől. Az A típusú laborban a veszélyesnek besorolt izotópok nagy aktivitását is lehet alkalmazni ennek megfelelő, szigorú biztonsági előírásokkal. A B típusú laborban közepes szintű lehet a veszély, itt közepesen veszélyes izotópok meghatározott mennyiségével lehet dolgozni. Növényélettani, növénybiokémiai vizsgálatokra, a leggyakrabban alkalmazott ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{86}Rb izotópokkal történő munkához a legegyszerűbb, a C típusú izotóplaboratórium is megfelelő. A C típusú izotóplabor egy jól felszerelt kémiai labor, amelyben a felhasználható izotópok kis veszélyességűek és az aktivitás alacsony. A laborban a felületeknek hézagmentesnek és dekontaminálhatónak kell lenni. A laborban jól működő elszívással rendelkező vegyi fülke, ezen kívül lábbal nyitható, műanyag zsákkal bélelt fém hulladéktároló szükséges. A csaptelepek csak könyökkel nyithatók lehetnek. A kézmosónál tükör megléte szükséges, a kéz szárításához csak papírtörülközőt, vagy elektromos kézzárítót lehet használni. Az izotópok tárolásához zárható és árnyékoló tároló (trezor) kialakítása szükséges, ami lehet szabadon álló, vagy falba épített. A munkához egyéni védőfelszerelés szükséges. A C típusú laboratóriumban ez legalább köpeny, valamint védőkesztyű viselését jelenti. További előírásokat a vonatkozó rendeletek és szabványok tartalmaznak, melyek meghatározzák, hogy milyen szennyezettségmértékű eszköznek kell rendelkezésre állni, valamint azt, hogy az esetleges radioaktív szennyeződések eliminálásához milyen dekontaminációs alapkészlettel kell a labornak rendelkezni. Az izotóplaborban dolgozóknak rendszeres orvosi ellenőrzésen, és sugárvédelmi továbbképzésben kell részt venni.

Bármely típusú laborban rendelkezésre kell, hogy álljanak a sugárvédelem olyan eszközei, mint béta-sugárzó izotóp használata esetén a plexilemez, vagy gamma sugárzás esetén a megfelelő vastagságú ólomvért. Valamennyi izotóplaboratórium bejáratánál el kell helyezni a sugárveszély nemzetközi tárcsajelét (4.1. ábra).



4.1. ábra. A sugárveszély nemzetközi tárcsajele a szabvány szerinti alakban.

Radioaktív izotópok engedély nélkül is használhatók valamely munkahelyen, ha azok összaktivitása kisebb a vonatkozó szabványban megadott értékeknél. Az izotópos munka során keletkezett radioaktív hulladékokat különös gonddal kell kezelni, melynek szabályait is előírások rögzítik. Folyékony hulladékról akkor beszélünk, ha benne a különböző felezési idejű izotópok átlagos koncentrációja eléri, vagy meghaladja a radioaktív izotópoknak ivóvízre megengedett koncentrációjának tízszeresét. Ezen érték alatti vizes oldatok közvetlenül a csatornahálózatba bocsáthatók. Fajlagos aktivitásuk alapján a folyékony radioaktív hulladékok nagy, közepes és kis aktivitású csoportba sorolhatók, melyeket - ahol erre lehetőség van - külön kell kezelni.

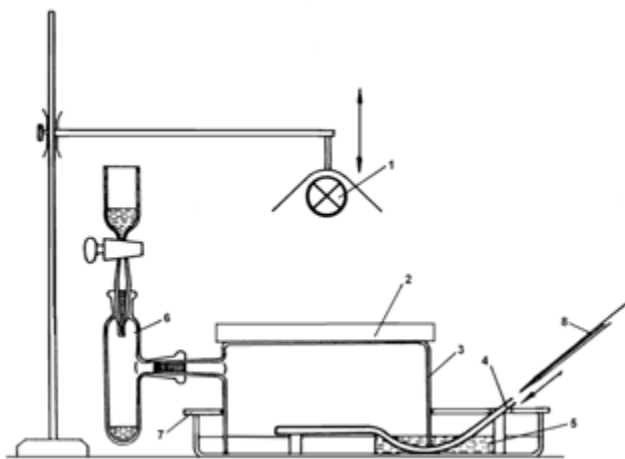
A szilárd hulladék közönséges szemétként kezelhető, ha a radioaktív anyagok koncentrációja (kBq/g) nem haladja meg az ivóvízben megengedett koncentráció (kBq/ml) ezerszeresét. Ennél nagyobb aktivitású anyagokat hulladékként kell kezelni és megfelelő zárható edényben kell tárolni az izotóptemetőbe való elszállításig. Az éghető, illetve nem éghető hulladékokat is külön kell gyűjteni és tárolni.

A következőkben néhány növényélettani alkalmazást írunk le.

4.7 Zöld növények in vivo fotoszintetikus széndioxid fixációjának meghatározása

Ismert, hogy a fotoszintézis azon folyamatok összessége, melyek során a zöld növényi szervezetek a fényenergiát a légköri széndioxid megkötésére, majd szerves anyagok szintézisére fordítják. Növényélettani tanulmányaik során megismerték azt, hogy a fotoszintézisnek van egy a fénytől közvetlenül függő ún. fényszakasza és egy ún. sötét szakasza, melyet az utóbbi időben inkább szénszakasznak neveznek. A fotoszintézis mindkét szakaszának kooperatív működése a CO₂ megkötésében realizálódik. A fényszakaszban teremtődnek meg a CO₂ megkötésének és redukciójának energetikai feltételei. A CO₂ fixációt a növény származási helyéből adódó adaptáltsági állapotán, genetikai meghatározottságán, a növény fejlettségi állapotán túl az aktuális környezeti tényezők is befolyásolják, mint pl. a fényintenzitás, a hőmérséklet, a vízellátottság, biotikus stresszorok, xenobiotikumok, tápanyaghiány, stb.

A gyakorlat során különböző növényfajok és különböző módon kezelt növények fotoszintetikus CO₂ fixációját vizsgáljuk. A kísérletet a 4.2. ábrán látható készülék alkalmazásával végezzük.



4.2. ábra Az in vivo CO₂ fixáció meghatározására szolgáló készülék vázlatja. 1. megvilágítás, 2. hőszűrő, 3. a ¹⁴CO₂-t tartalmazó zárt gáztér, 4. a mintabevezető sín, 5. higanyzár, 6. a ¹⁴CO₂ felszabadítására szolgáló rész, 7. plexi fedő, 8. mintatartó.

A készülék két fő részből áll, az egyikben történik a ¹⁴CO₂ felszabadítása Ba¹⁴CO₃-ból 70%-os perklórsavval, a másik rész az 500 ml-es üveg kamra, ami felülről megvilágítható, s amelyben a ¹⁴CO₂ található. A zárt gáztérben a CO₂ koncentrációja 1%, a radioaktív ¹⁴CO₂-é 0,1%, a gáztér radioaktivitása 74 kBq cm⁻³. A fényintenzitás-függés vizsgálatakor a megvilágító lámpát az előírt megvilágítás intenzitás elérésének megfelelően közelítjük a kamrához, illetve távolítjuk attól. A levágott leveleket két átlátszó fólia közé helyezve egy plexi vezető sín segítségével, higanyzáron keresztül juttatjuk a zárt gáztérbe. A mintákat meghatározott ideig (30-120 s) megvilágítva történik

a CO₂ megkötése. Az előírt idő elteltével a megvilágítást lekapcsolva a két film közé helyezett leveleket a gáztér zártágának megtartása mellett a higanyzár alatt kihúzzuk a kamrából. A fixálási időt, a növényfajtól és a kísérlet céljától függően állapítjuk meg. A kivett levelekből vagy 5 mm átmérőjű korongokat, vagy keskenyebb csíranövények, pl. búza esetében 1 cm hosszúságú darabokat vágunk. Legalább 12-18 parallel mintára van szükség a valamennyire is megbízható eredményhez. A kivágott levéldarabokat szűrőpapírok közt enyhe nyomás alatt hővel denaturáljuk (kivasaljuk). Az így denaturált, megszáritott levéldarabokat 1 ml szcintillátor oldatot tartalmazó fiolákba helyezük. A szcintillátor oldat 500 ml toluolban oldott 2,5 g 2,5 difenil-oxazol (PPO) és 25 mg 1,4-di(2-(5-fenil)-oxazolil)-benzolt (POPOP) tartalmaz. A minták radioaktivitását folyadékszcintillációs mérés technikával határozzuk meg. Célszerű, megvilágítás nélküli, ún. sötét fixációt is végezni, melynek eredményét korrekcióba kell venni. Ilyenkor a fixáló készüléket elsötétítjük, s így juttatjuk be a leveleket, s tartjuk benn a megvilágított leveleknél alkalmazott fixáció idejéig. A háttér sugárzás méréséhez a folyadékszcintillációs spektrométerhez tartozó háttér standardet használjuk. A háttér értékét a minták mért radioaktivitásából le kell vonni.

A folyadékszcintillációs mérőkészülék hatásfokát egy ismert aktivitású ¹⁴C standarddal kell meghatározni. A hatásfok nem más, mint a ¹⁴C standarddel cpm-ben mért érték osztva a standard küvetáján feltüntetett tényleges aktivitással. A hatásfok ismerete szükséges a biológiai minták tényleges aktivitásának megadásához. Ennek értéke általában 90% felett van.

4.7.1 Feladatok

1. Vizsgálják meg egy C3-as (pl. búza, spenót) és egy C4-es (pl. kukorica) növény CO₂ fixációjának fényintenzitás-függését! A megvilágító fény intenzitását 0-600 μmol cm⁻² s⁻¹ között változtassák! Az eredményeket kBq cm⁻² levélfelületben adják meg!
2. Gyomirtószerek hatása a fotoszintetikus CO₂ fixációra. A levágott leveleket a gyakorlatvezető által megadott herbicid adott koncentrációjú oldatába helyezve kezeljük 90 percen át szobahőmérsékleten, fényen! Az eredményeket kBq cm⁻² levélfelületben adják meg! Határozzák meg a minták klorofilltartalmát és arra is vonatkoztassák a CO₂ fixáció mértékét!
3. Nehézfém-kezelések hatása a fotoszintetikus CO₂ fixációra. Hidroponikus kultúrában nevelt növényeket nehézfémek ismert koncentrációjával kezeljük meghatározott ideig! Határozzák meg a kezelt növények *in vivo* CO₂ fixációját!
4. Ábrázolják célszerűen megválasztott grafikonon a kapott mérési eredményeket és növényélettani ismereteik alapján értékeljék azokat!

4.8 Ionfelvétel mérése gabonafélék levágott gyökerével

Minden anyagfelvételi vizsgálatot két alapgörbe felvételével kell kezdeni. Meg kell határoznunk a vizsgálandó anyag felvételének idő- és koncentrációfüggését. Az időgörbe lefutásából meg tudjuk állapítani, hogy kísérleti körülmények között kell-e számolnunk a kezdeti gyors felvétellel (látszólagos szabad helybe való bejutás, kicserélődési reakciók), valamint meg tudjuk határozni azt az időtartamot, amely alatt a felvétel sebessége nem változik. Feltételezhetjük, hogy ebben a lineáris szakaszban a felvétel mechanizmusa és az energiaszolgáltató anyagcsere még nem változott meg. A koncentrációfüggést széles koncentrációtartományban vizsgáljuk. Makroelemek esetében az általánosan használt értékek 10⁻⁶ mol dm⁻³-től 3x10⁻² mol dm⁻³-ig terjednek. Az öt nagyságrendnyi különbséget mind elméleti, mind gyakorlati szempontból érdemes vizsgálnunk: így dönthetjük el, hogy a felvételi rendszer mely koncentráción telítődik, hány telítési szakaszt különíthetünk el.

Eszközök: olló, csipeszek, üvegbot, Nuts-tölcsér és palack, nagypórusú szűrőpapír, levegőztető készülék, 1 dm³-es főzőpoharak, táramérleg, rázó gép, 200 cm³-es Erlenmeyer-lombikok, Nal-os γ-szcintillációs számláló, kémcsövek, kémcsőtartók, automata pipetták.

Anyagok: búza, rozs, ⁸⁶Rb izotóp, törzsoldatok a tápoldathoz és a felvételi oldathoz.

Vizsgálatainkat legkönnyebben gabonafélék sötétben, állandó hőmérsékleten csíráztatott növényeinek levágott gyökereivel végezhetjük el. A növények csíráztatásának, nevelésének körülményeit e jegyzet másik fejezetében találják.

A kísérlet megkezdése előtt legalább egy órával a gyökereket levágjuk. Vágás közben gondosan ügyeljünk arra, hogy a gyökerek ki ne száradjanak. Alapos öblítés után a gyökereket egy órán keresztül a kísérlet céljának megfelelő oldatban levegőztetjük. Közvetlenül a kísérlet megkezdése előtt a gyökerek felületéről a vizet szűrővel eltávolítjuk (Nuts-tölcsér + nagy pórusú kvantitatív szűrőpapír). Gyorsan kimérünk 1-1 g gyökeret, és az előkészített felvételi oldatba helyezzük. A felvétel ideje alatt az oldatokat rázatjuk vagy állandóan levegőztetjük. A kísérleti periódus végén a gyökereket ismételen leszűrjük, és a kísérlet céljának megfelelő összetételű és hőmérsékletű oldattal mossuk. A felvétel mértékét legegyszerűbben radioaktív, jelölt anyagokkal állapíthatjuk meg.

4.8.1. Feladatok

1. Időgörbék felvétele

10^{-5} , 10^{-4} és 10^{-3} mol dm⁻³ KCl tartalmú oldatot készítünk, amelyet ⁸⁶Rb-mal jelölünk. Az egyik oldatsorozatban a megfelelő mennyiségű KCl-ot desztillált vízbe, a másik sorozatban 5×10^{-4} mol dm⁻³ CaSO₄-oldatba mérjük be. Az oldatokat (100 cm³) 200 cm³es Erlenmeyer-lombikokba töltjük szét. Minden kísérleti variánshoz 3-3 ismétlést számolunk. Az időgörbe felvételéhez 0 (a gyökeret a vizsgálandó oldattal összerázzuk és azonnal kiszűrjük), 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 perces felvételi periódust használunk. A felvételi periódus után a gyökereket desztillált vízzel vagy az aktív oldattal azonos összetételű inaktív oldattal öblítjük le. Öblítéshez 100 cm³ oldatot használunk. A megmosott gyökereket kémcsövekbe tömjük, 4 cm³ desztillált vizet pipettázunk rá, majd a gyökerek radioaktivitását a ⁸⁶Rb γ -sugárzása alapján mérjük.

2. Koncentrációgörbék felvétele

5×10^{-4} mol dm⁻³ CaSO₄-oldatból 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} 10^{-3} mol dm⁻³ KCl-oldatot készítünk. Valamennyi koncentrációból 600-600 cm³-t mérünk ki. Az oldatokat pontosan megfelezzük: 300 cm³-t ⁸⁶Rb-mal jelölünk, a másik 300 cm³ a gyökerek öblítéséhez kell. A gyökereket az általános részben leírtak szerint kezeljük. A felvételi periódus 1 óra. Minden egyes variánsnál öblítő folyadéknak a megfelelő koncentrációjú inaktív oldatot használjuk. A továbbiakban ugyanúgy járunk el, mint azt az időgörbe felvételénél leírtuk.

A K⁺ -influx kiszámítása

Valamennyi felhasznált oldatnak ismernünk kell a káliumkoncentrációját és a radioaktivitását. A külső oldat radioaktivitását közvetlen méréssel határozzuk meg. Kémcsövekbe 5-5 cm³-t mérünk be, a leírt radioaktivitásból kiszámítjuk 1 dm³ oldat radioaktivitását. Feltételezzük, hogy a gyökér a radioaktív és az inaktív ionokat nem tudja megkülönböztetni, tehát arányba állíthatjuk az ismert radioaktivitást az ismert külső koncentráció-értékkel, valamint a gyökér radioaktivitását és a felvett anyag mennyiségével.

Értékelés: Az időgörbékéből meghatározzuk a látszólagos szabad helybe jutott ionok mennyiségét. Megadjuk az aktív felvétel sebességének értékeit. A koncentrációgörbéből következtethetünk a felvételi rendszerek létezésére. Az enzimkinetikából ismert ábrázolási módok segítségével (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Hofstee) kiszámíthatjuk a K_M értékeket.

4.9 ⁵⁹Fe adszorpciójának és felvételének mérése

Az esszenciális mikroelemek jó része a nehézfémek közé sorolható. Az esszenciális és a mérgező nehézfémek a növényi sejtekkel, szövetekkel érintkezve pillanatszerűen kötődhetnek aspecifikus és a felvétel szempontjából specifikus helyekhez. Különböző szerves vegyületekkel adott, *in vitro* körülmények között mért komplexek stabilitási állandójából nagyjából következtetni lehet kötődésük "sorrendjére" (élő rendszerben is), vagy legalább arra, hogy a nehézfémek közül melyek azok, amelyek ionos és kötött formában fordulhatnak elő. Érdekesebb ebből a szempontból azok az adatok is, amelyek egyes nehézfémeknek a természetben előforduló molekulákkal való kapcsolatukról rendelkezésünkre állnak (pl. aminosavak és szerves savak nehézfémekkel képzett komplexei és a komplexek stabilitásának pH-függése).

Az esszenciális és a mérgező nehézfémek viselkedésének ismerete nemcsak elméleti, hanem gyakorlati szempontból is egyre fontosabbá válik, elsősorban környezetszennyezési problémák miatt. Meg kell említenünk azt a tényt, hogy a tápláléklánc szempontjából lényegtelen, hogy passzívan kötött, vagy az anyageserétől függő folyamat segítségével felvett nehézfémről van szó, mivel mindkettő az élelmiszerekbe jut.

Az adszorbeált és a sejtekbe felvett vas mennyiségének meghatározása

Bienfait és mtsai (1985) kidolgoztak egy módszert, amelynek segítségével a plazmalemmán kívül maradt vas mennyisége meghatározható. A módszer lényege az, hogy az adszorbeálódott Fe(III) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -tal nitrogén-atmoszférában Fe(II)-vé redukálódik, és az oldatban jelen lévő bipiridillel stabil komplexet képez, ami a gyökéren már csak nagyon kis mértékben kötődik. Bizonyították, hogy a kezelés 10 perce alatt a redukció megtörténik, de a plazmalemma szemipermeabilitása megmarad, azaz a gyökérből K-efflux nem mérhető.

Eszközök: olló, csipeszek, üveg bot, Nuts-tölcsér és palack, nagypórusú szűrőpapír, táramérleg, rázógépj, 200 és 50 cm^3 -es Erlenmeyer lombikok, NaI-os γ -szcintillációs számláló, kémcsövek, kémcsőtartók, automata pipetták, vatta.

Anyagok: uborka csíranövények, ^{59}Fe izotóp, törzsoldatok tápoldathoz és felvételi oldathoz, 5×10^{-4} M CaSO_4 , 0,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,2' -bipiridil, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, N_2 -gáz.

Módszer: $\frac{1}{4}$ -es Hoagland tápoldaton nevelt uborka növényeket használunk. A növényeket a kísérlet megkezdése előtt 60 percig 5×10^{-4} mol dm^{-3} koncentrációjú CaSO_4 -oldatban rázatjuk, hogy a gyökerek felületén lévő ionokat lemoszuk. Közben 0.5 mM-os $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -ban oldott 1.5 mM-os bipiridil oldatot készítünk és ebből a gyökér mennyiségének megfelelő térfogatot 50 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikokba szétmérünk (1 g gyökér, 19 cm^3 oldat).

A növényeket a lemosás után az előre elkészített, ^{59}Fe -vel jelölt, a mosófolyadékkal megegyező CaSO_4 -ot tartalmazó oldatokba helyezük, de előzőleg Nuts-tölcsér fölött eltávolítjuk a nevelésükhöz használt felső Nitrocell-karikát. Az ^{59}Fe -t tartalmazó oldatban, amelyet tetszés szerinti Fe-komplex vagy anorganikus vas formájában adtuk az oldathoz, a növényeket 6 percig rázatjuk. Ezt követően 30 percig mossuk a növényeket inaktív, CaSO_4 -ot tartalmazó oldatban.

Mosás előtt az alsó Nitrocell-karikát eltávolítjuk. (Ez a karika radioaktív, tehát az izotóp hulladéktárolóba kerül.) A gyökerek mosása után (ismét Nuts-tölcsér fölött) a nevelő háló alatt a növények gyökerét levágjuk, és közelítőleg kétfelét osztjuk. Az egyik felét megmérjük, és lemérés után kémcsőbe tömjük. A másik felét bipiridiles oldatba helyezük. Ezt megelőzően 5-10 perccel a bipiridilt tartalmazó oldatokat vattával lezárt lombikokban N_2 -vel kezdjük buborékoltatni. A $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -ot ugyancsak N_2 -atmoszférában tartott oldatban közvetlenül a gyökerek kezelése előtt oldjuk fel. Végkoncentrációja 12 mmol dm^{-3} . A ditionitot tartalmazó oldatból a gyökér betételével egyidőben 1 cm^3 -t mérünk, és a lombikot vattával zárjuk. 10 perc elteltével a gyökereket az oldatból csipesszel kivesszük, és Nuts-tölcséren a felesleges oldatot leszívátjuk, majd tömegét lemérjük és kémcsőbe tömjük. A ditionitot tartalmazó oldatból 5 cm^3 -t mérünk kémcsőbe. A gyökerekre 4 cm^3 vizet rétegezzük, és valamennyi mintának az aktivitását mérjük az ^{59}Fe γ -sugárzása alapján.

Az adszorbeált és a felvett vas kiszámításához szükség van a radioaktív oldat aktivitásának és koncentrációjának ismeretére. A bemért vas koncentrációját ismerjük (10^{-5} mol dm^{-3}), a beütésszámát pedig az oldatok szétöntése után, de a gyökerek behelyezése előtt kivett 5-5 cm^3 -es minták aktivitásának méréséből határozzuk meg. Fel kell tételeznünk, hogy a növény az inaktív és az aktív vas atomokat nem különbözteti meg, és így egyenes arányosság van az oldat, a gyökér aktivitása és az oldat koncentrációja, valamint a gyökérben található vas mennyisége és koncentrációja között.

4.9.1 Feladatok

1. Hasonlítsuk össze a különböző N-formákon (NO_3^- , karbamid, NH_4^+) nevelt növények ^{59}Fe EDTA-adszorpcióját és felvételét!
2. Hasonlítsuk össze a levágott gyökerek és az intakt növények viselkedését!
3. Figyeljük meg a ^{59}Fe EDTA, a ^{59}Fe -citrát és a $^{59}\text{FeCl}_3$ adszorpciója és felvétele közötti különbséget!

4. Mérjük meg a vastartalmú tápoldaton és a vashiányos tápoldaton nőtt növények vas-adszorpciója és felvétele közötti különbséget! Hasonlítsuk össze azokkal a vashiányos tápoldaton nőtt növényekkel, amelyeket a radioaktív jelölés előtt 1 óráig inaktív vasat tartalmazó oldatban kezeltünk!

Értékelés: Számítsuk ki a felületen adszorbeált és a ténylegesen felvett vas mennyiségét! Adjuk meg a hozam (nmol vas/növényi rész) és a koncentráció-értékeket (nmol vas g⁻¹ friss tömeg)! A kapott értékek alapján magyarázzuk meg az egyes kezelések közötti különbségeket!

4.10 Felhasznált irodalom

Gyurján I, H. Nagy A, Szigeti Z. (1988) Radioaktív izotópok és biológiai alkalmazásuk (Szerk.: Szigeti Z.) p. 219, Tankönyvkiadó Budapest (kézirat).

Böddi B, Cseh E, Fodor F, Király I, Nyitrai P, Sárvári É, Szabó E.-né, Szigeti Z, Tamás L. (1994) Növényélettani gyakorlatok (Szerk.: Láng F.) p. 236, ELTE, Budapest (egyetemi jegyzet).

5. fejezet - A fluoreszcencia leképezés alkalmazása a növényi stresszek detektálásában

szerző: Dr. Szigeti Zoltán

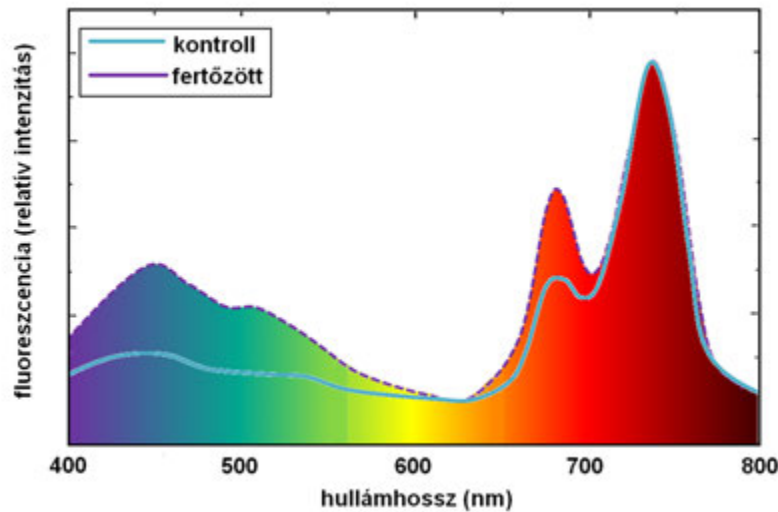
5.1. Röviden a növényi stresszről általában

A növények életük során számtalan biotikus és abiotikus stresszor hatásának vannak kitéve. Biotikus stresszorok közül elsősorban a kártevő mikroorganizmusokat, köztük vírusokat, baktériumokat, gombákat kell említeni, de a rovarok, csigák okozta rágás is ide sorolható, míg abiotikus stresszoroknak a növényi környezet extrém megváltozásaiból adódó hatásokat, pl. hőség, fagy, szárazság, erős fény, UV-sugárzás, tápanyaghiány, stb. tekintik. Mindkét típusú stresszor általában a védekezést, a jobb alkalmazkodást szolgáló, többletenergiát és egyes anyagok szintézisét igénylő válaszreakciókat vált ki, és jelentős mértékben megváltoztatja a növények anyagcseréjét, élettani folyamatait, ami természetű növények esetén termésökkenést, de legalább is minőségromlást okoz.

A megterheléssel járó, sokféle helyzet leírására – mely helyzetek egy adott szervezetben a normális viselkedéstől való eltéréshez vezetnek – a növények esetében is a stressz kifejezést használjuk. *A stressz az a fiziológiai állapot, amelyben a növények növekedése, fejlődése és szaporodása a fokozott környezeti terhelés miatt a genomban meghatározott lehetőségek alatt marad.* A stresszor a környezet egy eleme, ami a növény fiziológiájában olyan változást okoz, ami élettani alkalmazkodást eredményez. A stresszor hatására a szervezetben lezajló folyamatok egy jellegzetes eseménysort, tünetcsoportot alkotnak, melyeket összefoglalóan stressz szindrómának nevezünk. A növényegyed alkalmazkodását – attól függően, hogy egy vagy több stresszor hatása éri – *akklimációnak, vagy akklimatizációnak nevezük.* Mindez a növényegyed morfológiai és fiziológiai illeszkedése annak érdekében, hogy kompenzálja a stresszor hatására bekövetkező funkciócsökkenést. Az akklimáció és az akklimatizáció a környezeti tényezők megváltozásaira adott fenotípusos válaszok, melyeknek mértéke a fenotípusos plaszticitástól függ. (E választól különbözik a szűk fenotípusos plaszticitású, tehát az egyed életében alkalmazkodni nem képes egyedek populációjában a genotípusos változás eredményeként érvényesülő adaptáció.)

5.2. A növények fluoreszcencia sajátosságai

A növényekben előforduló anyagok nagy része megfelelő hullámhosszú gerjesztés hatására fluoreszkál. UV-gerjesztés hatására a levelek a kék és a zöld spektrális tartományban 440 és 460 nm között mutatnak emissziós maximumot (F440), illetve 520 és 530 nm körül egy változó mértékben jelentkező vállat (F520) (5.1. ábra). A zöld levelekben a kék és zöld fluoreszcencia elsősorban a klorofillmentes epidermiszsejtekből és a legnagyobb levélerekből, sejtfalakkból származik. A mezofill sejtekben kék és zöld fluoreszcenciát nem, vagy alig tapasztalunk, mert azt a mezofillsejtek fotoszintetikus pigmentjei részben, vagy egészben abszorbeálják. A reabszorpció a zöld fluoreszcenciát kevésbé érinti, ezért az a kék fluoreszcenciához képest az erek közötti területen intenzívebb, mint az edényfalokban, de mindezzel együtt is csak ritkán nagyobb intenzitású, mint a kék fluoreszcencia.



5.1. ábra. Kezeletlen és dohány mozaik vírussal fertőzött dohány (*Nicotiana benthamiana*) levél fluoreszcencia spektruma.

21 különböző növényfajon végzett kutatások azt mutatták, hogy jelentős kék fluoreszcencia emitter a sejtfal-poliszaharidokkal észterésített ferulasav. A sejtfal más hidroxifahéjsav származékai, mint a p-kumársav és a kávésav csekély mértékben járulnak hozzá. A zöld spektrális tartományban fluoreszkálnak a kempferol- és kvercetinglikozidok, valamint a berberin és a riboflavin.

A gerjesztő UV fényt a felső és alsó epidermisz nyeli el legjobban. Itt találhatóak a 440 nm és az 520 nm-es fényt kibocsátó anyagok (elsősorban flavonoidok), míg a levél középső parenchima rétegében a 690 nm-en és 740 nm-en emittáló klorofill-a a meghatározó fluorofor. Az UV sugárzás, ami, ha nem abszorbeálódik az epidermiszben és eljut a parenchima sejtekig, gerjeszti a klorofill-a vörös (F690) és távoli vörös (F740) fluoreszcenciáját is elsősorban a paliszád parenchima sejtekben közvetlenül az epidermisz alatt. A laboratóriumban, vagy üvegházban nevelt növények, melyek általában a szabadföldi körülményekhez képest alacsony megvilágításon nőnek, viszonylag intenzív UV-indukált klorofill-a fluoreszcenciát mutatnak, ami azonban a növénynevelési fény intenzitásának emelkedésével progresszíven csökken. A teljes napfénynek, a természetes UV-sugárzásnak kitett szabadföldi növényekben ugyanis az oldható flavonoidok (flavonok, flavonolok, kalkonok), valamint a fahéjsav származékok szintje – éppen az UV sugárzást elnyelő képességükön alapuló védő funkciójuk miatt – többszöröse az üvegházi növényekének. Ilyenkor az epidermisz sejtek abszorbeálják a növényt érő UV-sugárzás legnagyobb részét, így csak kevés UV-sugárzás jut a levél mezofillumába, s ennek következtében a szabadföldi növényeknek a klorofill-a-tól származó vörös és távoli vörös fluoreszcenciája alacsonyabb lesz. Zöld levelekben a klorofill fluoreszcencia az erek közötti (intercostalis) területekről származik.

A kék és/vagy a zöld fluoreszcencia és aránya a klorofill vörös és távoli vörös fluoreszcenciájához képest fajonként különböző. Ismeretes, hogy az egyszikűekben a sejtfalhoz kötött, UV-abszorbeáló fenolos anyagok mennyisége sokkal magasabb, mint a kétszikűekben, ennek megfelelően az egyszikűek pl. fűfélék, sások nagyobb intenzitású kék és zöld fluoreszcenciát emittálnak. A fluoreszcencia intenzitás egyrészt az emittáló anyag koncentrációjától, a leveleknek a spektrális tulajdonságokat befolyásoló sajátosságaitól, pl. a sejtek elrendeződésétől, sejtek közötti üregektől, az emittált fluoreszcencia reabszorpciójától, valamint a fotoszintézis, a hőkibocsátás és a klorofill-fluoreszcencia közötti energiaeloszlástól függ. Mindezen okokból a fluoreszcencia sávok intenzitása fajok között, sőt akár egy növényen belül is variálhat.

5.3. A stresszelt növények fluoreszcenciája

A különböző stresszorok hatására fellépő válaszreakciók során a növényekben jellegzetes fluoreszcencia sajátosságokkal rendelkező metabolitok is felhalmozódnak. Ezek általában olyan anyagok, melyek a kék és a zöld spektrális tartományban emittálnak. A stresszorok közvetve, vagy közvetlenül a fotoszintetikus apparátus

módosulását, vagy akár károsodását is okozhatják, ezért a legfontosabb fotoszintetikus pigment, a klorofill-a fluoreszcencia jellemzőit is megváltoztatják. A fluoreszcencia leképezést – elsősorban a vörös és a távoli vörös régióban – kiterjedten alkalmazzák a fotoszintetikus apparátus állapotának jellemzésére. E célra kidolgozott speciális technikákkal olyan fotoszintetikus paraméterek is közvetlenül leképezhetők, mint a PSII maximális kvantumhatékonyságát jelző Fv/Fm, vagy a különféle fotokémiai és a nem-fotokémiai kioltás paraméterek. A stresszfiziológiai vizsgálatokban azonban a fotoszintetikus működést jellemző paramétereken kívül nagyon informatív a kék és a zöld spektrális régióban emittált fluoreszcencia mértéke (5.1. ábra.) és a vörös, valamint a távoli vörös fluoreszcenciához viszonyított aránya. Ennek meghatározására, egy levél felületén történő képszerű megjelenítésére ad lehetőséget a többhullámhosszú (multispektrális) fluoreszcencia leképező rendszer.

Egyes növényi stresszorok, mint pl. a nitrogénhiány, vagy a nagy fényfelesleg a klorofill-a vörös fluoreszcenciájának csökkenése révén az F440/F690 fluoreszcencia arány növekedését okozzák. Ugyanakkor ezen és más stresszorok hatására a klorofill destrukció fokozódhat, a bioszintézis lassulhat, ami a klorofill-a fluoreszcenciájának az alacsonyabb klorofilltartalom miatti kisebb önabszorpciója révén, 690 nm-nél nagyobb intenzitású vörös fluoreszcenciát eredményez. Ezért az F690/F740 arány is nagyobb lesz, mely arány az *in situ* klorofilltartalom inverz indikátora. Ugyanakkor a kék és zöld fluoreszcencia intenzitása is emelkedhet, amennyiben tartós stressz esetén az UV-abszorbeáló, kék és zöld tartományban fluoreszkáló anyagok mennyisége az epidermiszben nő, ugyanakkor a kék és zöld fluoreszcenciát abszorbeáló pigmentek (klorofillok és karotinoidek) mennyisége lassan csökken. Ezáltal kevesebb UV sugárzás jut a mezofillum sejteibe, ami ugyancsak a vörös fluoreszcencia csökkenését eredményezi. Az F440/F690 arány is nő, de ezt sok esetben elsősorban a kék spektrális régióban emittáló stresszjelző anyagok mennyiségének növekedése okozza.

Egy fotoszintézisgátló herbiciddel, a diuronnal kezelt dohány-növényben a F440/F690 és a F690/F740 fluoreszcencia arányok csökkentek, mivel a klorofill-a fluoreszcenciája a fotoszintézis gátlása következtében megnőtt, miközben a kék fluoreszcencia intenzitása nem változott szignifikánsan. Hasonló változások voltak megfigyelhetők a hőkezelt dohány-nál. Stresszorok hatására a kék fluoreszcencia intenzitása általában kisebb ingadozásokat mutat, mint a klorofill fluoreszcencia. Az F440/F690 és az F440/F740 arányok jó és korai stresszindikátorok, melyek érzékenyen reagálnak a stressz-szituációkra, a megváltozott környezeti feltételekre. A fiziológiai állapotváltozások tehát a különböző fluoreszcencia arányokban (F440/F690, F440/F740, F690/F740) jól tükröződnek, ezért ezeknek a mutatóknak nagy diagnosztikai jelentősége van.

A vörös és a távoli vörös tartományú emissziós maximumért elsősorban a PSII reakciócentrumában és antennájában lévő klorofill-a molekulák a felelősek, a távoli vörös tartományú emissziót azonban a PSI fluoreszcenciája is befolyásolja, mely erőteljesen függ a levél hőmérsékletétől. Szobahőmérsékleten a PSI fluoreszcenciájának hatása a vörös/távoli vörös emissziós hányadosra elenyésző. Bár szerves oldószerekben oldva a klorofill-b molekulák is mutatnak emissziót, ez azonban intakt növényben a klorofill-b és klorofill-a közötti hatékony energiatranszfer miatt nem jelentkezik. Az epidermiszen átjutó UV fény által gerjesztett klorofill fluoreszcencia a reabszorpció miatt csak a viszonylag külső sejtrétegekből származhat. Alacsony klorofilltartalmú levelek esetében azonban mélyebb rétegek is forrásai lehetnek az emisszióknak. A levelek adaxiális és abaxiális felszínéről eltérő intenzitású fluoreszcencia, és különböző vörös/távoli vörös emissziós hányados mérhető, ugyanis a levél leggyakrabban aszimmetrikus szöveti felépítése, valamint a szivacsos és a paliszád parenchima közötti strukturális különbség eltérő módon változtatja meg a vörös tartományú emissziót a reabszorpció révén. Laboratóriumi körülmények között nevelt növények, melyek a mesterséges fényviszonyok közt alacsonyabb UV-hányadot kapnak, s emiatt a szabadföldi növényeknél kevesebb fotoprotektív anyagot halmoznak fel az epidermiszben, jóval magasabb klorofill fluoreszcenciát mutathatnak, mint a természetes fényen nőtték. Olyan stresszhatások, mint pl. a nehézfémek, vagy az esszenciális tápelemek hiánya módosíthatják mind a vörös-távoli vörös, mind a kék-zöld fluoreszcenciát, így a tünetek erőssége, közvetve a stresszeltség mértéke, s annak a levél felületén tükröződő eloszlása jól mérhető a fluoreszcencia leképezéssel.

Mint már említettük a kék és a zöld fluoreszcencia reabszorpciója is szerepet játszik az arányok változásában, a zöldé azonban lényegesen kisebb mértékű, mint kéké – mivel a klorofill-a-nak a spektrális régióban nincs elnyelése – és ezért a klorofilltartalom csökkenésekor az F440/F520 fluoreszcencia arány csökkenhet. A változás azonban nem lehet nagyon jelentős, hiszen a kék-zöld fluoreszcencia túlnyomó része a klorofillt nem tartalmazó bőrszöveti sejtekből származik, ezért az önabszorpció eleve csak a kék-zöld fluoreszcencia kisebb, mélyebb rétegekből származó részét érintheti. Bizonyos kórokozók, pl. növénypatogén gombák önmaguk által emittált fluoreszcencia révén is fokozhatják a kék-zöld fluoreszcencia intenzitását, így ilyen esetekben a felvételek értékelésénél ezt is figyelembe kell venni. A stressz típusa és a növény válaszreakciója határozza meg, hogy mely fluoreszcencia

arányok csökkennek és melyek nőnek. A fluoreszcencia arányoknak a stresszorok hatására bekövetkező változásainak irányát mutatja az 5.1. táblázat.

5.1. táblázat

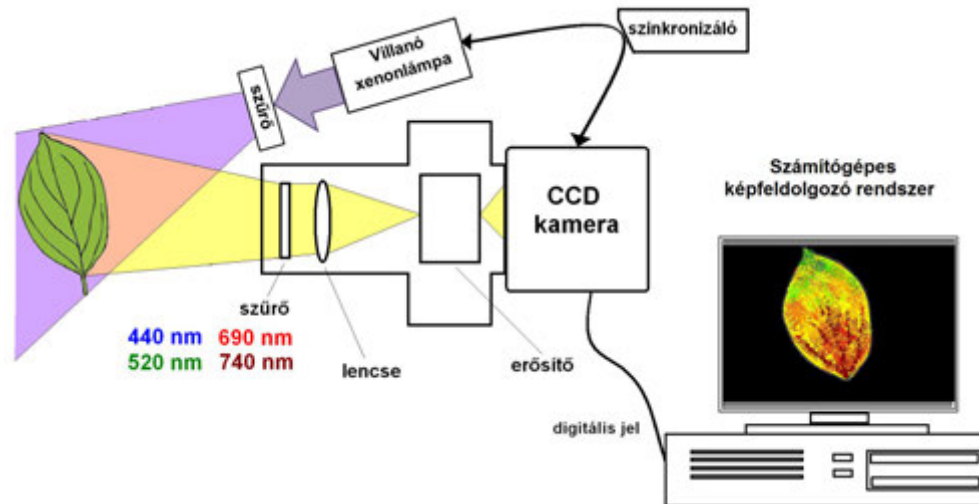
A kék/vörös (F440/F690), kék/távoli vörös (F440/F740), vörös/távoli vörös (F690/F740) és kék/zöld (F440/F520) fluoreszcencia arányok, mint stressz indikátorok mértékének változásai különböző stresszorok hatására a kezeletlen növényhez képest. ++ = jelentősen magasabb, + = magasabb, -- = jelentősen alacsonyabb, - = alacsonyabb, 0 = nincs szignifikáns változás (Buschmann et al., 2000 nyomán, kiegészítve, Szigeti et al., 2008)

stresszor	F440/F690	F440/F740	F690/F740	F440/F520
Vízhiány	++	++	0	0
Nitrogénhiány	++	++	+	0
Erős fény	++	++	+	--
Levéltetű szúrás	++	++	0	+
Levéltetű fertőzés	++	++	++	-
Hőstressz	--	--	0	-
UV A-stressz	--	--	0	+
Fénygátlás	++	++	--	0
Paraquat kezelés	+	+	-	-
Kadmium-stressz	+	+	+	-
Diuron kezelés	--	--	+	0

A szokásos spektrofotometriás mérésekkel szemben a fluoreszcencia leképezéssel a levél teljes felülete által emittált fluoreszcencia és annak felületi eloszlása detektálható. Az eloszlás ismeretének különösen egy stressznek vagy patogénfertőzésnek a kezdeti stádiumában van jelentősége, mely hatások csak ritkán érintik egyformán a levél teljes felületét, hanem a hatás természetétől függő módon, például a patogének (vírusok, baktériumok, gombák) levélen belüli terjedésétől függően érintik a levél egyes részeit. A tünetek heterogenitása tehát képszerűen is megfigyelhető.

5.4. A fluoreszcencia leképező rendszer működése vázlatosan

A fluoreszcencia leképező rendszerben (5.2. ábra) a növényi minta fluoreszcenciáját egy 16,7 Hz-cel villogó (*flash*) xenonlámpa (FX-300UV, Perkin Elmer Optoelectronics, Cambridge, UK) gerjeszti, amely elé egy UV áteresztő szűrőt (DUG 11, Schott, Mainz, Germany, 340 nm) helyeztek el. A lámpát a leképezendő mintától 45-50 cm-re helyezték el, úgy, hogy a gerjesztő fénysugár kb. 60-65°-os szöget zár be a minta síkjával.



5.2. ábra. A fluoreszcencia leképező rendszer vázlatja.

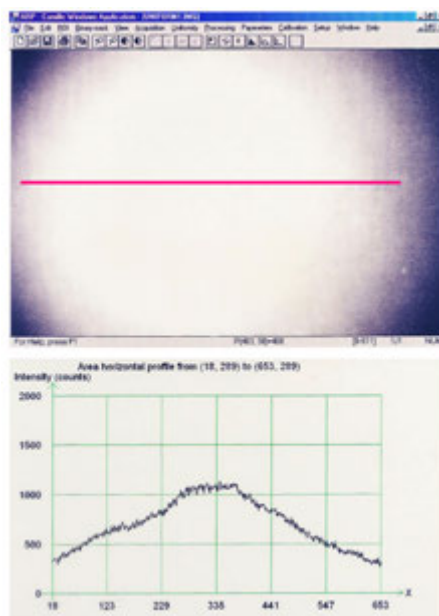
A minta által emittált fluoreszcencia egy optikai és erősítő rendszeren keresztül jut a CCD kamerába (Photonetics, Kehl, Germany). A szűrők (LOT-Oriel, Darmstadt, Germany) egy a kamerába beépített szűrőtartóban a kamera lencséje után található, amelyek a szoftver segítségével történő változtatással, a fény útjába helyezésével teszik lehetővé a négy hullámhossz tartományban az emittált fluoreszcencia áteresztését és leképezését. Ez a négy hullámhossz a kék tartományban 440 nm, a zöldben 520 nm, a vörösben 690 nm, a távoli vörösben pedig 740 nm. A kamera nyitását a xenon lámpa felvillanásával szinkronizáljuk egy antenna révén, ami a villogó xenon lámpát gyújtó áramot biztosító kábel elektromágneses terét érzékeli. A kamera működését számítógép vezérli. A képek rögzítését a Camille 1.04, korrekcióját, kiértékelését a Camille 1.05 szoftver (Photonetics, Kehl, Germany) alkalmazásával végezzük. A kis intenzitású fluoreszcens jel felerősítése részben a kamerára adott feszültséggel, de inkább több száz gerjesztő fényfelvillanás alkalmazásával történik. Minden mintáról mind a négy hullámhossznál általában 400-400 képet összegezzünk (de ez a szám a fluoreszcencia intenzitásától függően változtatható), majd ugyanennyi képet veszünk fel a gerjesztő fény alkalmazása nélkül, ami a háttér spontán fluoreszcenciájának meghatározására szolgál, amit a villogó gerjesztő fényvel kapott képek összegéből levonunk.

A jó minőségű képképzést számos mérés technikai buktató nehezíti. Problémát jelenthetnek nagy vastagságbeli kiterjedéssel és változatossággal (redőkkel, kiugró erezzel) rendelkező levelek. A méréshez alapvető fontosságú, hogy az UV gerjesztő fény lehetőség szerint egyenesen érje a levél felületét. Ez gyakorlatilag nem oldható meg, tekintettel arra, hogy a gerjesztő fény beesésének szöge nem azonos a detektálás 90°-os szögével. Viszont megfelelő korrekcióval a megvilágításnak ebből következő egyenetlenségéből adódó fluoreszcencia intenzitás különbségek kiküszöbölhetők (részletesebben lásd később), de a levél görbületeinek, redőzöttségének hatásai nem eliminálhatók. Folyamatosan figyelni kell a detektorba jutó nem fluoreszcens fény és a kamera belső zajának szűrésére, és a lámpa-kamera szinkron megtartására. Ez utóbbi azért fontos, mert a kamera impulzus üzemmódban működik, azaz csak akkor nyílik, amikor a gerjesztő xenonlámpa is villan. Ha e kettő nincs szinkronban, akkor sok kép veszt el, s ez a valós fluoreszcencia intenzitás helyett lényegesen alacsonyabb értéket eredményez.

5.5. A fluoreszcencia leképezéssel kapott képek kiértékelése

A kiértékelést a Camille 1.05 programmal végezzük. A *File* menü *Open Sequence* parancsával (Shift+S) a megfelelő fájl név beírásával behívható egy 440-520-690-740 nm-en felvett képsorozat. Valamennyi kép láthatósága érdekében a *Window/Tile* paranccsal mozaikszerűen jelenítjük meg a négy képet.

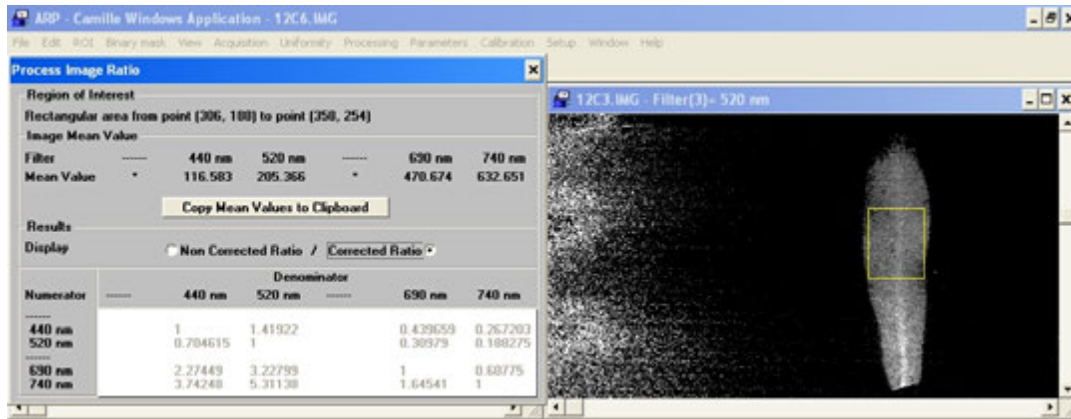
A kiértékelés során az első lépés a gerjesztő fény inhomogenitásának, a mintát érő gerjesztő fény egyenetlenségének a figyelembe vétele, ami úgy történik, hogy a minta helyett egy fehér papírlapot megvilágítva a fehér papír 440 nm-nél emittált fluoreszcenciájával korrigáljuk a képeket (*uniformity correction*, 5.3. ábra).



5.3. ábra A megvilágítás inhomogenitásának korrekciójára szolgáló felvétel, ami egy fehér papír 440 nm-nél mért fluoreszcenciája alapján mutatja a megvilágítás egyenetlenségét (fent), illetve a felvétel horizontális profilja a felső képre húzott vonal mentén (lent).

Ehhez először be kell hívni a korrekciós képet. (*Uniformity/Load uniformity image*), majd képenként elvégezni a korrekciót (*Processing/Uniformity Correction*, vagy Shift+U). A korrigált képek ilyenkor általában túl világosak lesznek, ilyenkor a – gombbal lehet csökkenteni a fényerőt, úgy hogy a lehető legtöbb részlet láthatóvá váljék.

A háttér zavaró jeleinek eliminálása érdekében, a 690 nm-es képet alkalmazva készítsünk egy bináris maszkot (*Binary mask/Create*). A cél az, hogy a levél minél jobban elváljon a háttértől. A maszk két szélső értékének olyan értéket kell választani, amellyel a képen a háttér minél inkább fekete, míg a levél képe színes. A bináris maszk készítése során a legmagasabb intenzitású – a fekete-fehér képeken fehér színű – területek piros, míg a legkisebb intenzitású, fekete területek sötétkék színben jelennek meg. Az elkészített maszk *bmp* fájlban elmenthető (*Binary mask/Save*), majd minden – ugyanazon mintáról készült – képre külön-külön alkalmazandó (*View/Apply the binary mask*). Az így megváltoztatott képek új sorozatban is elmenthetőek: *File/Save Sequence*. Ha nem akarjuk a teljes levél fluoreszcencia értékeit átlagolni, hanem csak egyes területeire vagyunk kíváncsiak – főleg akkor, ha a levél fluoreszcenciája nagyon heterogén – akkor az egyik képen kijelölhető egy vizsgálni kívánt téglalap alakú terület (*region of interest: ROI*, 5.4. ábra) és ez a kijelölés a *ROI/Duplicate* (Ctrl+D) paranccsal az adott képsorozat többi tagjára is átvihető. Ez a terület, a ROI el is menthető. A kijelölt ROI átlagos intenzitásértékeit a *Processing/Sequence Intensity Ratio* (Ctrl+I) paranccsal lehet megjeleníteni. A kijelölésnél vigyázni kell arra, hogy a háttér elemei ne kerüljenek bele, mert a háttér alacsony intenzitásértékei befolyásolják a meghatározni kívánt terület átlagértékeit.

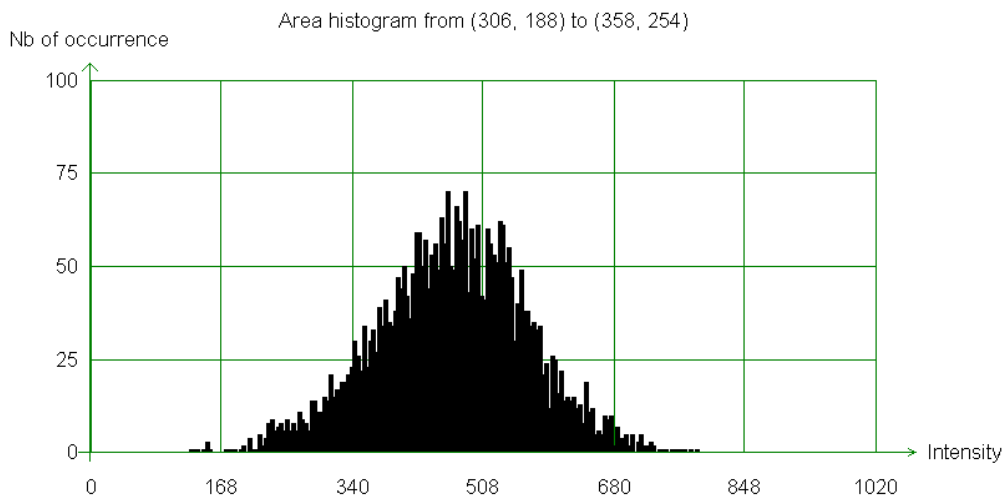


5.4. ábra A vizsgálandó levél egy területének (ROI) kijelölése (jobbra) és az adott területre jellemző intenzitás átlagok megjelenítése a képernyőn (balra).

A fenti paranccsal kiírt átlagértékek a *Copy Mean Values to Clipboard* paranccsal kimásolhatók és pl. Excel táblázatba beilleszthetők, de ilyenkor a tizedespontokat azonnal tizedesvesszőkre kell cserélni. A szűrők különböző érzékenységét a gyártó által megadott korrekciós tényezők (440 nm-nél: 0,40, 520 nm-nél: 1,00, 690 nm-nél: 0,71, 740 nm-nél: 0,58) alkalmazásával vesszük figyelembe. Az átlagnak a szűrők érzékenységi faktorával korrigált értékeit is ismeri a program, de kimásolni csak a korrigálatlan értékeket lehet, ezért egy előre elkészített Excel-korrekort érdemes használni, amibe a korrigálatlan értékeket beírva, az adott hullámhosszhoz tartozó szűrőparamétereket beadva, megkapjuk az adott hullámhosszra érvényes, korrigált fluoreszcencia intenzitás értékeket.

Egy adott képen egy-egy pont, vagy egyenes, illetve a kijelölt ROI átlagos, legalacsonyabb és legmagasabb intenzitásértékeit is megmutatja a program, ha a menü alatti ikonok elemére kattintunk. Ekkor az adatok (pl. korrigálatlan átlag, szórás, minimum, maximum) a programablak alsó sorában leolvashatók. A hamisszín-hozzárendelés esetén (lásd később) a színskála határainak megadásakor e szélső értékek ismerete fontos lehet.

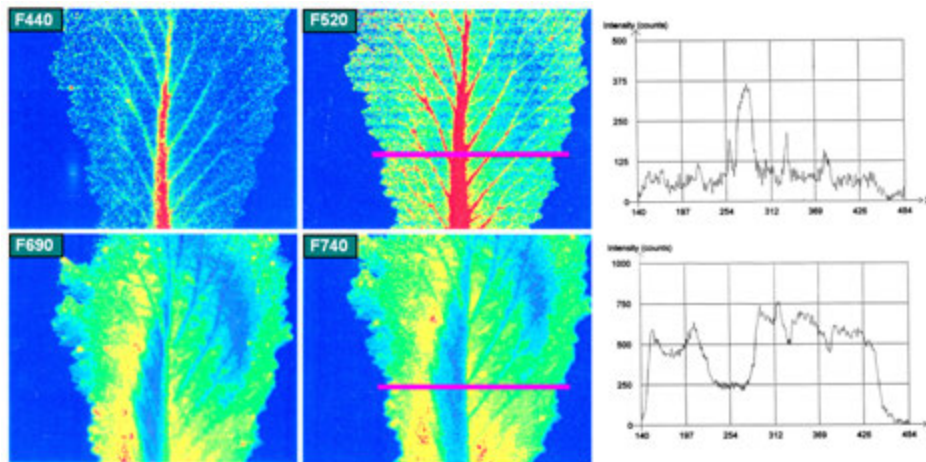
A *Processing/Histogram* paranccsal (Ctrl+H, vagy ikon) az aktív kép teljes egészének, vagy ha van kijelölt ROI, annak a hisztogramját lehet megkapni, ami megmutatja, hogy az egyes intenzitásértékek hány pixelen fordulnak elő (5.5. ábra).




5.5. ábra Egy adott levél, vagy azon kijelölt terület (ROI) fluoreszcencia intenzitásának gyakoriságát mutató hisztogram.

Ugyanebben a menüben található a horizontális és vertikális profil felvételének parancsa. Az előbbi (Shift+H, vagy ikon) pl. megmutatja, hogy egy sávban mennyi a pixelek intenzitásösszege, illetve egy adott vízszintes egyenes

mentén mekkorák az egyenes mentén levő pixelek intenzitásértékei. Egy alkalmazási lehetőséget mutatunk be az 5.6. ábrán egy kínai kel levelén szemlélve a zöld és a távoli vörös fluoreszcencia eloszlását egy egyenes mentén a horizontális profil felvétel segítségével. Az ábrán látszik, hogy az erek kiugróan magas zöld fluoreszcenciát mutatnak, míg a távoli vörös fluoreszcencia az erekben csökkent értékeket mutat.



5.6. ábra Kínai kel levél fluoreszcencia leképezése 440, 520, 690 és 740 nm-nél (balra). Horizontális profil az 520 nm-nél (felül) és 740 nm-nél felvett képen (alul) feltüntetett vonal mentén (jobbra).

A Camille 1.05 program segítségével, az egyes képekkel számítási műveleteket is lehet végezni, pl. a klorofilltartalom változásának bemutatásához szemléletes a 690, ill. 740 nm-en felvett fluoreszcencia kép hányadosa (F690/740), amely érték fordítottan arányos a klorofilltartalommal. A két – arányba állítani kívánt – képpel a *Processing/Arithmetic Operations* (Shift+O, vagy  ikon) paranccsal végezzük el a műveletet, ami a két kép pixelenkénti intenzitásértékeinek osztásával adja a hányadosképet. Mivel a keletkező képen a hányadosértékek nagyon alacsonyak lesznek, egy szorzást is kell alkalmazni a műveletben, mely szorzó faktor értéke az arányképek egyes pontjainak nagyságrendjétől függ, ez lehet pl. 100, vagy 1000. Az így kapott értékek – pl. a hamis szín hozzárendelésekor – már könnyebben kezelhetők lesznek.

Az egyes hullámhosszaknál felvett fluoreszcencia képeket az intenzitástól függően hozzárendelt színekkel tesszük szemléletesebbé. Ezt a műveletet nemcsak a Camille 1.05 programmal, hanem az ImageJ szoftverrel is elvégezhetjük. A Camille 1.05 programból *bmp* kiterjesztéssel kell elmenteni azt a fájlt, amelyet ebben a programban kívánunk megnyitni. A *Plugins/LUT Panel 2.2/Gradient LUT* paranccsal lehet előhívni a színezéshez használható színskálabeállító táblát (LUT: Lookup table). 2-5 szín beállítása választható, érdemes kihasználni a maximális lehetőséget. Az első szín (*Define color 1*) fog tartozni a legkisebb intenzitású területekhez, az ötödik a legnagyobbhoz. Ha nagyjából egyenletesen választunk színeket a színskála területéről, a hamisszínezés is szimmetrikus lesz, ellenkező esetben az intenzitástartomány adott részét finomabb, más részét durvább színfelbontással képezzük le. Egy lehetőség pl.: kék/fekete – piros – narancs – sárga – fehér. A zöld színt a levél színére való asszociálás miatt el lehet kerülni. A beállított színskála elmenthető (*Export LUT*).

Ezt a képet 24 bites *bmp* formátumban célszerű kimenteni. Ehhez pl. az *Image/Type* menüben a 8 bit mélységet RGB formára kell alakítani. Az elmentett *bmp* fájl megnyitható **Paint** programban, ahol a *Kép* menüben átlátszóvá kell alakítani a képet. Egy bármilyen képszerkesztő programban megnyitva az ehhez a sorozathoz tartozó és *bmp* kiterjesztéssel korábban elmentett bináris maszkot és azt rámásolva az átlátszóvá tett hamisszínes képre, a háttér nagy része kiszűrhető: Ez a kép, illetve az ebből négyszöges, vagy szabadkézi kijelöléssel kivágott levél képe elmenthető szintén 24 bites *bmp* formátumban.

5.6. A mérés menete

1. Kapcsolja be a mérést vezérlő számítógépet és a monitort, majd a CCD kamerát!
2. A megfelelő ikonra kattintva indítsa el a Camille 1.04 mérőprogramot!
3. Kapcsolja be a xenon flash lámpa tápegységét!

4. A program menüjében válassza a *Setup*-ot és kattintson a *Camera* parancsra, majd a megjelenő panelen válassza a következőket:

Camera control: *Remote*

Intensifier Gain voltage: *650 V* (max. 700V)

Operation mode: *Pulsed*

5. Kapcsolja be a minta rögzítését biztosító ventilátort!

6. Helyezze el a levélmintá(ka)t!

7. Válassza ismét a *Setup*-ot, állítsa be a kívánt paramétereket, különös tekintettel az összegzendő képek számára!

8. Az *Acquisition* menüben válassza a *Multiple acquisition*-t, amire a mérés azonnal elindul.

A műszer egymás után felveszi a képeket mind a 4 hullámhossznál.

9. A mérés automatikus leállása után a képfájlokat a program által korlátozott rövid névvel ellátva mentse el!

10. A mérések befejezése után a *Camera* menüponton belül vegye le a feszültséget a kameráról, kapcsolja ki a xenon lámpa tápegységét és a ventilátort, a kamerát, lépjen ki a programból!

11. A képek korrigálása (uniformity és szűrőparaméterek), feldolgozása, arányképek készítése a Camille 1.05 programmal történik.

12. A munka befejezése után lépjen ki a programból és kapcsolja ki a számítógépet!

5.7. Feladatok

1. Egy fotoszintézisgátló gyomirtószer felvételének nyomon követése a levélben. A mérés azon alapul, hogy a levélbe jutó gyomirtószer a kloroplasztiszban az elektrontranszportot gátolva fokozza a klorofil-a vörös és távoli vörös fluoreszcenciáját.

2. Műveletek fluoreszcencia képekkel

- A képek színezése a hamis színekkel, a *uniformity correction*, szűrőkorrekció.

- A képek intenzitásának függése az erősítéstől, az összegzett képek számától

- Horizontális profil felvétele egy levélről az egyes hullámhosszaknál emittált

fluoreszcencia pontos helyének lokalizálására, szemléltetésére.

- Arányképek készítése.

3. A gerjesztő fény beesési szögének hatása az emittált fluoreszcencia eloszlására és a fluoreszcencia arányokra.

5.8. Felhasznált irodalom

Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK. (2000): Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica*, **38**, 483–491.

Szigeti Z. (2007) Növények és a stressz. In: Növényélettan – A növényi anyagcsere II. (Szerk.: Láng F.) pp. 950-1019, *ELTE Eötvös Kiadó Budapest*.

Szigeti Z. (2008) Physiological status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Agron. Hung.* **56**, 223-234.

6. fejezet - A fotoszintetikus oxigén evolúció és a légzés intenzitásának mérése polarográfiás módszerrel

szerző: Dr. Nyitrai Péter

Biológiai minták fotoszintetikus oxigén fejlődésének, illetve a légzés során fogyasztott oxigén mennyiségének mérésére több módszert fejlesztettek ki. Gáz fázisban lévő O₂, illetve vizes oldatokban oldott O₂ mérésére, az oxigén koncentráció változásának nyomon követésére, egyszerűsége és széleskörű alkalmazhatósága miatt leginkább a polarográfiás módszer terjedt el. A leggyakrabban alkalmazott oxigén polarográf, az un. Clark-típusú elektród, (Clark 1956) ami egy bipoláris, állandó potenciálú O₂-szenzor.

6.1. A Clark-típusú O₂-elektród

A Clark-típusú oxigén-elektród kisméretű platina (Pt) katódot és egy nagyobb méretű ezüst-kloriddal borított ezüst (Ag) anódot tartalmaz, amelyeket általában indifferens anyagba (epoxigyanta) ágyaznak be. Az elektródok tömény KCl elektrolitba merülnek, ami puffert (bikarbonát, borát), illetve kiszáradás ellen glicerint, vagy polietilén-glikolt tartalmazhat. A két elektród közötti polarizációs egyenfeszültség 600-700 mV. Az elektródokat egy olyan polipropilén membrán borítja, ami permeábilis az oxigénre és a CO₂-ra, de nem ereszti át a vizet és az ionokat, továbbá megakadályozza olyan vegyületeknek az elektródokhoz való bejutását, amelyek azokat mérgezhetik, vagy a mérést zavarhatják. Ilyen lehet pl. a ferricianiddal végzett Hill-reakció, amelynek során az ezüst a cianiddal komplexet képezve tönkreteszi az elektródot (elektródméreg).

Az elektródokra adott egyenfeszültség hatására a Pt katód polarizálódik, felülete negatívvá válik és rajta az odadiffundáló O₂ redukálódik, míg az anódon az ezüst oxidálódik és AgCl válik ki. Az elektród folyamatok során keletkező áram egyenesen arányos a katódon redukálódott oxigén mennyiségével. A gáztérben, illetve folyadékban történő mérés azonos elv szerint történik, de folyadékfázisban az oxigén diffúziója sokkal lassúbb, ezért a mintatartóban az egyenes oxigén koncentráció eléréséért és fenntartásáért a mintaoldatot megfelelő, állandó sebességgel kevertetni kell.

Az alábbi elektród folyamatok mennek végbe:

Pt katód: $O_2 + 2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2O_2 + 2OH^- \rightarrow H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2OH^-$

Ag anód: $4 Ag \rightarrow 4Ag^+ + 4 e^-$ $4 Ag^+ + 4 Cl^- \rightarrow 4 AgCl$

Az O₂-elektród működése során az elektrolit a katód környékén lúgossá válik és a CO₂ átjutva a membránon oldódik benne, karbonát ion formájában (ezért az állandó pH fenntartására alkalmaznak puffert).

A reduktív áram értékét az O₂-nek a katódhoz való diffúziója szabja meg (diffúziós határáram). A diffúziós áram és az oldott oxigén mennyisége között, adott hőmérsékleten, lineáris kapcsolat van. A diffúziós határáram hőmérsékletfüggő, a hőmérséklet emelkedésével az áram exponenciálisan nő. A hőmérséklet változása befolyásolja az oxigén oldékonyságát is (különösen nyitott mintatartóval működő rendszer esetén). De változik a biológiai minta anyagcseréjének sebessége is. A fentiek miatt az O₂-elektród használata során a rendszert állandó hőmérsékleten kell tartani, termosztálni kell.

Annak ellenére, hogy a Clark-elektród kvantitatív oxigénmérést tesz lehetővé, két hátrányos tulajdonsága is van. Egyrészt az elektródokat borító membrán miatt a rendszer csak lassan, akár több tíz másodperces késéssel (lag fázis) tudja követni az oxigén koncentráció időbeli változását. Másrészt a Pt katód érzékenysége a kis felülete miatt, kicsi.

6.2. Joliot-féle O₂-elektród

A fent ismertetett hátrányoknak a kiküszöbölésére fejlesztették ki a gyors és nagyérzékenységű, ún. impulzus elektródokat. Ezeknek első formáját a 70-es években P. Joliot készítette. A Joliot-elektrod esetén a Pt katód felülete nagy, kb. 1 cm átmérőjű körlap, és az Ag anód egy 2-3 cm átmérőjű gyűrű. A minta közvetlenül a Pt katódra helyezkedik el, így az O₂ azonnal eljut az elektródhoz. Ez az elrendezés teszi lehetővé a kis térfogatú (50-100 ml) mintából történő oxigénfejlődés kinetikájának néhány ms-os felbontású követését, illetve a folyamatos megvilágítás helyett a rövid (1-2 ms) fényimpulzusok alkalmazását is. A Joliot-elektrod használata tette lehetővé annak felfedezését, hogy fényimpulzusokkal történő megvilágítás esetén az oxigénfejlődés 4-es periódusú csillapított oszcillációt mutat. Ezek a mérések vezettek el a 4 pozitív töltés szekvenciális tárolására szolgáló fotoszintetikus vízbontó rendszer ma elfogadott modelljének kidolgozásához.

6.3. Készülék típusok

A Clark-típusú elektródok alapvetően kétféle mintatartóval készülhetnek. A nyitott mintatartójú készülékek elsősorban vizes oldatok pillanatnyi oxigén koncentrációjának meghatározására alkalmasak. Pl. természetes vizek oxigéntartalmának mérése, hordozható, elemes készülékkel. Az ilyen típusú műszerek a légzésintenzitás, illetve a fotoszintetikus oxigén evolúció időbeli követésére, kinetikai mérésekre kevésbé alkalmasak. Az ilyen méréseket zárt mintatartóval rendelkező készülékekkel lehet pontosan elvégezni. Bár az O₂-elektródok működési elve azonos, a készülékek felépítése különbözik. Ezért a mérés előtt az adott készülék műszaki leírását és használati utasítását célszerű áttanulmányozni.

6.3.1. A Hansatech gyártmányú O₂-elektród (6.1. ábra)

6.3.1.1 A készülék összeállítása

Az elektród (1) összeállítása: a Pt elektródot tartalmazó körbefutó vályúba elektrolit oldatot pipettázunk. Cigarettapapírból egy olyan méretű korongot vágunk ki, amely befedi az Ag elektródot tartalmazó kúpos részt és mindenhol beleér az elektrolitba. Ezután a membránszalagból is egy hasonló méretű korongot vágunk ki és ráhelyezzük az elektród kúpos részére. A membránfeszítő eszközre (2) felhúzzunk egy megfelelő méretű gumigyűrűt (3) és rányomjuk a kúpra úgy, hogy a gumigyűrű a kúp oldalán körbefutó bemélyedésbe illeszkedjen. Az elektródotest külső vájátába behelyezzük egy gumigyűrűt (3). Ellenőrizzük a membrán épségét, valamint az esetleges buborékok jelenlétét. Ha a membrán alatt buborék van, újra elvégezzük az elektród előkészítését.

Ha gáztérben történő mérést végzünk, ráhelyezzük az elektródot a háromrészes kamra alsó egységére (4). Ellenőrizzük a középső egység (5) szemben lévő részén, hogy az elektród kúpos részéhez illeszkedő gumigyűrű (3) a helyén van-e, majd az alsó (4) és középső (5) kamraegységet összecsatoljuk, hogy szorosan illeszkedjen, de azért nem erőltetve az összehúzást. A készülék harmadik, záró egységét (6) a megfelelő gumigyűrű (3) behelyezése után, nyitott csapokkal (7), összezárjuk, és a készüléket csatlakoztatjuk a vezérlő egységhez (8), majd azon keresztül a számítógéphez, amin behívjuk a programot (Oxylab V1.10)). Ha szükséges, elvégezzük a kalibrálást, illetve ellenőrizzük az elektród működőképességét úgy, hogy a kilélegzett levegőt az egyik csapon keresztül a kamrán átfűjük. Az elektród jóságát a képernyőn a görbe gyors csökkenése mutatja.



6.1. ábra. A Hansatech-típusú O₂-elektród részei. A számozott részek leírását lásd a szövegben.

6.3.1.2 Mintaelőkészítés

A levélből ismert felületű korongot vágunk ki, akkorát, ami lehetőleg kitölti a mintakamrában (5) rendelkezésre álló felületet. A korong tömegét is lemérjük és a levélanyagból klorofilltartalmat határozunk meg. Így az oxigénfogyást, illetve termelést felületre, tömegrre és klorofill tartalomra is tudjuk vonatkoztatni. A kamratérbe (5) először egy közepesen zárt fémhálót (9) teszünk, ami védi az elektródot a közvetlen fénytől, majd egy filckorong (10) következik, amire a nátriumbikarbonát oldatot csepegtetjük. Erre jön a levélkorong és végül egy fémrács (11). Ezután a készülék harmadik, záró egységét (6), nyitott csapokkal (7), a két kapocs (12) segítségével összezárjuk, és zárjuk a két csapot is. A készülékhez csatlakoztatjuk (13) a termosztát vezetékeit, és megindítjuk a víz keringését. A Start gombbal indítjuk a mérést. Előtte beállítjuk az y tengelyen a méréshatárt és az x tengelyen a mérési időt (Graph – set axis). Először sötétben felvesszük a légzés oxigénfogyasztását tükröző alapvonalat, majd felülről megvilágítjuk a mintát. A megvilágítás intenzitását fénymérővel mérjük. Néhány perc után leállítjuk a mérést (Stop), és az eszközök menüből (Tools) kiválasztjuk az egyenes illesztési funkciót (get rate). Mind a légzési görbére, mind a fotoszintetikus oxigéntermelést mutató görbe szakaszokra egyenest illesztünk. Az értékeket az egér bal gombjának megnyomásával kaphatjuk meg. A fotoszintetikus oxigéntermelést a légzés és a fény okozta oxigéntermelés algebrai összegével számoljuk. Az adatokat és a görbét elmentjük a gépre, vagy floppy lemezre (File – Save). A korábbi adatokat a File – Load funkcióval hívhatjuk elő.

A folyadékban történő mérés esetén (kloroplastisz, vagy alga szuszpenzió) az elektród (1) előkészítése megegyezik a fentebb leírtakkal, de a készülék felső egysége (14) más. Ez az egység egy mérőküvetét tartalmaz, amelyet az alsó egységgel (4) kell összecsavarozni (gumigyűrű - 3). A minta a küvetta kerül, aminek kb. 1.5 ml a térfogata. A küvetta egy csavaros, kapillárist tartalmazó résszel (15) zárható úgy, hogy annak homorú, alsó plexi része a mintaoldat felszínét buborékmentesen elérje. A készüléket csatlakoztatjuk a termosztáthoz (13), illetve a vezérlő egységen (8) keresztül a számítógéphez. A megvilágítás a készülék oldalán kialakított nyíláson (16) keresztül történik.

6.3.1.3 Az O₂-elektródok kalibrálása

Az O₂-elektród kalibrálása általában két pontra történik, egy adott hőmérsékleten. Oldatban történő mérés esetén, a kalibrálás a levegővel telített mintaoldat oldott O₂ tartalmára (100%), illetve az O₂-mentes mintaoldatra kapott jel ismeretében (0%), vagy ismert mennyiségű O₂ koncentrációváltozást előidéző kémiai reakcióval történhet. A mintaoldat oxigénmentesítése történhet egyéb, nem sztöchiometrikus kémiai reakcióval is (pl. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$, vagy $2\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Na}_2\text{SO}_4$), vagy szulfitokkal, pl. Na₂SO₃-tal. Gáztérben való mérésnél a kalibrálás a levegő oxigéntartalmára (100%), illetve oxigénmentes gázra (argon, nitrogén gáz, szén-dioxid) történik.

6.3.1.4 Mérési körülmények

Zárt rendszerben való fotoszintetikus oxigénfejlődés méréséhez megfelelő CO₂ koncentrációt (min. 350 ppm) kell biztosítani, amely a fotoszintézis sebességét általában nem limitálja (a 350 ppm a legtöbb növény fotoszintézisét limitálhatja, a megvilágítás erősségének függvényében is). Mind a túl magas, mind a túl alacsony CO₂ koncentráció károsan befolyásolja a fotoszintetikus oxigénfejlődést. Ha mérés gáztérben történik, a megfelelő szén-dioxid koncentrációt 1 M bikarbonát oldattal lehet biztosítani a kamrában, azaz pótolni a mérés során megkötött CO₂-ot ($\text{NaHCO}_3 \rightarrow \text{NaOH} + \text{CO}_2$), kb. 200 µl mennyiséggel. Oldatban történő mérés esetén a megfelelően megválasztott puffer biztosítja a szén-dioxidot.

Az elektród működését kilélegzett levegő átfújásával is lehet ellenőrizni, mivel a normál levegőben 21% az oxigén és 0.035% a CO₂, míg a kilélegzett levegőben kb. 14% O₂ és 5% CO₂ van, amely oxigénkoncentráció különbségeket a rendszer érzékeli.

Fotoszintetizáló növényi minta (levéldarab, vagy alga szuszpenzió) mérésekor a mintát néhány percig sötétben tartjuk, és felvesszük a légzési alapvonalat. Intakt fotoszintetikus rendszerek esetén az alapvonal negatív meredekségű, jelezve a légzés által elfogyasztott oxigént. Izolált kloroplasztiszok, vagy tilakoid membránok esetében az alapvonal meredeksége elvben nulla (ettől eltérést a hőmérséklet változása vagy az elektród instabilitása okozhat). Az alapvonal felvétele után a mintát megvilágítjuk és az egyensúlyi állapot beállta után meghatározzuk a fényindukált és a sötétben mért jel meredekségének különbségét. Ez az érték megfelelő kalibrálás esetén a minta oxigén fejlesztésének sebességét adja. A növényi minták oxigén fejlesztésének tradicionálisan használt mértékegysége a µmol O₂ mg⁻¹ klorofill h⁻¹, de az oxigéntermelés megadható levélfelületre, levéltömegre, kloroplasztisz, illetve algasejt számra is.

Az oxigén koncentráció változásának mérése során általában különböző állapotú mintákat kell összehasonlítani, ezért relatív összehasonlításra van lehetőség. Ezt a mérés során kapott görbék meredekségének összevetésével lehet megtenni, és ilyen esetekben a készülék kalibrálása elhagyható.

6.4. Függelék

6.4.1 Az elektrolit összetétele: 1 rész telített KCl oldat, 1 rész 0.4 M-os borát puffer (pH 9.0) és 2 rész 1.0 M-os NaHCO₃ oldat, amelynek a pH-ját 1.0 M-os NaCO₃-al kell pH 9-re beállítani. Bemérések: 17.5 g KCl 100 ml desztillált vízben, 1.23 g bórsav 50 ml desztillált vízben NaOH-val pH 9-re beállítva. Az elektrolit oldat tartalmazhat még 1 rész glicerin, vagy etilén-glikolt.

6.4.2 A Hansatech készülék használata során felmerülő problémák, amikor a készülék nem működik:

- elpiszkolódott az elektród. Általában a platina katód szennyeződhet. A felületét alumínium-oxid tartalmú polírpasztával lehet megtisztítani, majd desztillált vízzel lemosni. – tisztítás
- az elektród tér membránnal való lezárása során buborék maradt az elektródok és a membrán között, vagy sérült a membrán. Ezt ellenőrizni akár lupe segítségével is lehet. – újra kell készíteni az elektródot
- az elektródház összeillesztésénél kimaradtak a tömítő gumigyűrűk, vagy ezek sérültek, előregedtek. Az elektródház alsó és középső részének összecsavarása elégtelen, vagy túlzott – pótolni, vagy cserélni a gumigyűrűket, ellenőrizni a lezárást
- nyitva maradtak a kamra belső légtérét lezáró csapok – a mérés alatt zárva kell tartani a csapokat
- nincsenek meg a szükséges elektromos kapcsolatok – ellenőrizni a csatlakozásokat

6.5. Kloroplasztiszok intaktságának mérése K₃[Fe(CN)₆] redukció alapján

A K₃[Fe(CN)₆] (K-ferricianid), mint Hill-oxidáns nem tud átjutni a kloroplasztiszok borító membránján, de elektron donorként reakcióba lép a szabad tilakoid membránok elektrontranszport láncával a következők szerint: $2\text{H}_2\text{O} + 4\text{Fe}^{3+} \rightarrow 4\text{Fe}^{2+} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$.

100% intakt kloroplasztiszt tartalmazó oldat megvilágításakor, K-ferricianid jelenlétében, nem kapunk oxigénfejlődést, míg ozmotikus sokkal szabadabbá tett tilakoidok maximális oxigén termelést mutatnak.

Az izolált kloroplasztiszokat reszuszpendáló pufferben (RS) kell felfuszpendálni úgy, hogy a klorofill tartalmuk kb. 1 mg klorofill ml⁻¹ legyen. A két reakcióelegy azonos összetételű, csupán abban különbözik, hogy a 1-es „intakt”, a 2-es szétört kloroplasztiszokat tartalmaz.

A reszuszpendáló oldat összetétele: 330 mM szorbitol (szaharóz), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 50 mM-os HEPES-KOH (pH 7.6), és esetleg 0.2% BSA. Az oldat pH-ját KOH-val kell beállítani.

1. reakcióelegy és mérés: 1 ml 2 x tömény RS oldat + 0.8 ml bidv + 10 µl K-ferricianid (2 M-os), 10 µl D,L-gliceraldehid (0.5 M-os) + 0.1 ml intakt kloroplasztisz szuszpenzió – sötétben 1 percig kevertetni a mérőküvetében, majd 10 µl NH₄Cl-t (0.5 M-os) hozzáadni – mérés fényen, majd a meredekség leolvasása (V₁)
2. reakcióelegy és mérés: 0.8 ml bidv + 0.1 ml kloroplasztisz szuszpenzió 1 percig keverés (ozmótikus sokk), majd hozzáadjuk a többi komponens az 1-es mérés szerint. A meredekséget leolvasva kapjuk a V₂-t.

A mérés során a D,L-gliceraldehid a CO₂-fixációt gátolja, ezáltal megakadályozva a CO₂-függő O₂ fejlődést intakt kloroplasztiszokban, de nincs hatással a fotoszintetikus elektrontranszport láncra. Az NH₄Cl szétkapcsolóként működik és a K-ferricianid hatását erőteljesen fokozza, mivel kiküszöböli a protongradiens időt igénylő felépülése okozta retardációt, illetve a foszforilációs kontrollt kikapcsolja.

Az izolált kloroplasztiszok intaktságát az alábbiak szerint lehet számolni:

$$(V_2 - V_1)/V_2 \times 100 = \text{intakt plasztisz \%}$$

6.6. Tesztfeladatok

6.6.1 Kloroplasztisz szuszpenzió fotoszintetikus aktivitásának mérése különböző fényintenzitásokon és különböző klorofill koncentrációk mellett.

6.6.2 Különböző növényfajok levelei oxigén evolúciójának mérése változó fényintenzitásokon.

6.6.3 Fotoszintézisgátló herbicid hatásának mérése. Dózis-hatásgörbe felvétele, D_{50} érték meghatározása.

6.6.4 Izolált kloroplasztiszok intaktságának meghatározása $K_3[Fe(CN)_6]$ redukció mérésével

6.7. Irodalom

Walker D. (1990): The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis. Robert Hill Institute, The University of Sheffield

www.dawalker.staff.shef.ac.uk/daw/use.pdf

7. fejezet - A fluoreszcencia indukció felhasználása a fotoszintetikus apparátus működésének vizsgálatában

szerző: Dr. Solti Ádám

7.1. A fotoszintetikus apparátus alapvető működése

A növényi élet legjellemzőbb tulajdonsága a **fotoautotróf metabolizmus**. A fotoautotróf anyagcsere alapja a fény, mint energiaforrás hasznosítása. A fotoautotróf élőlények a fotoszintetikus pigmentjeik segítségével elnyelt fényenergiát a redukált, magas redox potenciálú donor-molekulák (D) oxidálására használják fel, miközben az így nyert redukáló kapacitással alacsony redox potenciálú akceptor-molekulákat (A) redukálnak. A fotoszintézis alapegyenlete a következőképp írható fel:



Magasabbrendű fotoszintetizáló élőlények esetében a redukált donormolekula minden esetben H_2O , míg az elektrontranszportlánc végén a felszabaduló redukáló kapacitást konvertibilis **redukálókapacitás-valuták** (NADPH, redukált glutation, ferredoxin és tioredoxin) tárolják más felépítő anyagcsere-folyamatok számára.

A leveleket elérő látható fény egy része a levél felszíni struktúráin visszaverődik (**reflektálódik**), vagy elnyelődés (**abszorpció**) nélkül áthalad a szöveteken (**transzmittálódik**), így energiája nem hasznosul. A növényi pigmentek egy része nem-fotoszintetikus pigment (pl. antociánok, betalainok), az általuk elnyelt fényenergia szintén nem hasznosul a fotoszintézisben. A **fotoszintetikus pigmentek** által elnyelt gerjesztési energia három fő útra terelődik: egy része (i) **fluoreszcencia**, egy másik hányada (ii) **hő** formájában vesz el, így végső soron a fotoszintetikus pigmentek által elnyelt fény csak egy része hasznosul a (iii) **fotoszintetikus elektrontranszportlánc** meghajtásában.

A fotoszintetikus szöveteken mérhető fluoreszcenciáért legnagyobb mértékben a II. fotokémiai rendszer (PSII) antennái (LHCII), és a PSII emissziója felelős. A PSII reakció centrumban a gerjesztett P_{680} a feofitin-*a* közvetítésével adja le a gerjesztés hatására lazító pályára került elektronját a Q_A kinon akceptornak (**stabil töltésszétválás**). Ha erre nincs lehetőség, mert a Q_A redukált állapotban van, akkor a P_{680} és a vele izoenergetikus antennájának (t.i. a gerjesztett energia visszajuthat a reakció centrumból az antennára) gerjesztett állapota fluoreszcencia vagy hő kibocsátással relaxálódhat, ezért ilyenkor magasabb a fluoreszcencia intenzitása. A Q_A csupán egy elektron felvételére képes, melyet továbbad a másodlagos kinon akceptornak (Q_B), mely a tilakoidmembrán plasztokinon- (PQ-) pooljának egy, a PSII reakciócentrumhoz aktuálisan kötődő PQ-molekulája (PQ), redukálódása után leválik a PSII-ről. A P_{680}^+ leadott elektronját a PSII vízbontó Mn-centrumában éppen oxidálódó vízmolekulák O-atomjáról származó elektronokból, a reakciócentrum protein (D1) egyik tirozin-oldallánca (Y_2) közvetítésével kapja vissza. A vízmolekulák oxidációja során a tilakoidmembrán lumenjében így O_2 molekulák és H^+ -k szabadulnak fel.

7.2. Klorofill-a fluoreszcencia indukció

A fotoszintetikus aktivitás változásának követésére széles körben elterjedt a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciójának (a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének hatására változó fluoreszcencia intenzitás) mérésén alapuló módszer. Kautsky és Hirsch (1931) fedezte fel, hogy a fluoreszcens jel és a fotoszintetikus elektrontranszportlánc állapota közt szoros összefüggés van, melynek alapja az alábbi egyenlettel felírható törvényszerűség:

$$E_{\text{abszorbeált}} = E_{\text{fotoszintézis}} + E_{\text{hő}} + E_{\text{fluoreszcencia}}$$

Mivel a fotoszintetikus elektrontranszportlánc meghajtására fordított gerjesztési energia mennyisége közvetlenül nem mérhető, mértékére a fluoreszcencia-hozam segítségével tudunk következtetni. A klorofill-*a* fluoreszcencia

indukció használatát nagyban elősegíti, hogy a vizsgált növény roncsolása nélkül is alkalmas a stressz-válaszok nyomon követésére. Butler (1978) modellje szerint a reakciócentrumként funkcionáló P_{680} klorofill-a dimert gerjesztve (P_{680}^*) a dimer kétféleképpen adhatja le a gerjesztési energiáját: a PSII kinon akceptorára (Q_A) történő elektronátadás esetén nem történik fluoreszcencia kibocsátás: ezt a jelenséget fotokémiai kioltásnak nevezi a szakirodalom (bár szorosan vett értelemben itt nem kioltásról, hanem a fényenergiának a fotoszintézisben történő hasznosulásáról van szó). Amennyiben az elektrontátadás valamilyen okból gátolt, az alapállapotba való visszatérés nagyobb hatékonyságú fluoreszcencia kibocsátással párosul. Azokat a PSII reakciócentrumokat, amelyek Q_A akceptora oxidált állapotban van, **nyitott reakciócentrumoknak** nevezzük, míg a Q_A redukálódása esetén **zárt** állapotról beszélhetünk. A PSII reakciócentrumok működési hatékonysága és állapota tehát erőteljesen befolyásolja a mérhető aktuális fluoreszcencia-hozamot (F). A levelek fluoreszcencia emissziója a következőképpen definiálható:

$$F = I \cdot A_{\text{levél}} \cdot FR_{\text{PSII}} \cdot \Phi_F$$

ahol I a levelet érő fény intenzitása (**fotoszintetikusan aktív foton fluxus denzitás, PPF**), $A_{\text{levél}}$ a fotoszintetikus pigmentek fényelnyelésének mértékét jellemző hányados, FR_{PSII} a fotoszintetikus apparátus abszorpciójából a PSII részesedése és Φ_F a fluoreszcencia kvantumhozama. A fluoreszcencia kvantumhozamát a Φ_F hányadossal definiálhatjuk (kibocsátott fluoreszcens fotonok száma/elnyelt fotonok száma). A Φ_F hányados felírható a gerjesztett állapotból az alapállapotba való visszatéréshez vezető különböző reakcióutak sebességi állandóinak segítségével is:

$$\Phi_F = k_F / (k_F + k_H + k_P)$$

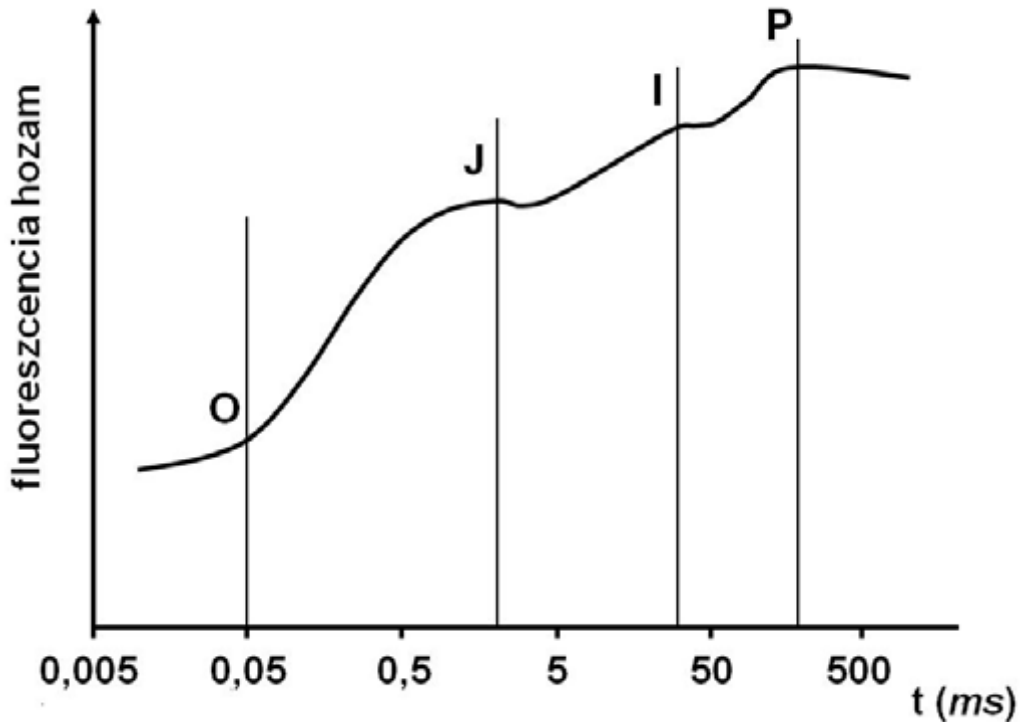
ahol k_F , k_H és k_P a fluoreszcencia, hőkibocsátás és fotokémiai kioltás sebességét jellemző állandó, P pedig az aktuálisan nyitott PSII reakció centrumok arányát jelöli.

Néhány percig sötétben tartott levelekben a PSII reakciócentrumok elektron-akceptorai oxidálódnak, azaz fokozatosan mind **nyitott** állapotba kerülnek ($P=1$). A sötétadaptált leveleket **kis intenzitású, modulált fényel (PPFD ~ 0,1 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$)** megvilágítva a megvilágítás kezdetétől számított 30-40 μs időskálán a fluoreszcencia hozam egy lokális maximumot ér el, ezt F_0 értéknek (alap fluoreszcencia, **O-pont**) nevezzük. (Sokszor tévesen F_0 értéként találkozhatunk az alap fluoreszcenciával, amely jelölés azonban téves, az eredeti elnevezés ugyanis az oligomicin-érzékeny fluoreszcenciából [F_0] származik.) Az alap fluoreszcenciáért főként az antennakomplexek fluoreszcens emissziója felelős. Mivel nyitott állapotban $P=1$, a fluoreszcencia hozam

$$\Phi_F = k_F / (k_F + k_H + k_P)$$

Az F_0 fluoreszcencia kialakulása után a leveleket telítési fényel megvilágítva (PPFD ~ 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) jellegzetes lefutású fluoreszcenciahozam-változásokat mérhetünk. A fluoreszcencia hozam (7.1. ábra) meredeken emelkedni kezd (a reakciócentrumok záródnak), majd a megvilágítás kezdetétől számított 2-3 ms-ot követően lokális telítést mutat (**J-pont**), amely telítés egyik fő oka a P_{680}^+ és a Q_A^- közötti stabil töltés-szeparáció. A fluoreszcencia hozam további emelkedésének letörésében **a vízbontó centrumtól származó elektronok megjelenésének van szerepe (I-pont)**, a megvilágítás kezdetétől számított 60-70 ms időintervallumban. Végül a fluoreszcencia hozam időgörbéje egy utolsó telítést is mutat 110-120 ms időben (**P-pont, F_p**). Ha a folytonos megvilágítás lelíti a PSII elektrontranszportot (a reakció centrumok **zárt** állapotba kerülnek), maximális fluoreszcenciáról (F_m) beszélünk. A fluoreszcencia hozam emelkedését a Q_A és a Q_B kinon akceptor között meginduló elektrontranszport töri. P-pontban a zárt reakciócentrumok fluoreszcencia hozama:

$$\Phi_F = k_F / (k_F + k_H)$$



7.1. ábra. Sötétadaptált levelek megvilágítás hatására kibocsátott fluoreszcencia hozam emelkedése. A jellegzetes lefutású hozam emelkedés lokális telítési pontokon halad keresztül. A fluoreszcencia hozam emelkedésének letöréséért a II. fotokémiai rendszer működési állapotai tehetők felelőssé (részletes magyarázatot ld. a szövegben).

A fluoreszcencia hozam emelkedését befolyásolja továbbá a PQ-pool heterogenitása, az inaktív PSII reakció centrumok mennyisége, a vízbontó rendszer állapota, és a membrán potenciál is.

A sötétadaptált levelek klorofill-*a* fluoreszcencia indukciójának gyors szakaszában meghatározható az F_0 , F_m értéke. E kettő érték különbsége az ún. változó fluoreszcencia, F_v (7.2. ábra). A változó és a maximális fluoreszcencia aránya megmutatja a PSII reakciócentrumok **maximális kvantumhatékonyságát** (a PSII-ben lezajló fényenergia-átalakítás elméleti legnagyobb hatásfoka, k_p):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m = k_p/(k_F + k_H + k_P)$$

ahol $k_F + k_H + k_P$ arányos a megvilágítás intenzitásával, hiszen a mérés során I , $A_{levél}$ és FR_{PSII} nem változnak. Ha a levelek sötétadaptációja nem volt megfelelő hosszúságú, a Q_A -pool nem tudja elérni a maximális oxidált állapotát, így a mérés során alulbecsüljük a maximális kvantumhatékonyságot (túlbecsüljük az F_0 értékét). Ennek elkerülésére a mérés előtt egy rövid, távoli vörös (>700 nm) megvilágítást kell alkalmazni, amely elsősorban a PSI-et gerjeszti, ezáltal mintegy 'megtisztítja' a fotoszintetikus elektrontranszportláncot az akceptor-oldalról és eltávolítja az elektronokat a Q_A akceptorról. Néhány magasabb rendű növény levelében és algákban jelentős redukált Q_A -felhalmozódás mérhető a klororespirációból származó plasztokinon-redukció miatt, mely sötétben is működő folyamat. Stressz körülmények, mint a vasháztartás zavara mellett szintén a PQ-pool részleges redukáltsága figyelhető meg, ezért az F_v/F_m meghatározása előtt a redukáltságot csökkentő távoli vörös megvilágítást kell alkalmazni, az érték alábecslésének elkerülésére.

Sötétadaptált leveleket megvilágítva a t időpillanatban mért **aktuális fluoreszcenciahozam** (F_t) ~ 1 s alatt eléri a **maximális hozam** értékét (F_m), majd fokozatosan csökken (7.2. ábra). A fényadaptáció nagyjából első egy percében jelennek meg az S és M tranziensek (lokális minimum és maximum a fluoreszcencia hozamban). E tranziensek eredete kevésbé feltárt, leggyakrabban az oxigénevolúció stabil beindulásával, a fénygyűjtő komplexek a két fotorendszer közötti megoszlásának változásával (state 1-state 2 átmenet) és a CO_2 -megkötés beindulásával (redukált koenzimek oxidálása) hozzák összefüggésbe. Tartós megvilágítás hatására a fotoszintetikus apparátus adaptálódik az adott megvilágításhoz (fényadaptált állapot). Fényadaptált állapotban a fluoreszcencia hozam stabilizálódik, **steady-state** értéket vesz fel (F_s). A fényadaptált állapothoz tartozó alap fluoreszcencia (F_0') az aktinikus

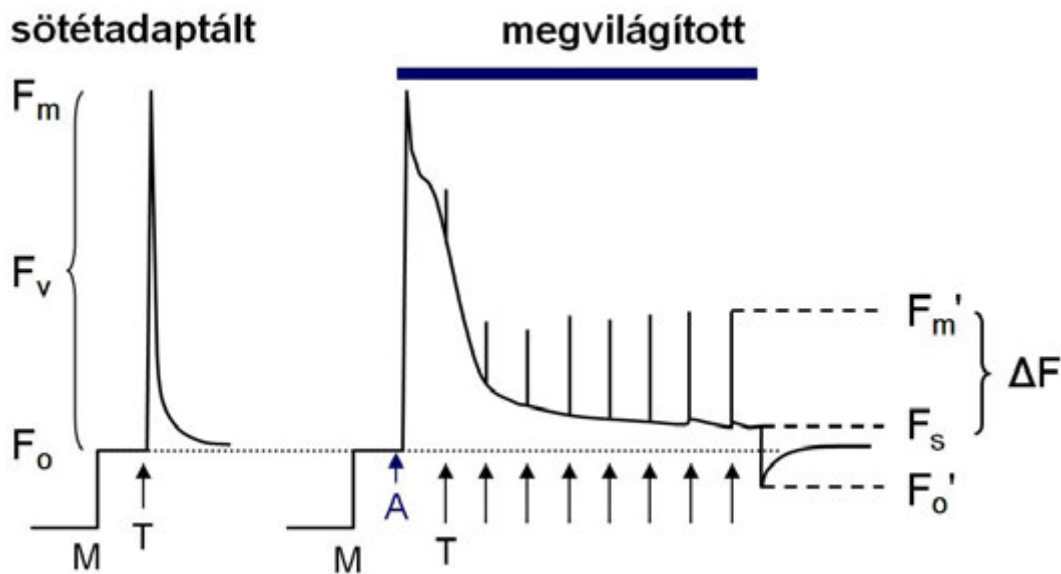
megvilágítás néhány másodperces szüneteltetése, valamint távoli vörös megvilágítás alkalmazása után mérhető. A steady-state állapot a gyakorlatban úgy határozható meg, hogy egymástól 50-100 s időkülönbséggel adott telítési fényfelvillanás által kiváltott fluoreszcencia-maximum (F_m') értékek azonosak (úgy, hogy közben az F_t értéke sem változik). A fényadaptált állapotban a maximális fluoreszcencia (F_m') alacsonyabb, mint a sötétadaptált állapotban mérhető F_m ($F_m' \leq F_m$). Az F_m' és a F_s értékek segítségével számítható a fényadaptált reakciócentrumok működésének hatékonyságát jellemző **aktuális kvantumhatékonyság** ($\Delta F/F_m'$):

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$$

A fotoszintetikus elektrontranszport lánc működését az **ETR** (electron transport rate) paraméter számításával jellemezhetjük:

$$ETR = \Delta F/F_m' * PPF * FR_{PSII} * A_\lambda$$

ahol PPF a levelet érő fotoszintetikusan aktív besugárzás, FR_{PSII} a PSII-n abszorbeálódó fotonok részesedése a teljes abszorbeált fény mennyiségéből (ha $PSI \sim PSII$, akkor $FR_{PSII} = 0,5$) és A_λ a levél abszorpciós koefficiense (C_3 levelek esetében $\sim 0,84$).



7.2. ábra. Sötétadaptált és megvilágított levélről pulzus amplitúdó modulált (PAM) fluorométerrel regisztrálható klorofill fluoreszcencia változások. M: mérőfény, A: aktinikus megvilágítás, T: telítési felvillanás. A sötétadaptált mintát modulált mérőfényvel megvilágítva F_o fluoreszcenciát, telítési felvillanás hatására az F_m fluoreszcenciát regisztrálhatjuk, e kettő különbsége a változó fluoreszcencia (F_v). Sötétadaptált levelet aktinikus fényvel megvilágítva kezdetben jelentősen nő, de 1-2 s után csökken a fluoreszcencia intenzitása, és a beinduló fotoszintetikus elektrontranszport következtében fokozatosan eléri az egyensúlyi értéket (F_s). Az egyensúlyi állapotban mérhető minimális és maximális fluoreszcencia hozamok az F_o' és az F_m' értékek. Az F_s és az F_m' hozamok különbsége a fényadaptált állapot változó fluoreszcenciája (ΔF).

A fényadaptált állapot változó fluoreszcenciája valójában: $F_v' = F_m' - F_o'$. ΔF -et nem szokták így jellemezni.

7.2.1. A nem-fotokémiai kioltás (NPQ)

A sötétadaptált állapothoz képest a maximális fluoreszcencia hozamot különböző eredetű **energiavesztések** csökkentik: ez az energiamennyiség elvész a fotoszintetikus elektrontranszportlánc, különösen a PSII meghajtása szempontjából. A jelenségeket összefoglaló néven a **nem-fotokémiai kioltásként (NPQ)** ismert folyamatok közé sorolják. Fényfelesleg esetén, ha az abszorbeált fotonok száma nagyobb a fotoszintetikusan felhasználható fotonok számánál, egyes klorofill-protein komplexek a felesleges fény nem-fotokémiai disszipációjában is részt vehetnek. Az NPQ típusai között legjelentősebb a ΔpH -függő kioltás (**qE**), mely gyorsan kialakuló (20-60 s) és relaxálódó folyamat. Az elektrontranszportlánc működése során keletkező, és ATP-szintézisre nem használódó proton-gradiens

hatására a tilakoid lumen savasodik, amely kiváltja a **violaxantin de-epoxidáz (VDE)**, illetve a **PsbS protein** protonálódását. A protonálódott VDE aktívvá válik, és a pigment-protein komplexeken és a PsbS-en kötött violaxantin-molekulákat két lépésben, **anteraxantin** köztes állapoton keresztül, **zeaxantinná** de-epoxidálja. Csökkenő lumen savasság hatására a VDE inaktívulódik, és a zeaxantin epoxidáz működése lassan violaxantinná alakítja a xantofill-pool nagy részét (**xantofill-ciklus**). A violaxantin gerjesztési energiája magasabb a klorofilok gerjesztési energiájánál ezért energiát képes számukra átadni, fénygyűjtő funkciót lát el. A de-epoxidáció miatt több telítetlen kötéssel rendelkező zeaxantin viszont gerjesztési energiát képes átvenni a klorofiloktól, amely hő formájában emittálódik. A xanthofilok oxidáltsági állapotának változása befolyásolja az LHCII antennák szerveződését és aggregáltságát, amely folyamatok szintén hozzájárulnak a termikus energiakibocsátás növekedéséhez. A PsbS protein protonálódva konformációt vált, és antennakomplexekhez kapcsolódva, maga köré gyűjtve a PSII antennarendszerének egy részét, kioltó centrummá alakul.

Változó kis fényintenzitás mellett nagy jelentősége van a mobilis LHCII antennák PSII illetve PSI reakciócentrumokhoz való kapcsolódásának is, melyet **state 1 – state 2 átmenetnek** nevezünk. Szerepe a gerjesztési energia két fotorendszer közötti megosztásának szabályozása. PSII fényfelesleg esetén az LHCII komplexek 30%-a foszforilálódhat az **LHCII kináz** segítségével, amit a PQ-pool redukált állapota (a PSII túlműködése) aktivál. A foszforilált LHCII a PSII-ről leválva monomerizálódik és a PSI-hez kapcsolódva az elnyelt energiát a kevésbé fluoreszkáló PSI-re továbbítja (state 2), ezáltal a PSII fluoreszcenciájának csökkenését (**qT**) eredményezi. A PSII fényhiánya esetén a foszforilált LHCII az oxidált PQ által aktivált LHCII foszfatáz katalizálta reakcióban defoszforilálódik, így visszaköthet a PSII-re (state 1). E folyamaton keresztül a PQ-pool redoxállapota szabályozhatja a fényenergia megosztását a két fotokémiai rendszer között. Gátolt lineáris elektrontranszport (LET) esetén emellett növeli a ciklikus elektrontranszport (CET) aktivitását. A qT közepes időtávon (5-10 perc alatt) relaxálódó kioltás.

Míg a qE és a qT viszonylag gyors és reverzibilis folyamatok, az NPQ egy másik, PSII inhibícióval összefüggő típusa (**qI**) lassan alakul ki, és gyakran irreverzibilis. A magas fényintenzitás határára kialakuló **fotoinhibíció** mellett a PSII működése számos más stresszhatás eredményeképpen is gátlódhat (**PSII inhibíció** szárazság, hideg, tápelem-hiányok és toxikus anyagok hatására), amikor gátolt reakciócentrumok tartós gerjesztése károsodásokat eredményez alacsony fényintenzitáson is. A reakciócentrumot felépítő D1 protein oxidatív károsodásai gátolják az elektrontranszportot. Az inaktív PSII reakciócentrumok kioltó centrumokként működhetnek, amelyek gerjesztett állapota hő kibocsátással relaxálódik. Az NPQ legáltalánosabban az

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

egyenletből számítható. Az egyes kioltási típusok részesedésének meghatározása az NPQ egészéből a gyakorlatban azonban nem egyszerű feladat. A qE legegyszerűbben a Stern-Volmer egyenletből számítható:

$$qE = (F_o - F_o') / F_o$$

Az alap fluoreszcencia meghatározásának nehézsége (ld. Hibalehetőségek) miatt azonban a legtöbb esetben nem nyújt pontos eredményt.

Az egyes kioltási típusok részesedésének méréséhez felhasználható a relaxációjukban mérhető időbeli eltérés. A fényadaptált levelet sötétbe helyezve és meghatározott idő elteltével (30 s, 5 min, 20 min) telítési felvillanásokkal megvilágítva egyre növekedő maximális fluoreszcencia értékek (F_m'') mérhetők. Az $F_m''_{30''}$, $F_m''_{5'}$ és $F_m''_{20'}$ értékek összefüggésbe hozhatók a qE, qT és qI kioltások relaxációjával:

$$qE = (F_m''_{5'} - F_m') / (F_m - F_o) \cdot (*)$$

$$qT = ([F_m - F_m''_{5'}] - [F_m - F_m''_{20'}]) / (F_m - F_o) \cdot (*)$$

$$qI = (F_m - F_m''_{20'}) / (F_m - F_o)$$

A gyorsan relaxálódó NPQ folyamatok (qE, qT) azonban erős időbeli átfedést mutatnak, ezért gyakran a qE meghatározásának pillanatában a qT jelentős része is relaxálódik, így elkülönítésük hibával terhelt.

A PSII inaktiváció és az energizáltság-függő kioltás részesedésének számítására Hendrickson modell adja a legjobb eredményt. A modell a teljes elnyelt gerjesztési energia megosztását adja meg:

$$\Sigma E_{exc} = \Phi_{PSII} + \Phi_{NF} + \Phi_{NPQ} + \Phi_{f,D} = 1$$

ahol ΣE_{exc} a teljes abszorbeált kvantumhozam, Φ_{PSII} a fotokémiai kioltás, Φ_{FD} a fluoreszcencia mértéke, Φ_{NPQ} az antennafüggő folyamatok kioltása és Φ_{NF} a PSII inaktivációból eredő kioltás. A gerjesztési energia megoszlásának számításához a modell használ egy kvázi inaktivációt nem szenvedett fotoszintetikus apparátus sötétadaptált maximális (F_{mM}) és variábilis fluoreszcenciáját (F_{vM}), a kapott eredmények ezért az adott növényre és állapotra jellemző relatív értékek. Az elnyelt fényenergia megoszlása a különböző folyamatok között a következő egyenletek szerint alakul:

$$\Phi_{PSII} = \left(1 - \frac{F_s}{F_m'}\right) * \left(\frac{F_v/F_m}{F_{vM}/F_{mM}}\right),$$

$$\Phi_{NPQ} = \left(\frac{F_s}{F_m'} - \frac{F_s}{F_m}\right) * \left(\frac{F_v/F_m}{F_{vM}/F_{mM}}\right),$$

$$\Phi_{FD} = \left(\frac{F_s}{F_m}\right) * \left(\frac{F_v/F_m}{F_{vM}/F_{mM}}\right),$$

$$\Phi_{NF} = 1 - \left(\frac{F_v/F_m}{F_{vM}/F_{mM}}\right).$$

7.2.2. Hibalehetőségek a mérésben

A steady-state állapot jellemzésekor több hiba is felmerülhet. Amíg a PSII fluoreszcenciája indukálható, addig a **PSI fluoreszcenciája** stabilnak tekinthető (az alap fluoreszcenciában jelentkezik), és jellemzően csak a 700 nm feletti hullámhossztartományban jelentkezik. 700 nm fölött a PSI fluoreszcenciája C_3 és C_4 növények esetében 30 és 50%-ban járul hozzá az F_o' értékéhez. Következésképpen a PSI fluoreszcenciájának nagyobb mértékű megjelenése a fényadaptált állapotra jellemző fluoreszcencia-paraméterekben (F_s , F_m') az aktuális kvantumhatékonyság alulbecslését eredményezik. A pusztán alacsonyabb hullámhosszú (680-700 nm) fluoreszcencia emisszió mérése a levél szöveteinek **reabszorpciója** miatt okoz téves eredményt. A túl hosszú idejű telítési felvillanás alkalmazása szintén negatív hatású a mérésre: a hosszú telítési megvilágítás nem csak a Q_A , de a PQ-pool redukcióját is eredményezi. Mivel a PQ szintén kioltó hatású, a redukálódása az F_m' túlbecsülését okozza, amely akár a 20%-ot is elérheti. A steady-state állapotot nagymértékben befolyásolja a LET állapota. C_4 növényekben, illetve alacsony légköri O_2 koncentráció mellett C_3 növényekben is a LET által termelt NADPH és ATP fő felhasználója a CO_2 -megkötés. Hatékonyságának (Φ_{CO_2}) bármilyen eredetű csökkenése gátolja a LET működését, így alábecsüljük a $\Delta F/F_m'$ értékét. Az F_o' meghatározása is sokszor hibával terhelt lehet, mert a steady-state állapotban a Q_A -pool nem oxidálható minden esetben egy rövid távoli vörös megvilágítással. Ilyen esetekben az F_o' értéke a következő egyenletből számítható:

$$F_o' = F_o / [(F_v/F_m) + (F_o/F_m)']$$

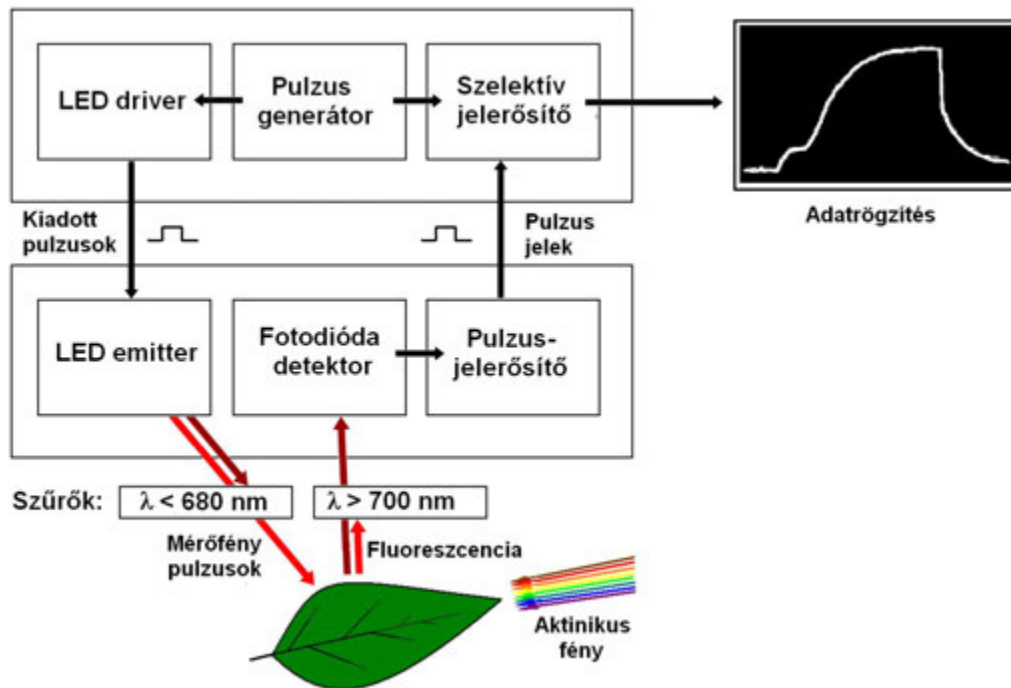
feltéve, hogy a minta fotoinhibíciója relaxálódott a sötétadaptálás során, ld. qI.

7.3. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése pulzus amplitúdó modulációs (PAM) fluorométerrel

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc meghajtásához a fotoszintetizáló szöveteket megvilágításnak kell kitennünk. A fotoszintetikus apparátus a gerjesztő fény egy részét, mint láttuk, fluoreszcencia formájában emittálja, azonban az aktinikus fény nagy intenzitása mellett a gyenge fluoreszcens emissziót nehéz közvetlenül mérni. Amennyiben

az aktinikus fény spektruma átfed a fluoreszcens fénnyel, a mérés gyakorlatilag lehetetlenné válik. Erre a problémára, tehát az aktinikus megvilágítás mellett az indukált fluoreszcencia mérését lehetővé tevő készülékek nagyjából harminc éve állnak rendelkezésünkre. A **pulzus amplitúdó moduláció (PAM)** elvén dolgozó fluorométerek az 1980-as évek közepén kerültek először forgalomba. Előnyük a közvetlen fluoreszcencia emissziót mérő klorofill-a fluorométerekkel szemben az, hogy a mérés nemcsak sötétített kamrában, hanem bármilyen megvilágítás mellett is elvégezhető. A klorofill-*a* alap fluoreszcenciát egy extrém alacsony intenzitású **mérőfény** indukálja, míg a fotoszintetikus elektrontranszportláncot egy konstans intenzitású **aktinikus** fény hajtja meg. Ez utóbbi szintén indukál egy, az előzőnél erősebb állandó klorofill-a fluoreszcenciát, de ezt a fázis-érzékeny detektálás eltünteti a jelből.

A PAM fluorométerek (7.3. ábra) működésének alapja, hogy olyan változtatható nagy frekvenciájú (1,6 kHz, a pulzusok gyakorisága: μs időskála), kis intenzitású ($0,05 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a mérőfény kvázi nem vált ki fotokémiai reakciót, csak fluoreszcenciát), gyors felütésű és lecsengésű vörös ($\lambda \leq 680 \text{ nm}$) **mérőfény** felvillanásokkal dolgozik, amelyek elhanyagolható mértékben növelik a fluoreszcencia-hozamot. A kiváltott, szintén μs időskálájú fluoreszcencia pulzusok a száloptikán keresztül először egy szűrőhöz jutnak, amely csak a $\lambda \geq 700 \text{ nm}$ fotonokat engedi át. A fluoreszcens jelet egy nagy érzékenységu és széles tartományban (10^9) lineáris fotodióda detektor érzékeli. A digitális jel ezt követően egy pulzus-jelerősítőbe kerül, amely AC-kapcsolt, így lehetővé teszi a háttérből származó jelek szűrését. A jel sokszorozását egy szelektív erősítő végzi, amely a gerjesztő pulzus és a pulzus után néhány μs -mal mérhető fluoreszcens jel közötti különbséget erősíti fel. Ezt a különbség jelet csak nagyon gyors változások befolyásolhatnák, így kvázi konstansnak tekinthetjük.



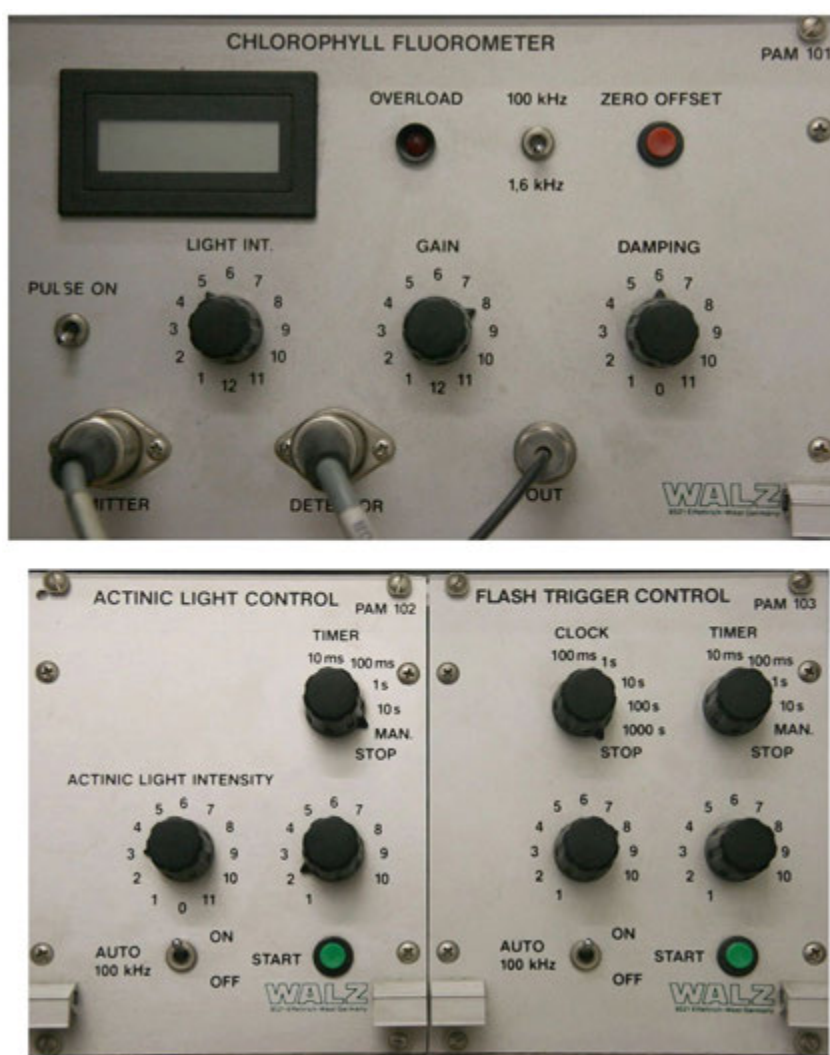
7.3. ábra. A PAM elven működő klorofill-*a* fluorométerek működési elvének vázlatos rajza. A műszer által generált nagy frekvenciájú gerjesztő fényimpulzusok ugyanilyen frekvenciával kis fluoreszcenciaintenzitás-növekedést okoznak. A fluoreszcencia hozam meghatározásához a szelektív erősítő a mérőfény-pulzusok által kiváltott fluoreszcens jelet erősíti fel.

A **telítési fényimpulzusok** szinkronizálása a mérőfényvel úgy történik, hogy a telítési felvillanás kezdete a mérőfény-pulzusok közötti 'ablak' közepére essen, amely kívül esik a pulzus utáni néhány μs -os mintavételezéstől. A mérőfény pulzusainak frekvenciája növelhető, amely lehetővé teszi az indukció és a relaxáció gyors kinetikájának mérését is. A mérésben el kell különíteni a *hozam* (yield) és az *intenzitás* (intensity) fogalmakat. A mérőfény modulált jele segítségével a *hozam* határozható meg, míg például az folytonos aktinikus, vagy telítési fény nem-modulált *intenzitás*emelő hatását szűri az erősítő. A rendszer lehetővé teszi így a klorofill-*a* fluoreszcencia mérését mind folytonos megvilágítás (pl. napfény), mind pedig a szűrőn szabadon átjutni képes távoli vörös háttér mellett. A mérőfény gyors fel- és leütésű pulzusait lézer-emissziós diódák (LED) biztosítják. A műszer felépítése

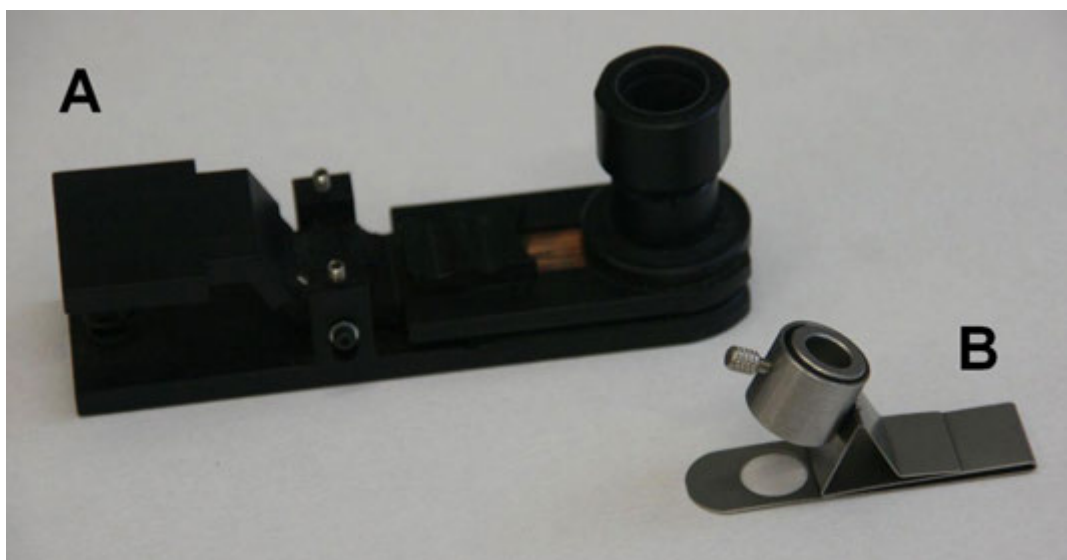
szempontjából fontos, hogy minden fény (mérőfény, aktinikus fény, telítési pulzus, távoli vörös háttér) saját száloptikán keresztül éri el a mintát, ami a száloptika hatékonysága miatt fontos. A fluoreszcens jelet fotodiódák detektálják, melyekben a fotonokszorozókhoz (photomultiplier) képest az emelkedő fényintenzitással párhuzamosan nem növekszik a zaj mértéke. A digitálissá konvertált jelet számítógéppel regisztráljuk

7.3.1. Mérés PAM fluorométerrel

A gyakorlaton PAM 101-102-103 klorofill-*a* fluorométert (7.4. ábra) használunk. A műszer bekapcsolása előtt ne felejtjük el elindítani a számítógépet és a regisztráló nyomtatót, és bekapcsolni a telítési fényimpulzusokat szolgáltató lámpát (KL-1500)! A fluoreszcens jeleket a DA-100\DA-100.exe program regisztrálja. A műszer bekapcsolása után a fluoreszcencia hozamot a 'Zero offset' gomb nyomásával alapértékre kell állítani! A maximális kvantumhasznosítás meghatározásához 15-30 percig sötétadaptálni kell a mintákat (leveleket). A leveleket speciális csipeszekkel rögzíthetjük a mérőfényt és a fluoreszcens jelet közvetítő kevert szálú száloptika végződésére (7.5. ábra). A mérőprogram numerikus üzemmódjában (N) beállíthatók a telítési fényimpulzusok időegységei, és a telítési felvillanások gyakorisága.



7.4. ábra. A PAM 101-102-103 chlorophyll fluorometer kezelőfelülete. A fluorométert bekapcsolása után a Zero offset gombbal alapvonalazhatjuk. Mérés előtt ne felejtjük el a mérőfény-impulzusokat elindítani a Pulse on kapcsolóval! A 101 egységen található kapcsolókkal (Light intensity, Gain és Damping) a mérőfény-impulzusok tulajdonságai változtathatók. A 102 egység az aktinikus fény tulajdonságait szabályozza – külső fényforrás (KL-1500) használata esetén a fényintenzitás a külső fényforrás saját szabályozóival állítható be, ilyenkor a Timer kapcsolót Manual (Man.) állásban hagyjuk. Mérés indításakor a zöld 'Start' gombot kell megnyomnunk, a leállításakor pedig a Timer-t állítjuk Stop állásba. A 103 alegység a telítési fényimpulzusok vezérlését végzi.



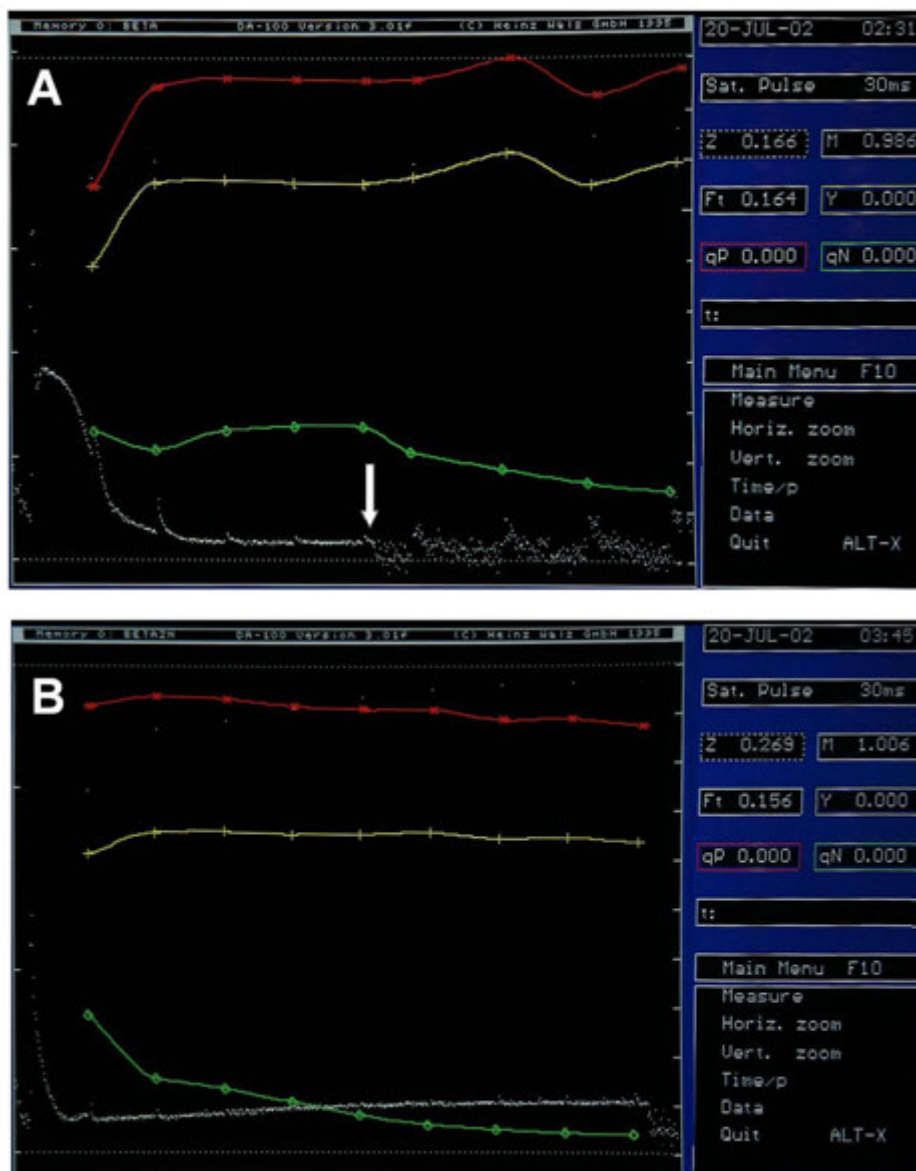
7.5. ábra. Száloptikára rögzíthető zárt (A) és nyitott (B) levélcspeszek. Zárt levélcspesz segítségével a levelek sötét- és fényadaptációja is elvégezhető, míg nyitott levélcspesszel a fényadaptált levelek gyors mérését lehet kivitelezni.

7.3.1.1 Az elméleti maximális kvantumhasznosítás mérése

A mintát a hordozó/adapter segítségével a száloptika végére erősítjük, úgy, hogy a száloptika felülete közvetlenül a minta felszínére illeszkedjen. Ellenőrizzük, hogy a mérőpulzus kapcsoló bekapcsolt állapotban (On) áll-e. A műszer különálló hullámhossz-váltóját állítsuk távoli vörös (H) állásba, és világítsuk meg a mintát 3-4 s ideig távoli vörös fényvel, majd váltsunk újra vörös (R) állásba. A rövid távoli vörös megvilágítással érhetjük el a Q_A akceptorok maximális oxidált állapotát (nyitott reakciócentrumok). A számítógép M billentyűparancsával indítjuk a telítési fényimpulzust. A telítési F görbe megjelenik a számítógép monitorán. A görbe lefutásában ellenőrizzük, hogy elérte-e a teljes telítést, valamint hogy $F_m \leq 5 \times F_o$! Stressz körülmények között a variábilis fluoreszcencia értékének csökkenése természetes folyamat. Az értékek az Enter parancsral fogadhatóak el. Számoljuk ki a minta maximális kvantumhasznosításának mértékét!

7.3.1.2 A tényleges (fényadaptált) kvantumhasznosítás mérése

Indítsuk el a mérőprogramot a számítógép F10→measure→numeric parancsával. A nyomtató regisztrálja a maximális kvantumhasznosítás korábban mért értékeit. Ellenőrizzük, hogy az 'Actinic light control' panel (102) időkapcsolója (Timer) kézi vezérlésben (Manual) áll-e. Az aktinikus fényt kapcsoljuk be a kontroll panel Start gombjával és az aktinikus megvilágítást szolgáló KL-1500 fényforrás kapcsolójának egyidejű elfordításával. A fényadaptáció során telítési pulzusok az impulse (Y) parancsral adhatók manuális üzemmódban. A szoftver maximum 15 percig tud folyamatosan adatokat gyűjteni (30 ms adatmentési frekvencia mellett), ha ennél több időre van szükség a fényadaptációhoz, Esc parancsral leállíthatjuk a mérést, majd újra elkezdhetjük, ellenkező esetben 15 min után az adataink felülíródnak az adatfájl korlátozott mérete miatt. Ha az F_m' értéke 100 s-on belül nem mutat változást, beállt a steady-state állapot (7.6. ábra). Az F_o' meghatározása a PAM 101-102-103 fluorométerrel csak manuálisan lehetséges, a program nem regisztrálja az értéket. Méréséhez kapcsoljuk le az aktinikus megvilágítást (KL-1500 fényforrás), és ezzel párhuzamosan váltsunk át távoli vörös lámpára. 3 s idő múlva a Timer-t kapcsoljuk ki (Stop), és a program F_t ablakából olvassuk le az F_o' értékét (~5 s belül mért legalacsonyabb érték). Számítsuk ki az aktuális kvantumhasznosítás ($\Delta F/F_m'$) és az NPQ értékét! Inhibíciót nem szenvedett ('kontroll') minta maximális kvantumhasznosítási adatait felhasználva számítsuk ki a gerjesztési energia megoszlását a különböző folyamatok között!



7.6. ábra. Kiegyensúlyozott tápanyag-ellátású (A) és cink-mérgezésben szenvedő növény (B) sötétadaptált leveleiről, fényadaptáció alatt regisztrált fluoreszcenciahozam-változások. Mindkét regisztrátum az aktinikus fény felkapcsolásával indul, amely kezdetben magas fluoreszcenciahozamot indukál, a fotoszintetikus elektrontranszportlánc beindulásával párhuzamosan azonban a fluoreszcenciahozam fokozatosan eléri a steady-state állapotra jellemző értéket. A fényadaptáció során 100 s-onként kapott a levél telítési fényfelvillanásokat, melyek a maximális fluoreszcencia hozam (F_m) értékénél kisebb fluoreszcenciahozam-megemelkedéseket és -lecsengéseket eredményeztek. A regisztrátumokon piros színnel a fotokémiai kioltás (qP), sárga színnel a hozam (Y), zöld színnel pedig a nem-fotokémiai kioltás (qN) program által számolt értékei jelennek meg. A cink-mérgezett növénynel szemben a kiegyensúlyozott tápanyag-ellátású növény levelei hamarabb adaptálódtak az aktinikus megvilágításhoz. Az (A) ábrarészen a nyíllal jelöl pontban a fényadaptált levél újra sötétbe került, a 100 s-onként tovább alkalmazott telítési felvillanások egyre lassabb lecsengései a sötétadaptáció megindulását jelzik.

7.3.1.3 Nem-fotokémiai kioltás komponenseinek meghatározása

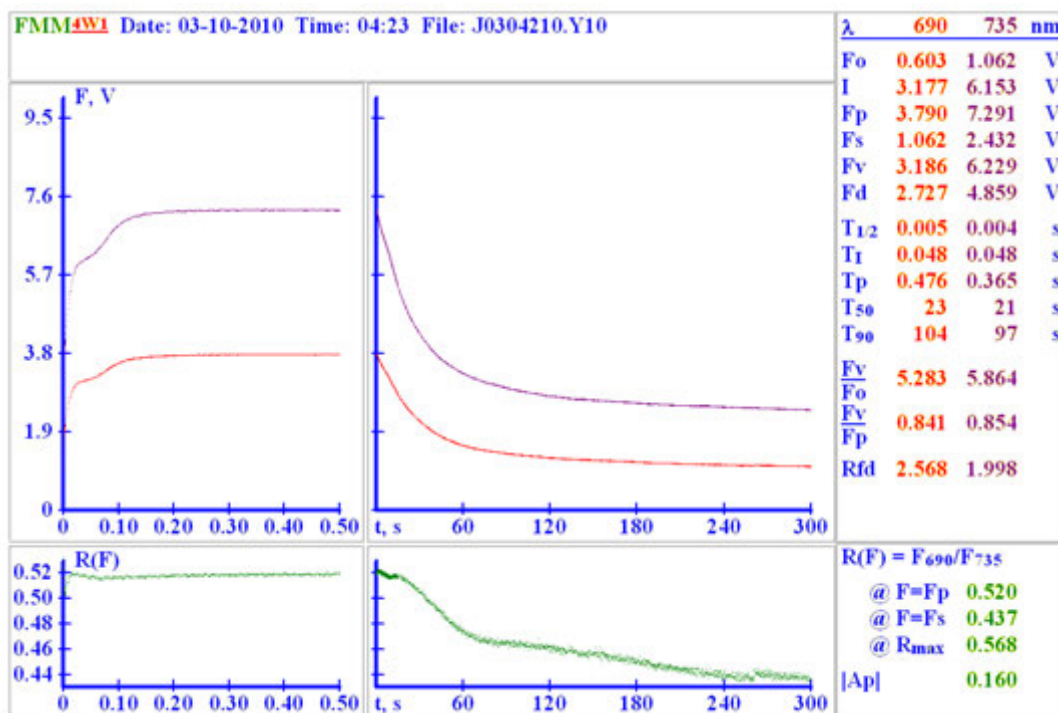
Kapcsoljuk ki a távoli vörös megvilágítást, és állítsuk a Timer-t Manual állásba, majd adjunk a mintának 30 s múlva telítési fényimpulzust az impulse paranccsal. Folytassuk az impulzusokat 100 s időközönként, amíg az F_m értékek stabilizálódnak. Számoljuk ki a qE és qT kioltások részeseződését az NPQ-ból!

7.4. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése diszkrét hullámhosszokon mérő fluorométerrel (FMM)

A PAM fluorométerek előnye, hogy háttérvilágítás mellett is képesek a fluoreszcenciahozamot mérni. Hátrányuk azonban, hogy a $\lambda \geq 700$ nm emissziós szűrő jelentős mennyiségű PSI fluoreszcenciát engedhet át, amely különösen C_4 növények esetében az aktuális kvantumhasznosítás alulbecslését eredményezheti (ld. [Hibalehetőségek](#)). Az FMM fluorométer fényforrása egy $\lambda = 635$ nm lézerdíóda ($500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ maximális emissziós teljesítmény). A két csatornás detektálás lehetővé teszi a klasszikus **Kautsky indukciós kinetika** mérését az emissziós spektrum két maximumán (vörös: $\lambda = 690$ nm és távoli vörös: $\lambda = 735$ nm). A monokrómdetektálást a diszkrét hullámhosszokon interferencia- és vágószűrők segítségével lehet elérni. Mivel FMM fluorométer esetén a fluoreszcencia indukcióját és a fotoszintetikus elektrontranszportlánc meghajtását is a gerjesztő lézer végzi, a szennyező fénytől óvni kell a mintát, jól záródó mintatartó szükséges a méréshez. A mért adatok méretének minimalizálásához a műszer szoftvere kvázi-logaritmikus adatgyűjtést végez (0,1 ms mintavételezés az első 4 ms, 1 ms mintavételezés 1 s, 20 ms mintavételezés 15 s időtartományig, utána 200 ms mintavételezés a mérés további szakaszában).

A távoli vörös fluoreszcencia eredete többértű. Szemben a vörös fluoreszcenciával, a távoli vörös emisszió nem **reabszorbeálódik** a levél szövetein keresztülhaladva (ld. [fluoreszcencia leképezés](#)). A vörös fluoreszcencia reabszorpciója csak az intenzitást befolyásolja, a hozamot nem (ld. [mérés PAM fluorométerrel](#)), az intenzitást mérő FMM esetében a jel erőssége azonban a levél szöveti felépítésétől is függ. A távoli vörös fluoreszcenciát befolyásolja a PSI alap fluoreszcenciája a fotoszintetikus apparátus felépítésétől függően (vö. C_3 és C_4 növények) és a kioltó antennakomplexek alap fluoreszcenciája. Mivel az FMM a klorofill-a fluoreszcencia intenzitását méri (7.7. ábra), ezért a steady-state vörös/távoli vörös fluoreszcencia arány negatívan és lineárisan korrelál a **klorofill-tartalommal** (ld. [fluoreszcencia leképezés](#)), így kalibráció (spektrofotometriás klorofilltartalom-mérés acetonos kivonattól) után felhasználható a klorofill-tartalom meghatározására is.

Az FMM fluorométer további sajátossága, hogy képes változtatni a gerjesztő lézer intenzitását (LP) is, amely változó intenzitású LP mellett a vörös fluoreszcencia konstans értéken tartható. A fluoreszcencia konstans értéken tartásának hatására az LP telítési görbét ír le, ami a konvencionális F lefutáshoz hasonlóan használható az aktuális kvantumhasznosítás számítására. A módszer alkalmas a fotoinhibíció indukálására is. A konstans értéken tartott vörös fluoreszcencia mellett vizsgált változó intenzitású távoli vörös fluoreszcencia mérése egyben mérési lehetőséget teremt a **state-átmenetek** okozta, PSI és PSII közötti gerjesztési energia elosztás átrendeződés mérésére, és a távoli vörös fluoreszcenciát mutató kioltó antennakomplexek szerveződési változásának vizsgálatára is.



7.7. ábra. Klorofil-*a* fluoreszcencia indukció mérési adatok kiértékelése FluorMeas 1.0 programmal. A bal oldali ablakokban a fluoreszcencia gyors felfutása, míg a középső ablakokban a steady-state állapot kialakulás (fényadaptáció) látható. A jobb oldali ablakok a kinetikát jellemző paramétereket tartalmazzák. A felső ablakok a diszkrét hullámhosszokon regisztrált adatokat (lila: 735 nm fluoreszcencia, vörös: 690 nm fluoreszcencia), míg az alsó ablakok a két fluoreszcencia arányát (zöld: fluoreszcencia arány) mutatják.

7.4.1. Mérés FMM fluorométerrel

A készüléket bekapcsolva a PC modul LED-kijelzőjén jelenik meg a menü. Válasszuk ki a Measure opciót (1). A mérőmenüben a P_{LD} almenü szolgál a gerjesztő lézertény kinetikájának beállítására (= Kautsky-kinetika; ≤ gerjesztő kinetika). Állítsuk a műszert Kautsky-kinetika üzemmódba. Csatlakoztassuk a mintatartót a műszer száloptikájához. A mérés a mérőmenü Start (0) funkciójával indítható. Kautsky-kinetika mérése esetén választható, hogy a 690 nm, vagy a 735 nm fluoreszcencia indukciós görbét jelenítse-e meg a műszer. Az aktinikus megvilágítás 5 min ideig detektálja az indukált klorofil-fluoreszcenciát. A mérés befejeztével ne felejtjük elmenteni a mérési adatokat, és feljegyezni a mérési fájl nevét! A mérési adatok soros csatlakozón keresztül tölthetők le asztali PC-re. A műszer adatait a FluorMeas for FMM data evaluation 1.0 program kezeli. Értékeljük a vízbontó centrum működését az $(I-F_o)/I$ és $(F_p-F_o)/F_p$ kvantumhatékonyságok összevetésével! Vessük össze a maximális kvantumhatékonyságot a $F_{s;690}/F_{s;735}$ arányokkal egy erősen klorotikus és egy egészséges növény esetében!

7.5. Ajánlott irodalom

Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, **59**: 89-113.

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1607-1621.

Fernandez-Jaramillo AA, Duarte-Galvan C, Contreras-Medina LM, Torres-Pacheco I, Romero-Troncoso RJ, Guevara-Gonzalez RG, Millan-Almaraz JR (2012) Instrumentation in developing chlorophyll fluorescence biosensing: A review. *Sensors*, **12**: 11853-11869.

8. fejezet - Növényi fehérjék vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel

szerző: Dr. Sárvári Éva

8.1. Elméleti bevezetés

Az élő szervezetek, illetve sejtjeik és organellumaik működésének megismerésében fontos szerepet játszik a proteomika (*omics* – kutatási terület). Célja a teljes protein összetétel megismerése, a proteinek funkcionális szempontból fontos módosításainak (foszforiláció, glikoziláció, acetiláció, degradáció) és kölcsönhatásainak feltárása, illetve a fejlődési, fiziológiai és környezeti változások következtében fellépő fehérje-összetétel és -kölcsönhatás változások nyomon követése. *Micro-array* technológiával és bioinformatikával kombinálva a vizsgált objektum működése egyre teljesebben tárható fel. Ugyanakkor csak a genomika és a transzkriptomika alapján nem határozható meg a proteom, illetve annak változásai. Eukariótákban a génekben kódolt információ alapján több protein is képződhet (10.000-40.000 gén, >200.000 protein) alternatív start helyek használata, alternatív *splicing*, poszt-transzlációs módosítás következtében. A transzkriptumok mennyisége sem egyértelmű indikátora a proteomnak, sőt a proteinek aktivitásában bekövetkező számos változás a transzkriptumok mennyiségi változása nélkül, a protein poszt-transzlációs módosításával összefüggésben következik be.

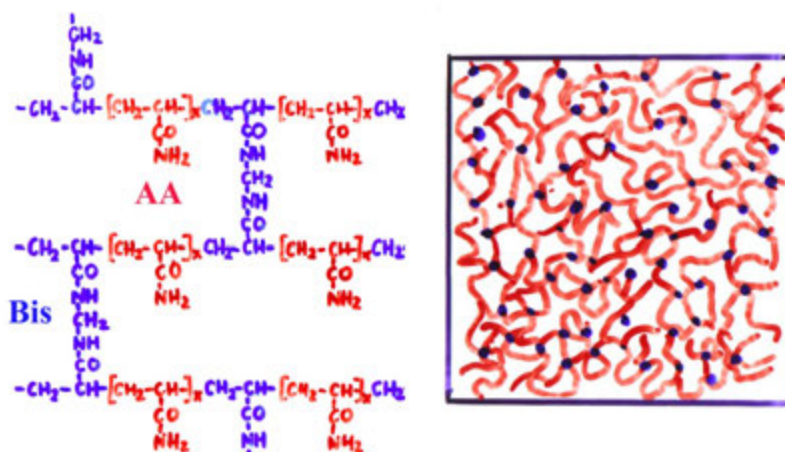
A fehérjeprofíll feltárásához az egyes fehérjéket izolálni, majd azonosítani kell. A fehérjék kémiaiilag inhomogének (oldhatóságban, molekulatömegben és töltésben különbözők, poszt-transzlációsan különbözőképpen módosítottak) és több nagyságrenddel is különböző mennyiségben vannak jelen. Ezért a proteom feltárását nagyban elősegítheti az, ha a fehérjekeveréket előzetesen valamilyen módszerrel frakcionáljuk, s így csökkentjük a továbbiakban együtt vizsgálandó fehérjék számát. Egy fehérjekeverékből a fehérjék legtokéletesebb elválasztása (legjobb felbontás) gélelektroforézissel érhető el.

8.1.1. Az elektroforézis alapjai

Az elektroforézis töltött részecskék elválasztására alkalmas módszer. A változó számú karboxil-, imino-, hidroxil- és amino-csoport pH-tól függő töltést ad a fehérjéknek, kivéve az **izoelektromos pontjuknak (pI)** megfelelő pH-n, amikor a pozitív és negatív töltések száma megegyezik, azaz a fehérje nettó töltése nulla. Az elektroforézis lényege, hogy potenciál gradiens hatására a töltéssel rendelkező molekulák az ellenkező töltésű pólus felé mozdulnak el v sebességgel ($v = E \cdot m$ [cm s^{-1}]). A sebesség a töltéssűrűségüktől, ami meghatározza a mozgékonytságot (**m**), valamint az alkalmazott elektromos térerősségtől (**E**) függ. Ha az elválasztandó molekulák egyenletes eloszlásban találhatók az oldatban, akkor **E** hatására igazi szétválást nem tapasztalunk. Ha azonban a fehérjéket az elektródoktól távol, vékony zónában vesszük be a rendszerbe (zonális elektroforézis), akkor az eléggé különböző mobilitású fehérjék szétválnak. A mozgó részecskék vándorlásuk során egymással ütköznek, ami hő termelődését eredményezi. A hőmérséklet emelkedésével nő a diffúzió mértéke, ami keveredést okoz az oldatban és folyamatosan szélesíti az elvárt sávokat. Ezért az oldatot általában valamilyen hordozó közeggel stabilizálják. Ezek egyik csoportja inert, azaz az elválasztás szempontjából úgy viselkedik, mint egy oldat, de akadályozza a keveredést és a diffúziót (pl. papír, cellulóz-acetát, szilikagél, cellulóz- és alumínium-vékonyréteg, agaróz gél), az elválasztás tisztán a töltéssűrűség alapján történik. A másik csoport (keményítő- és poliakrilamid gélek) az elválasztási folyamatban is részt vesz azáltal, hogy a hordozó pórusmérete a fehérjék méretével azonos nagyságrendbe esik, ezért molekulaszűrőként viselkedik. Így az elválasztást nemcsak a töltéssűrűség, hanem a **molekulatömeg (molecular weight; MW)** és az alak is befolyásolja. A keményítőtől, lévén biológiai folyamat terméke és különböző szennyeződések is tartalmazhat, nem készíthetünk jól reprodukálható géleket és pórusméret-tartománya is limitált. A **poliakrilamid gél (PAG)** előnye, hogy nagy tisztaságú szintetikus monomerekből polimerizáltatható, kémiaiilag inert, széles pH (3-10), hőmérsékleti és ionerő tartományban stabil és átlátszó, valamint igen különböző pórusméretű gélek állíthatók elő belőle. Ezért a fehérjék és polipeptidok elválasztására főleg a **poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE)** használják.

8.1.2. A poliakrilamid gélek összetétele, struktúrája és előállítása

A PAG-ek az **akrilamid (AA)** monomerek és a véletlenszerűen beépülő **bisakrilamid (Bis)** ko-monomerek polimerizációjával (vinil-polimerizáció) képződnek (8.1. ábra). Ha a géleket a PAGE után fel akarjuk oldani, akkor Bis helyett etiléndiakrilátot (EDIA) használunk, amely lúgos pH-n oldható, vagy N,N'-diallil-tartardiamidot (DATD), amelyet 2%-os perjósavban lehet feloldani. Ez utóbbi a Bis-tartalmú gélekhez nagyon hasonló struktúrát hoz létre. A szabad gyökök képződését az ammónium-perszulfátból (**AP** - $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) a **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin) katalizálja, amelyek kiváltják a monomerek polimerizációját. A polimerizációhoz a TEMED szabad bázis formájában szükséges, ezért az alacsony pH késlelteti, vagy megakadályozhatja a polimerizációt (savas tartományban Na_2SO_3 , aszkorbinsav és FeSO_4 is használható katalizátorként). A molekuláris oxigén – szabad gyök kioltó – a polimerizációt gátolja, tehát gélöntés előtt az oldatokból a levegőt vízlégszivattyúval el kell távolítani. A polimerizációt a fémzennyeződések is gátolhatják. A polimerizáció mértéke (lánc hosszúság, keresztkötések gyakorisága) a monomerek koncentrációján kívül a polimerizáció sebességétől is függ (katalizátorok mennyisége, hőmérséklet). A polimerizáció körülményeit (reagens tisztasága, koncentrációja, hőmérséklet, O_2 eltávolítása) tehát standardizálni kell úgy, hogy a polimerizáció kb. 10-30 perc alatt megtörténjen. A géleket kétszeresen desztillált (ioncserélt) vízzel (**bidv**), gélpufferrel vagy izo-butanollal (ezt a polimerizáció után pufferrel kell cserélni) felülrétegezzük, ami biztosítja a gélek egyenes felszínét, és gátolja az O_2 beoldódását.



8.1. ábra. A poliakrilamid gélek szerkezete. Az akrilamid (AA, piros) láncokat bisakrilamid (Bis, kék) keresztkötések kapcsolják össze. Ez végül is egy háromdimenziós szivacszerű szerkezet kialakulását eredményezi, amely egy átlagos pórusmérettel jellemezhető.

A PAG-ek nagyon oxidatívok, mivel a polimerizáció szabad gyökös katalízise relatíve magas peroxid koncentrációhoz létre. A peroxid nem töltött, tehát – a perszulfát ionoktól eltérően – elő-elektroforézissel nem távolítható el. Oxidációra érzékeny fehérjeminták esetén ezért a monomerek polimerizációját előidéző szabad gyökforrásként a riboflavin fény hatására történő lebomlásakor keletkező leukoflavint használjuk. A szabadgyök képződéséhez a leukoflavin újbóli oxidációja szükséges, aminek feltétele kis mennyiségű O_2 jelenléte is. TEMED jelenlétében a polimerizáció megbízhatóbb. A polimerizáció során a fényenergiát (15 W teljesítményű izzó már megfelel) és az időt standardizálni kell.

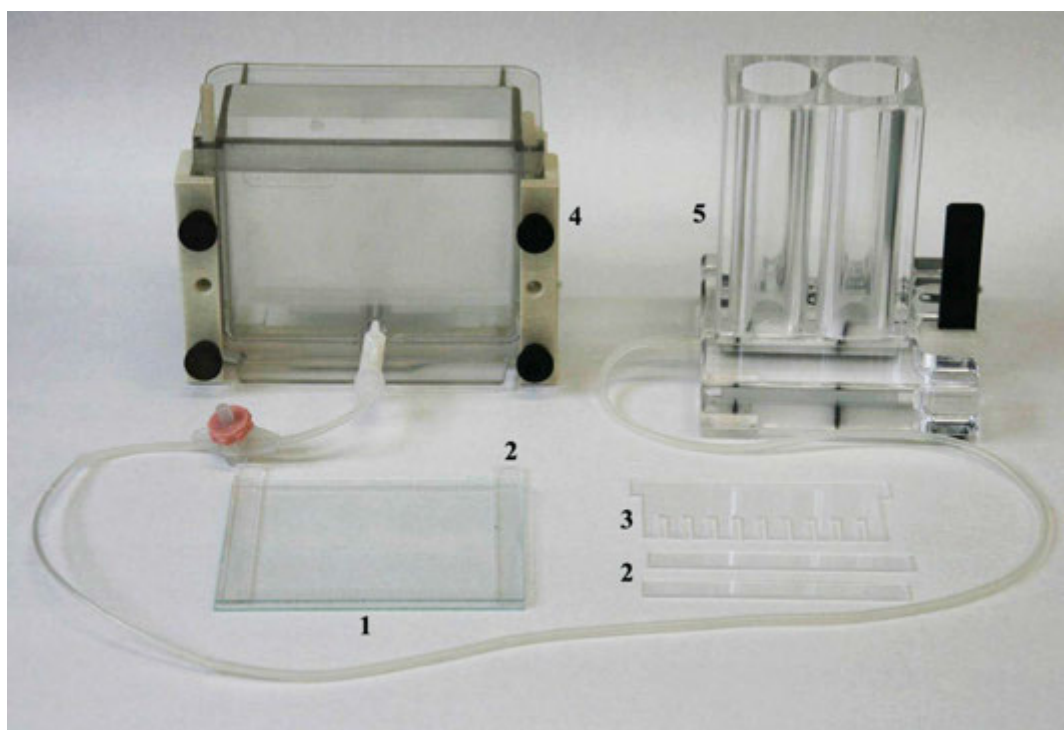
A gélek pórusméretét, viszkozitását, elaszticitását és mechanikai tulajdonságait az AA és Bis koncentrációja, a polimerizáció foka és a keresztkötések száma határozza meg. Ha az AA/Bis < 10, akkor a gél törékeny, merev és átlátszatlan lesz, ha pedig > 100, akkor a gél nyúlós és könnyen szétfolyik. Elasztikus és átlátszó géleket kapunk, ha > 3%-os AA koncentrációnál az AA/Bis arány ~30. Az elasztikus gélekben az AA koncentráció növekedését a Bis koncentráció csökkenése kell, hogy kísérje: C=6,5-0,3T (5-20%-os géleknél $\pm 1\%$ -os eltérés elfogadható), ahol a C és T a gélek összetételét jellemző adatok, ha V az oldattérfogat:

$$T(\%) = \frac{AA+Bis}{V} * 100$$

$$C(\%) = \frac{AA+Bis}{V} * 100$$

A PAG-ek pórusmérete függ az AA és a Bis koncentrációtól. Bis hiányában random polimer lánc képződik (viszkózus oldat). Adott Bis koncentrációnál az AA koncentráció növelésével a pórusméret csökken. Adott AA koncentrációnál a Bis koncentráció növelése kb. az össz-monomer 5%-áig csökkenti a pórusméretet (nő a keresztkötések gyakorisága). Nagyobb Bis arány esetén azonban a polimer láncok vastag kötegekbe rendeződnek, amelyek szintén (kisebb számú) keresztkötéssel kapcsolódnak, ezáltal nagy pórusok is nagyobb számban keletkeznek, tehát az effektív pórusméret nő.

A géleket általában két (10-20 cm széles és hosszú) üveglapból és távtartókból álló, leggyakrabban 1 mm vastag kazettába öntjük (8.2. ábra). A mintahelyek kialakításához különböző méretű fésűket használunk. Az öntés végezhető egy-egy gélkazettában külön-külön, illetve több gélt is önthetünk egyszerre öntőkádba helyezett különböző számú kazettában. Lehetőség van kész gélek vásárlására is.



8.2. ábra. A poliakrilamid gélek előállításához szükséges felszerelés. 1 – üveglapok, 2 – távtartók, 3 – a mintahelyek kialakításához szükséges fésű, 4 – gélöntő kád, 5 – gradiens keverő.

A gradiens gélek öntéséhez gradiens keverő is szükséges. Ez olyan közlekedő edény, amelynek két tartályába lineáris gradiens öntése esetén azonos térfogatú, a gradiens két végpontjának megfelelő gélkeveréket öntünk. A kevertetett edényfélbe a hígabb keverék kerül. Miközben a kevertetett gélkeveréket a függőlegesen álló kazettába juttatjuk, a hiányzó térfogat állandóan pótlódik a másik edényfélből, így a kazettába kerülő keverék folyamatosan töményedik. Az egyre töményebb oldatok egymás alá rétegződve alkotják a gradienst.

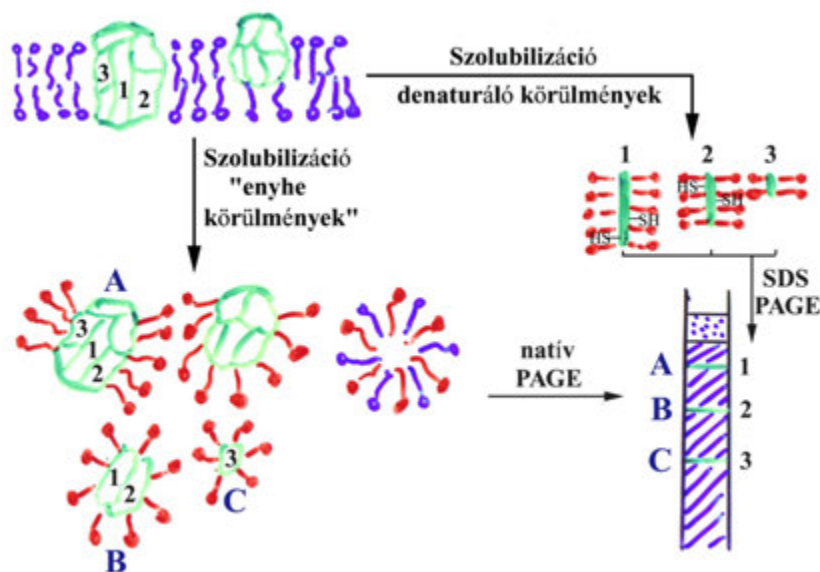
8.1.3. Mintakészítés a poliakrilamid gélelektroforézishez

A fehérjék elektroforézishez való **előkészítéséhez** különböző **műveletekre** lehet szükség. Ha a mintában az ionerő magasabb, mint a szeparáló gélben, akkor nem jó az elválás, tehát a mintából el kell távolítani a sók nagy részét (dialízis, gélszűrés). Híg oldatok esetén a fehérjetartalmat koncentrálni kell. Ez történhet kicsapással és újraoldással, ami eltávolítja a sókat és a nem dializálható szennyeződést is. Alkalmazhatunk acetonos, alkoholos, ammónium-

szulfátos, vagy denaturált proteineknel triklórecetsavas kicsapást is. Koncentrálásra felhasználható még az ultraszűrés, liofilizálás, illetve hidrofíl polimerekkel (polietilén-glikol, Sephadex) való beszárítás. Előfordulhat, hogy egyes proteinek olyan nagy mennyiségben vannak jelen, hogy nagymértékben zavarják más proteinek elválasztását, detektálását (albumin a vérsérumban, Rubisco a kloroplasztiszban). Ilyenkor ezeket szelektíven eltávolítják a fehérjekeverékből még a gélelektroforézis előtt. Az oldott DNS növeli a minta viszkozitását, eltömheti a gél pórusait, a proteinekhez kötődve megváltoztatja mobilitásukat. A nukleinsavakat enzimes emésztéssel távolíthatjuk el a mintából.

Mivel a PAGE-sel történő elválasztáshoz a proteineknek oldott állapotban kell lenni, a nem vízdoldékony membránfehérjéket a mintakészítés során szolubilizálni kell, a denaturáló PAGE-hez pedig az oldható fehérjéket is denaturálni szükséges. **Szolubilizáció/denaturáció** céljából különféle anyagokat (detergensek, kaotróp ágensek, redukáló- és alkilálószer) adhatunk a mintához.

A **detergensek** erősségüktől függően a hidrofób lipid-protein illetve protein-protein kölcsönhatásokat szüntetik meg, valamint növelik a proteinek oldhatóságát az pI pontjuknál (8.3. ábra). Kettős karakterű vegyületek, amelyek hidrofób és hidrofíl molekularészletet is tartalmaznak. Vannak anionos, kationos, iker-ionos és nem-ionos detergensek. Jellegzetességük, hogy egy adott koncentrációjuk, a **kritikus micelláris koncentráció (CMC)** felett, különböző méretű micellákat alkotnak. A membránfehérjék szolubilizálása azt jelenti, hogy a detergensek szétbontják a membránt, a fehérjéket (lipideket) micellákba zárva elkülönítik, amelyek így már vízdoldékonyak és különböző technikákkal elválaszthatók. A leggyakrabban használt és legökényesebben szolubilizáló/denaturáló detergens a **Na-dodecilsulfát (sodium dodecylsulphate, SDS)**. A teljes denaturációhoz 4:1 (w/w) SDS/protein arány szükséges. Ilyenkor 1,4 g SDS g⁻¹ protein kötődik, azaz a proteinek felületi töltéssűrűsége azonos lesz (saját töltésük elhanyagolható). A teljes denaturáció az alak azonosságát is jelenti (hidrodinamikai szempontból pálcikaszerű struktúra: a molekulák átmérője hasonló, hosszuk a molekulatömeggel arányos). A detergensek és tulajdonságaik részletesebb leírását ld. a Detergensek fejezetben.



8.3. ábra. A proteinek szolubilizációja és denaturációja. A membránproteinek (zöld) és lipidek (kék) szolubilizációjához/denaturációjához detergenseket (piros) használunk, amelyek a körülményektől függően (a detergens típusa, koncentrációja, hőmérséklet) a membránkomplexeket (A,B,C), illetve a membránfehérjéket (1,2,3) oldhatóvá teszik, vagy az utóbbiakat denaturálják. A teljes denaturációhoz a diszulfid-hidakat redukáló ágensek is szükségesek.

A tökéletes denaturációhoz **redukáló ágensek**, tiol reagensek (diszulfid-hidakat hasítják) is szükségesek. Leggyakrabban a merkaptóetanolt használják. A ditioneitol, bár drágább, kevésbé erős szagú és nem reoxidálódik. Az intermolekuláris diszulfid-hidak hasításával aegységeket kapunk. Az intramolekuláris diszulfid-hidak hasításával az SDS-kötődés lehet teljesebb, azaz a protein a konformációs különbözőség (a nagyobb mennyiségű SDS tökéletesebben denaturál, nagyobb a felületi töltéssűrűség) miatt gyorsabban fut. A redukáltságot az –SH csoportok jódcetamidós alkilálásával tehetjük irreverzibilissé.

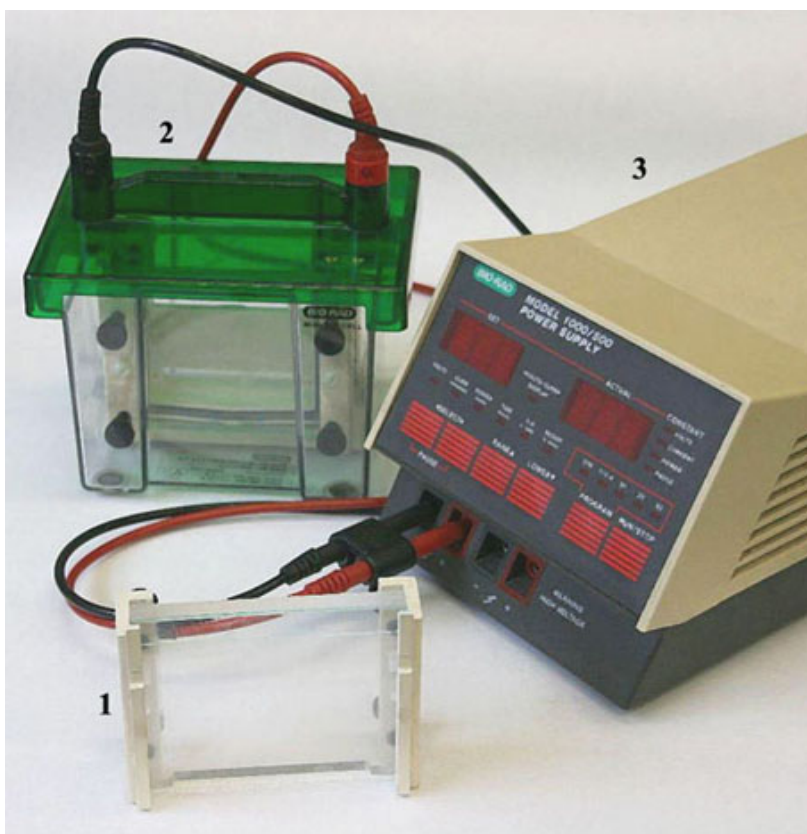
Az oldhatóvá tételt/denaturációt elősegítheti a magas hőmérsékleten való inkubálás, mivel a hőmérséklet emelésével a metastabilis komplexek disszociálnak, illetve kaotróp ágensek alkalmazása is. A **kaotróp ágensek** a nem-kovalens intermolekuláris kölcsönhatásokat (H-híd kötések, van der Waals kölcsönhatások, hidrofób kölcsönhatások) befolyásolva fejtik ki hatásukat. A denaturáló ágensek is kaotrópok, de a kaotróp ágensek nem mindig denaturálnak! Kaotróp ágensek az urea (6-8 M), tiourea (2 M), guanídium-klorid (6 M), lítiumperklorát (4,5 M). A sók szintén kifejtethetnek kaotróp hatást azáltal, hogy árnyékolva a töltéseket destabilizálják az elektrosztatikus kölcsönhatásokat és sóhidakat. A PAGE során leggyakrabban az ureát használják, amely a H-kötések megbontása révén denaturál. A teljes denaturációhoz magas urea koncentráció állandó jelenléte (a gélben is) szükséges. Mivel nem változtatja meg a fehérjék töltését, az elválasztás töltés és méret alapján történik. Bizonyos proteinek (hisztonok, riboszomális- és membránproteinek) urea és SDS jelenlétét is igénylik. Az ureát friss oldatként kell használni, mivel a tárolás

során kémiai izomerizációval cianát- $[O=C=N]^-$ ionok képződnek, amelyek a fehérje aminos-csoportjaival reagálnak, és így karbamilált proteinszármazékok képződnek. Ennek következtében a protein töltése változik, és ha a reakció nem teljes, akkor egy proteinből több különböző töltésű részecske is képződhet. Trisszel pufferelt oldat, amelynek aminos-csoportjai megkötik a cianát-ionokat, és alacsony hőmérséklet (a hőmérséklet emelkedése gyorsítja a cianátképződést) alkalmazása javasolt. A cianát-ionok ioncserélő gyantán való deionizációval távolíthatók el.

A fehérjemintát általában tömörítő gélpufferben oldva visszük fel a PAG-ek mintahelyeire. A **minta** – a kádpufferrel való keveredést megakadályozandó – glicerint vagy szacharózt is tartalmaz. Mivel a fehérjék színtelenek, a futás előrehaladásának jelzésére a lúgos tartományban 0,001% brómfenolkéket, savasban pedig 0,005% Pyronine Y-t vagy metilénkéket használunk. Ezek a festékek a futás frontvonalát jelzik. A proteolízis gátlása céljából szükséges lehet proteázgátlók alkalmazása is. Szerin típusú proteázok esetében PMSF-t (fenil-metil-szulfonil-fluoridot), Me^{2+} -függőknél o-fenantrolint, cisztein típusúaknál jódcetamidot használhatunk. A proteázok gátlása a minta 1,5-3 perces forralásával is történhet, ha a fehérjék hő hatására nem aggregálódnak. A nem oldódott/aggregálódnak proteinek eltávolítása centrifugálással (5-15 min, 10000-20000 g) történik. Ez azért szükséges, hogy ne tömjék el a gél pórusait, ami akadályozza az oldott fehérjék bejutását. A gél mintahelyeire egyféle fehérjéből 1-10 μ g-t, fehérjekeverékből 50-100 μ g-ot ajánlott felvinni.

8.1.4. A poliakrilamid gélelektroforézis körülményei

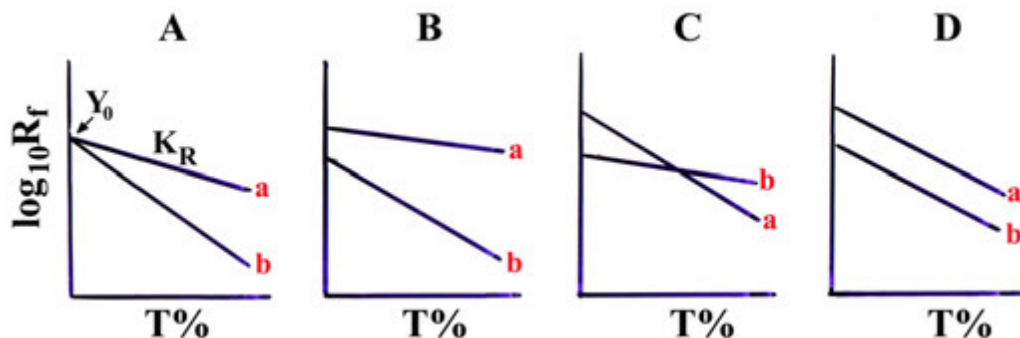
A protein gélelektroforézishez általában **vertikális gélelektroforézis készüléket** (8.4. ábra) használunk (pl. BioRad, Hoefer, Amersham). Ez egy felső és alsó puffertartályból áll, amelyekbe elektródok merülnek. Bázikus pH-n, ahol a fehérjék töltése negatív (a karboxil-csoportok disszociálnak), a felső a katód, az alsó pedig az anód. A két tartály csak a gélen keresztül van elektromos kapcsolatban, amelynek a tetejére rétegezzük a mintát. A töltött részecskék elmozdulásához szükséges térerősség gradienst egy egyenáramú tápegység szolgáltatja. A modern tápegységeken állandó áramerősség, állandó feszültség, ill. speciális esetben állandó teljesítmény is beállítható. A készülékekben az elektroforézis során keletkező hő elvezetését a géleket körülvevő kádpuffer, illetve a gélelektroforézis berendezésbe beépített hűtőrendszer is biztosíthatja.



8.4. ábra. Gélelektroforézis berendezés. A kész gélek egy tartóba (1) kerülnek, amelyet a futatókád (2) elektródokat hordozó részéhez csatlakoztatunk. A gélelektroforézis során az egyenfeszültséget a tápegység (3) biztosítja.

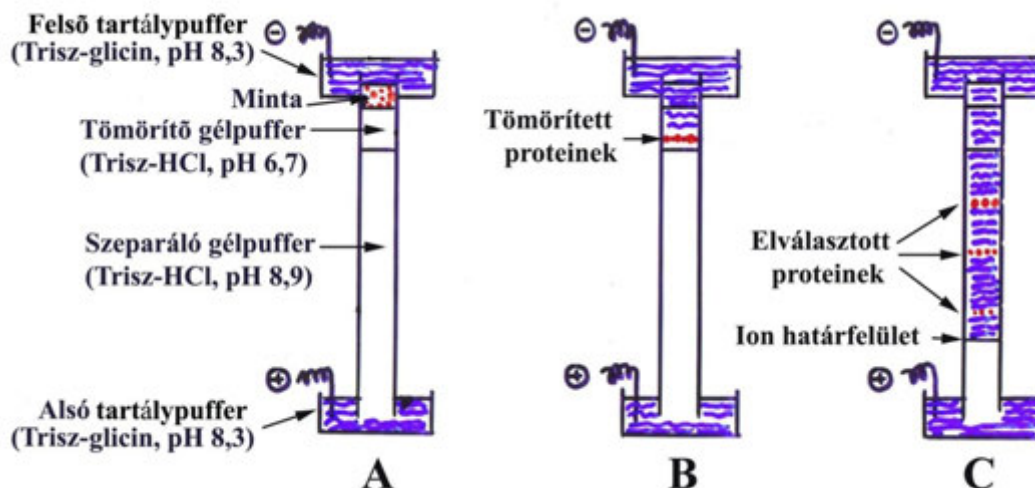
A PAGE-t számos tényező befolyásolja, amelyeket mindig megfelelően kell megválasztani az adott fehérjék/komplexek mind tökéletesebb elválasztása érdekében. Fontos tényezők az elválasztandó fehérjék/komplexek és a hordozó tulajdonságai. A **fehérjék felületi töltéssűrűsége** a mozgékonyt szabja meg, **mérete és alakja** a gél molekulaszűrő sajátosságával összefüggésben fontos. A hordozó pórusmérete szintén a molekulaszűrést befolyásolja, formájától (**csőgél/lapgél**) a futás reprodukálhatósága függ. A PAGE közegének viszkozitása a mozgékonyt, pH-ja a töltéssűrűséget, ionereje a hőfejlődést és a sávélességet befolyásolja. Az elektromos télerősségtől a futási idő, az alkalmazott áramerősségtől pedig a hőtermelés függ. A fehérjék elválasztásához általában $10\text{-}20\text{ mA cm}^{-2}$ gélfelület állandó áramerősséget, illetve $\sim 120\text{ V}$ (tömörítés), majd 200 V (szeparálás) állandó feszültséget alkalmazunk.

A PAG-ek molekulaszűrő sajátossága miatt a **pórusméretettől** függ a **felbontás**, azaz két szomszédos sáv szétválása. Natív fehérjékeverék esetében 7,5%-os gélekkel érdemes próbálkozni (vagy 5-15%-os AA gradienssel), denaturált fehérjék elválasztására pedig 12%-os gél (vagy 10-25%-os gradiens) a legmegfelelőbb. A két fehérje elválasztására legalkalmasabb módszer (méret vagy töltés alapján történjen-e) kiválasztására, illetve a fehérje tisztaságának és normális futásának az ellenőrzésére a **Ferguson-féle analízis** révén nyílik lehetőség. Ha a $\log R_f$ -t (R_f : a fehérje vándorlása/a jelzőfesték vándorlása) a géln koncentráció ($T\%$) függvényében ábrázoljuk, akkor a tengelymetszet (Y_0) a $T=0$ esetben (azaz elvileg az oldatban) mérhető mobilitás, a meredekség (K_R - retardációs koeficiens) pedig a MW függvénye (8.5. ábra).



8.5. ábra. Ferguson-féle analízis. (A) 'a' és 'b' fehérje felületi töltéssűrűsége azonos, méret szerint 'a' < 'b', csak méret szerint választhatók szét. (B) felületi töltéssűrűség: 'a' > 'b', méret: 'a' < 'b', méret és töltés szerint is szétválaszthatók. (C) felületi töltéssűrűség: 'a' > 'b', mérete 'a' > 'b', mindkét tulajdonság alapján szétválaszthatók, de nem annál a $T\%$ -nál, ahol ugyanolyan a mobilitásuk. (D) felületi töltéssűrűség: 'a' > 'b', 'a' és 'b' mérete azonos, csak töltés szerint választhatók szét. Y_0 – oldatbeli mobilitás (extrapolált érték), K_R – retardációs koefficiens (az egyenes meredeksége).

A fehérje elválasztás **kontinuus vagy diszkontinuus PAGE rendszerben** történhet. A kontinuitás és diszkontinuitás minden összetevőre vonatkozhat. A kontinuus gélrendszerben a gél egyféle pórusméretű, a pufferek ionösszetétele és pH-ja mindenhol (gélpuffer, kádpuffer) azonos, a pufferek ionereje azonban különbözhet. Általában a mintában a puffer ionereje 1/5-1/10 része a gélpufferének. Ennek koncentráció, sávélesedést kiváltó hatása van az oldatból a szeparáló gélbe való belépéskor, mivel azon túlmenően, hogy az oldatban és a gélben a futási sebesség különböző, ilyenkor a kisebb ionerő miatt még a térerősség gradiens is nagyobb az oldatban. A diszkontinuitás megjelenhet a gél pórusméretében (általában nagy pórusméretű, a mintát tömörítő gél, és kis pórusméretű, a proteinek szeparáló gél alkalmaznak), a pufferek összetételében (ionok minősége, koncentrációja, pH). A diszkontinuus rendszereknek a kontinuus rendszerekénél jóval erősebb mintakonzentráló, azaz sávélesítő hatásuk van. A tömörítő gél pH-ját úgy kell megválasztani, hogy a fehérjék mobilitása a pufferben lévő gyorsabban és lassabban futó ion közé essen. Nem alkalmazható ez a rendszer olyan esetben, ha a koncentráció hatása a proteinek aggregációjához, a gélből való kizáródásához vezet. A diszkontinuus rendszer működését a következő példa alapján érthetjük meg (8.6. ábra). Az Ornstein-Davis Trisz-glicin (kádpufferek) - Trisz-HCl (gélpufferek) rendszerben a tömörítő gél pH-ját úgy választják meg, hogy az közel legyen a glicin (gyenge sav) disszociációs állandójához, így az csak gyengén disszociál. Ilyenkor $v = E m_x$ (x a disszociált molekulák aránya). A klorid mobilitása jóval nagyobb lévén (*leading* ion) a térerősség gradiens hatására elfut a glicinától (*trailing* ion) egy kis konduktivitású zónát hagyva maga mögött. Az így kialakuló nagyobb térerősség gradiens felgyorsítja a glicinát ionok futását úgy, hogy azok közvetlenül a klorid után futnak, közöttük éles határfelülettel. A proteinek a klorid gyorsan elhagyja, így azok futása is felgyorsul a kis konduktivitású közegben. Végül is a proteinek egy szűk (néhány μ vastagságú) zónában, a mobilitásuk sorrendjében futnak a klorid és a glicinát ionok közti határfelületen. (*isotachopheresis*). A proteinsáv vastagsága nem a minta protein koncentrációjától, hanem a gélre felvitt protein mennyiségétől függ. A szeparáló gél pH-ján már a glicin is jól disszociál, ilyenkor mind a klorid, mind a glicinát ionok mobilitása nagyobb lesz a proteinekénél, így a proteinek előtt futnak egy ion-határfelületet képezve. A fehérjék az egyenletes térerősség gradiens hatására mozognak a gélben. Mozgási sebességüket a gél molekulaszűrő hatása erősen befolyásolja, így szétválnak.



8.6. ábra. A diszkontinuus gérendszer működése. (A) A felvihető mintatérfogat viszonylag nagy, a mintát a tömörítő gél pufferében visszük fel. (B) A tömörítő gélben kialakuló nagy térerősség gradiens hatására a fehérjék a pufferek negatívan töltött ionjai közé rendeződve néhány μm vastagságú sávban érik el a szeparáló gél tetejét. (C) A szeparáló gélen az ionok gyorsan mozogva elhagyják a fehérjéket egy ion-határfelületet képezve, a fehérjék mobilitásuk szerint szétválnak.

A PAGE történhet **disszociáló és nem disszociáló körülmények** közt. A natív proteineket általában nem disszociáló körülmények közt futtatjuk. Ilyenkor a natív protein konformáció és a biológiai aktivitás, illetve a többkomponensű komplexekben az alegység-kölcsönhatások megmaradnak a PAGE során is. Az elválasztás általában méret és töltés szerint történik. A leggyakrabban használt rendszerek a Trisz-glicin (Laemmli-féle, $\text{pH}=8,3-9,5$) és a Trisz-borát (Neville-féle, $\text{pH}=8,3-9,3$). Ha a fehérjék natív állapotának fenntartásához redukáló ágens is szükséges, akkor 1 mM ditiotreitolt teszünk a gélbe (a merkaptotanol 10 mM koncentrációban effektív, ez azonban gátolja a polimerizációt, ezért nem alkalmazható). Másik lehetőség töltött tiol-reagens (1 mM tioglikolát vagy 10 mM 3-merkaptopropionsav) hozzáadása a felső pufferhez. Gyenge detergenset is használhatunk nem denaturáló körülmények közt. Ha nem szükséges a natív állapot fenntartása, hanem a fehérjék jobb elválasztása a cél, akkor disszociáló körülmények közt végezzük az elektroforézist. Általában erős detergenst (SDS) és redukálószereket, esetleg magas hőmérsékletet, kaotróp ágenseket is alkalmazunk a minta teljes szolubilizációja/denaturációja céljából.

A pufferek **pH**-ja elvileg bármilyen lehet. Natív PAGE esetén azonban kritikus, mivel a protein saját töltése pH-függő. Minél távolabb van a pH a pI-tól, annál nagyobb a töltés, azaz a szeparáció sebessége, tehát kisebb a sávkiszélesedés. Minél közelebb van az pI-hoz, annál nagyobb a proteinek közti töltéskülönbség és így ez is növelheti két fehérje elválását. Sok protein pI-ja pH 4-7 között van, ezért többnyire pH 8,0-9,5 PAGE rendszereket alkalmaznak. Fontos lehet a pH a protein stabilitása és biológiai aktivitásának megmaradása szempontjából is, mivel extrém pH-knál protein hidrolízis (deamidáció) léphet fel. Diszkontinuus rendszerben a koncentráció hatás miatt lehet kritikus a tömörítő gél pH-ja. Disszociáló rendszerekben a pH nem annyira kritikus, mivel az SDS-t kötő proteinek széles pH-tartományban negatívan töltöttek.

8.1.5. Gélelektroforézis módszerek

Megkülönböztetünk **analitikai és preparatív** PAGE módszereket. Az analitikai módszereket, amelyek célja a fehérjék elválasztása és jellemzése/azonosítása, gyakrabban alkalmazzák. Néha azonban nagyobb mennyiségű tiszta fehérje előállítására preparatív PAGE-t is használnak. Mivel ehhez nagyobb méretű gélekre van szükség, ilyenkor az elektroforézis közbeni melegedés megakadályozására nagyobb gondot kell fordítani.

Az elválasztás elve alapján megkülönböztethetünk natív PAGE-t, ahol a proteinek elválasztását a méret, a töltéssűrűség és az alak is befolyásolja, izoelektromos fókuszálást, ahol az elválasztás az aminosav összetételtől függő töltéskülönbség alapján történik, és SDS PAGE-t, amikor a fehérjék molekulatömege az elválasztást meghatározó paraméter.

A **natív PAGE** olyan körülmények közt történik, amikor a fehérje a gélelektroforézis alatt is natív állapotban marad, alegységszerkezetét, funkcióját megtartja. Sokféle változata lehet. Egyik speciális esete a „**Blue-Native**” (**BN**) **PAGE**, amely 100-1000 kDa mérettartományba eső strukturális vagy funkcionális szuperkomplexek natív állapotban történő elválasztására alkalmas. E módszerrel tehát vizsgálható a komplexek közötti kölcsönhatás (interakció) is. Az elektroforézis előtt a mintákat csak gyenge detergenssekkel kell szolubilizálni, amelyek a lipid-fehérje kölcsönhatásokat anélkül bontják meg, hogy a fehérjék/komplexek natív komplexstruktúrájában kárt tennének. Leggyakrabban n-dodecil- β -D-maltozidot vagy digitonint használnak. Az elektroforézishez szükséges negatív töltéseket a detergens helyett a mintához adott „**Coomassie Brilliant Blue**” (**CBB**) festék biztosítja.

Az **SDS PAGE** során a fehérjéket teljes mértékben denatúráljuk. A nem vízdékony fehérjéket erős detergens (SDS) alkalmazásával oldhatóvá tesszük. (Az SDS a gélben és a tartálypufferekben is jelen van, hogy a fehérje a PAGE során is denatúráltsó maradjon.) A vízdékony fehérjékhez is SDS-t kötünk. A nagymértékű SDS kötődés miatt minden fehérje jelentős negatív töltést nyer, ami mellett saját töltése nem lényeges, felületi töltéssűrűségük azonos lesz. A fehérje harmadlagos/negyedleges szerkezetét redukánsok, alkilálás, kaotróp ágensok alkalmazásával megszüntetjük, így hidrodinamikai szempontból alakjuk is azonos lesz. A gélek pórusmérete a molekulamérettel összemérhető, így a teljesen denatúrált fehérjék a PAGE során MW-ok szerint válnak el. Az ettől eltérő, anomális viselkedés Fergusson-féle analízissel állapítható meg (az Y_0 különböző, ha a specifikus SDS kötés nem azonos).

A natív és SDS PAGE egy speciális esete a **gradiens PAGE**, amikor a gél pórusmérete a molekulák mozgási irányában csökken, tehát a molekulák mindig egy nagyobb pórusú gélből egy kisebb pórusúba lépnek be, ami állandó sávéléseést eredményez. Egy idő után eléri a nagyságuk által meghatározott pórushatárt, és nem képesek tovább vándorolni. A náluk kisebb molekulák azonban igen. Így a kisebb felületi töltéssűrűségű, de kisebb molekulák távolabbra juthatnak a gélen. A fentiekből következően a homogén pórusméretű géleknél jobb felbontást eredményez mind natív, mind denatúráló körülmények közt. Konkr. gradiens gélek a nagy, a lineáris gradiens a kis MW tartományban szeparálnak jobban. A gradiens gélek mintegy 100 fehérje sáv felbontására alkalmasak. A gradiens PAGE széles MW tartományban biztosít jobb elválasztást, ugyanakkor kevésbé különböző MW-ű fehérjék jól megválasztott homogén gélen választhatók el tökéletesebben.

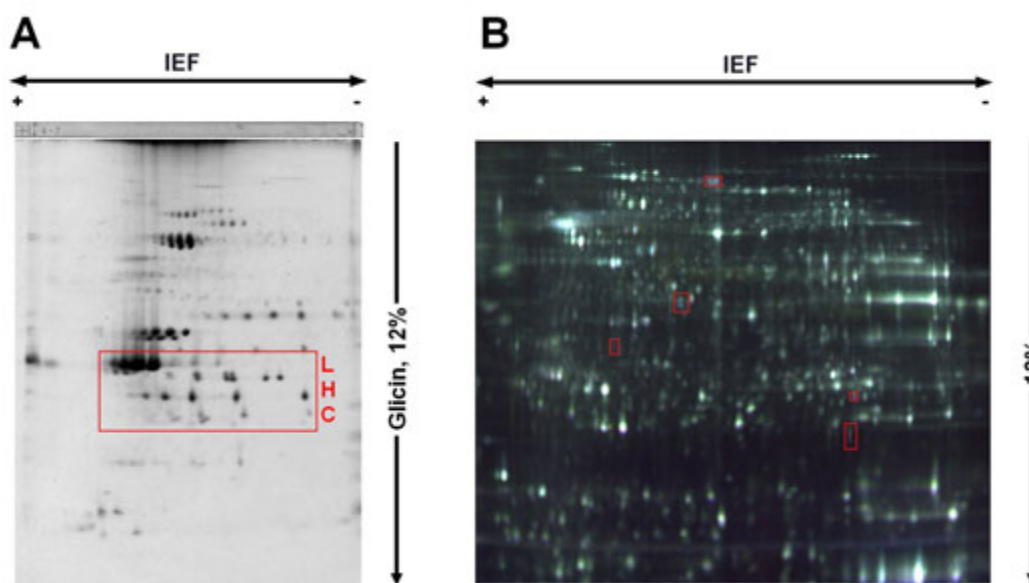
Izoelektromos fókuszálás (IEF) esetén az elválasztás nagy pórusméretű hordozón (agaróz, nagy pórusú PAG) történik, **amfolitok** jelenlétében. Az amfolitok amfipatikus, iker-ionos poliamino-polikarbonsavak elegyei, amelyeket akrilsav és különböző polietilének, poliaminok szintézisével állítják elő. Vízdékony, jó pufferkapacitású, jó vezetőképességű, a fehérjékhez képest kis molekulatömegű (~5 kDa), UV-ban alacsony abszorbanciájú molekulák. Stabilitás pH gradiens előállítására alkalmasak. A pH gradiens előállítása úgy történik, hogy elektromos áramot bocsátunk az adott pH tartománynak megfelelő, egymástól kevésbé különböző pI-tal rendelkező amfolitokat tartalmazó oldatba. Kezdetben, a közegben a pH egységes és megfelel az amfolitok átlagos pH értékének. Elektromos tér hatására a legnegatívabb, legkisebb pI-ú, legsavasabb amfolit az anód felé mozog addig, míg a nettó töltése 0 lesz. A kevésbé savas amfolitok rendre az anódtól távolabb érik el a 0 nettó töltést. Hasonló a helyzet a pozitív töltésű, bázikusabb amfolitokkal, amelyek a katód felé mozognak. A pH-gradiens felépülését a vezetőképesség, illetve az áramerősség változásának, csökkenésének mérésével lehet nyomon követni. Az egyensúly beállta jelzi a folyamat végét. A pH-gradiens gyorsabb kialakítása érdekében a feszültséget lépcsőzetesen emelik (200-400-800 mV). Manapság inkább kész *strip*-eket használnak, amelyek immobilizált pH gradiensket tartalmaznak. Széles (pH 2.5-13) és szűkebb (pl. 4-6, 6-8, 9-11) pH tartományt képviselve kerülnek forgalomba. Kaphatók nem-lineáris pH-gradienst tartalmazó gélek is, amelyek elválasztási hatékonysága a gradiens közepén a legjobb és a gradiens szélei felé logaritmikusan csökken.

Az IEF során a fehérje elválasztás elve az, hogy ha egy fehérjeegységet elektromos feszültség hatására egy lineáris pH-gradiens mentén mozgatunk, akkor minden egyes fehérje azon pH-jú térrészre mozog, ami megegyezik a pI értékével. Mivel itt már töltéssel nem rendelkeznek, így az elektromos erőter nem hat rá, megáll. Amikor a pI-ot elérő fehérje a diffúziós mozgása miatt akár a katód, akár az anód felé elmozdul, ismét töltötté válik és az elektromos erőter visszakényszeríti az izoelektromos pontjára. Így az azonos pI-ú fehérjék, amelyek IzoElektromosak, mérettől, tömegtől és alaktól függetlenül éles sávot alkotva válnak el (Fókuszálás). Az elválasztás feloldása az alkalmazott pH-gradiens léptékétől függ és igen nagy pontosságú is lehet (0,01-0,02 pH egység). A fehérjék pI-je általában 3-12, leggyakrabban 4-7 pH-jú tartományba esik. Az IEF során a fehérjék oldatban tartását alapvetően nem-ionos, illetve iker-ionos detergenssekkel (Triton X-sorozat, CHAPS, Nonidet P40, Zwittergent, TWEEN 20, oktil-glükózid, 1-2%-os koncentrációban) érik el. Denatúráló ágensként általában ureát (4-9 M) alkalmaznak. A gélen történő elválasztásnál fontos szempont, hogy a hordozó pórusmérete megfelelően nagy legyen, ne akadályozza a fehérjék

szabad mozgását. Egyes esetekben a nagyobb pórusméret miatt indokolt lehet agaróz alkalmazása. A gél, illetve a pH-gradiens stabilizálása céljából 10-12% glükózt, szorbitolt, szacharózt is adhatnak a géloldathoz.

Számos egyéb speciális PAGE módszer is ismeretes. A kis molekulatömegű komponensek (1000-10000 Da) pl. jobban elválnak, ha a gélbe ureát is teszünk, vagy speciális puffereket (pl. Trisz-glicin helyett Trisz-tricint) használunk.

Gyakran alkalmaznak egymásra épülő **2 dimenziós (2D)** és 3D (pl. BN/BN/SDS PAGE, BN/IEF/SDS PAGE) módszereket is. A legáltalánosabban használt, legjobb felbontású 2D PAGE módszer az **IEF/SDS PAGE**, amely az 1.D-ban pI, a 2.D-ban méret szerint választ el (8.7A. ábra). Kimutatói módszertől függően (Coomassie-, Ag-festés, illetve autoradiográfia) 400-2000 protein detektálható. Hátránya, hogy az IEF-t megelőző delipidálást követően a hidrofób proteinek nem vagy kevésbé oldhatók vissza, tehát membránproteinek kvantitatív vizsgálatára nem alkalmas. Azt kiküszöbölendő, hogy a sok protein folt miatt a kiértékelés és más mintákkal való összehasonlítás nehéz, kidolgozták a **differentiál gél elektroforézis (DIGE)** módszert (8.7B. ábra).

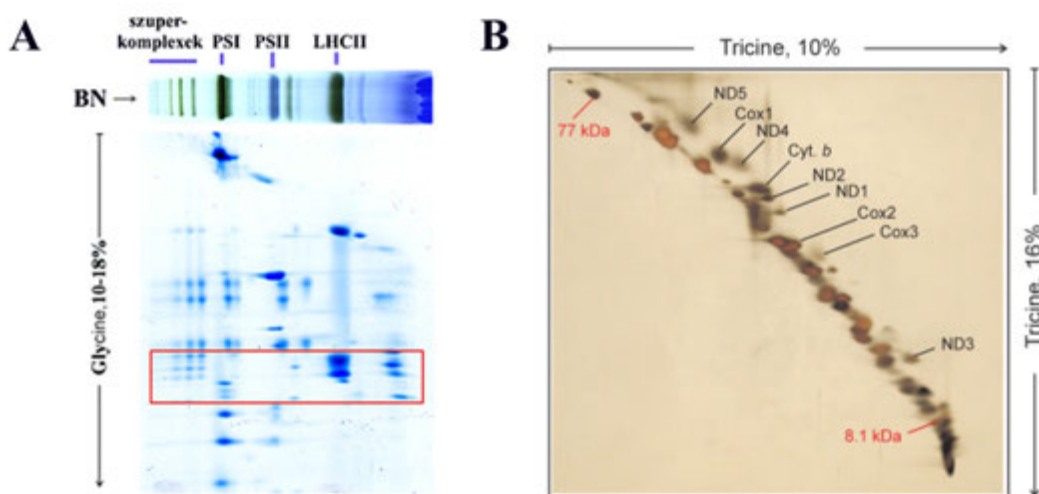


8.7. ábra. Fehérjék elválasztása IEF/SDS PAGE 2D rendszerekben. (A) Tilakoidmembrán-fehérjék elválasztása hagyományos rendszerben: A fehérjék fókuszálása pH 4-7 lineáris gradiens strip-en történt. A szélsőértékeknél kisebb/nagyobb pI-vel rendelkező fehérjék az elektród mellett gyűltek össze, és futottak a 2.D-ban. Az antenna- (LHC-) fehérjék mind izoelektromos pontjaik, mint tömegük különbözőségei alapján jó elválasztást mutatnak. (B) patkány agy szolubilis fehérjéinek elválasztása DIGE IEF/SDS PAGE módszerrel. A DIGE gél három különböző festékkel (Cy2, Cy3, Cy5) előre festett három különböző mintát tartalmaz, amely festékeket a saját gerjesztési hullámhosszukon emittáló lézerekkel szkennelve az egyes minták foltmintázata külön-külön digitalizálható. Az így nyert foltmintázatokat egymásra helyezve a mintákban eltérő mennyiségben jelen lévő proteinek a saját festékük színével jelennek meg (bekeretezett foltok), míg a minden mintában jelen lévő proteinek fehér színnel láthatók.

A **BN/SDS PAGE** módszer membránproteinek kvantitatív vizsgálatára is alkalmas. A natív állapotban szétválasztott (BN PAGE az 1.D-ban) protein-komplexeket a második dimenzióban denaturáló SDS PAGE-t alkalmazva protein összetevőikre bonthatjuk (8.8A. ábra). Ez az IEF/SDS PAGE alternatívája membrán proteinek esetében. 3 dimenzióssá is tehetjük, ha a 2.D-ban is natív PAGE-t alkalmazunk, amivel a protein komplexeket alkomplexeikre bontjuk, és ezután alkalmazzuk az SDS PAGE-t.

A fentiekén kívül még számos 2D PAGE technika létezik, amelyek alapja az, hogy az 1. és 2. dimenzióban különböző gélrendszereket alkalmazunk. Egy érdekes alkalmazás a „**metal affinity shift**” módszer, ami azon az elven alapul, hogy a fémion kötődés megváltoztatja a protein töltését és konformációját, tehát a fémot kötő, illetve nem kötő protein mobilitása különböző még az SDS PAGE körülményei közt is. Ha tehát az egyik dimenzióban divalens kationok, a másik dimenzióban egy erős kelátor (pl. EDTA, EGTA) van jelen a gélben, akkor a fémot nem kötő, mobilitásukat nem változtató, azaz a 2. dimenzióban átlósan futó proteinektől eltérően a fémkötő proteinek foltjai kiválnak a diagonálisból. Hasonlóan mobilitást változtatnak (kiválnak a diagonálisból), tehát elválaszthatók

a szolubilis proteintól a hidrofób proteinek, ha a két dimenzióban változtatjuk az akrilamid koncentrációt, a gél urea tartalmát és/vagy a *trailing* iont (8.8B. ábra). E módszerekkel egy komplex proteinkeverékből elválaszthatók a fémiot kötő vagy hidrofób proteinek.



8.8. ábra. Membránfehérjék elválasztása 2D gélrendszerekben. (A) Tilakoidmembrán-fehérjék elválasztása BN/SDS PAGE sel. A piros keret a fénygyűjtő komplexek 20-29 kDa-os proteinjeit mutatja a tilakoid-komplexekben. (B) A hidrofil és hidrofób mitokondrium proteinek szétválasztása különböző AA koncentrációt alkalmazó Tris-Tricine SDS/SDS PAGE-sel. Az ND a NADH dehidrogenáz komplex, a Cox a citokróm oxidáz komplex fehérjekomponenseit jelöli a mitokondriumokból származó mintában (Rais és mtsai, 2004 – engedéllyel reprodukálva).

8.1.6. A proteinek detektálása

A detektálási módszer kiválasztását befolyásolják, az érdeklődésünkre számot tartó protein tulajdonságai, mennyisége, illetve a módszer érzékenysége, a festési módszer lineáris tartománya, és nem utolsósorban anyagi lehetőségeink, valamint a rendelkezésre álló képalkotó berendezés igényei.

A proteineket az aromás aminosavak (Trp, Tyr) **UV elnyelése** alapján festés nélkül is detektálhatnánk, de mivel a fehérjék extinkciós koefficiense kicsi, és a szennyeződések – a monomerek és az SDS – szintén elnyelnek, csak nagymennyiségű fehérje lenne detektálható nagyon tiszta reagensekből készített gélekben. Ezért a protein sávokat/foltokat festve, illetve egyéb jelölések után detektálják. A detektálási technika a jelölés módjától függ. A festett géleket szkennelhetjük vagy fényképezhetjük (abszorbancia alapján), a fluoreszkáló ágensekkel jelölt fehérjék fluoreszcens detektorral, a radioaktívan jelölt fehérjék pedig autoradiográfiával mutathatók ki.

A festés előtt a diffúzió megakadályozása céljából fixálni kell a proteineket és el kell távolítani azokat az anyagokat, amelyek zavarhatják a procedúrát (SDS, redukáló ágens, glicin, amfolit). Ionmentes vizet és üvegedényeket kell használni. Figyelembe kell venni, hogy a proteinek a különböző festési eljárásokkal különböző mértékben/intenzitással festődnek, tehát a proteinek minél teljesebb kimutatásához néha egymás után kétféle technikát is alkalmaznak.

Legáltalánosabb a **CBB R250 és G250** (vörös és zöld árnyalatú) festékek használata, mivel ezek a proteinek széles spektrumával reagálnak. (Régebben e festékeket a gyapjú festésére használták.) Savas/alkoholos közegben az $-NH_3^+$ csoportokkal és hidrofób oldalláncokkal lépnek kölcsönhatásba. A savas közeg fixálja a proteineket és elősegíti a festékkötést. A festéktelenítés diffúzióval vagy a gél vastagsága irányában végzett elektroforézissel történhet. A CBB festékek abszorpciós maximuma 560-575 nm közt van, 40 ng protein a detektálhatóság határa. Hátrányai, hogy erős a háttérfestődés, munkaigényes, DNS, lipopoliszaharidok és poliszaharidok is festődhetnek. A **kolloidális CBB G-250** festéket alkalmazó procedúrákban a festés érzékenysége 10 ng, megközelíti az ezüstfestését (*blue silver*), és a háttérfestődés elhanyagolható.

Az **ezüst-festés** során Ag^+ ionok (AgNO_3) savas közegben a proteinek töltött oldalláncaihoz kapcsolódnak, amelyeket azután a formaldehid lúgos pH-n Ag -t redukál (az oldat savanyításával leállítható). Az Ag fehérjékhez való kötődését oxidálószerrel (K-permanganát/dikromát, ferricianid) elősegíthetik. 2D gélek esetében a második dimenzió festésénél gyakran használják. Vannak a módszernek színes változatai, amikor a különböző fehérjék különböző színűre festődnek.

A **fluoreszcens jelölés** lényege, hogy fluoreszkáló anyagot (danzil-klorid, fluoreszcein, MDPF – 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furanon) kötnék kovalensen a proteinekre, ami UV megvilágítás hatására a látható tartományban fluoreszkál. Detektálása és a mennyiségi meghatározás azonban speciális műszert igényel, és a reagensek fluoreszcenciája hamar megszűnhet. Újabban új, fluoreszcens festékeket állítottak elő, amelyek stabil fluoreszcenciával rendelkeznek. Pl. a **SYPRO Ruby** érzékenysége 1-10 ng és széles koncentrációtartományban lineáris a fluoreszcens jel, nem festi a nukleinsavakat, de kimutatja a gliko- és lipoproteineket, kis MW-ú és fémkötő proteineket is, amelyek nem jól festődnek más festékekkel.

A láthatóvá tett proteinek mennyiségi kiértékeléséhez a géleket **szkenneljük**/fényképezzük és a sávok/foltok denzitását határozzuk meg (**denzitogram**). Erre a célra megfelel egy jó optikai felbontású szkennel, de speciális, kalibrálható, pixeldenzitást vagy **fluoreszcenciát detektáló berendezések** is kaphatók. A kiértékeléshez **speciális szoftverek** vásárolhatók. A proteineket automata pipettavégekkel, illetve szofisztikált, erre a célra kifejlesztett berendezésekkel vágthatjuk ki a gélekből (pontos foltkivágás, microplate-re helyezés).

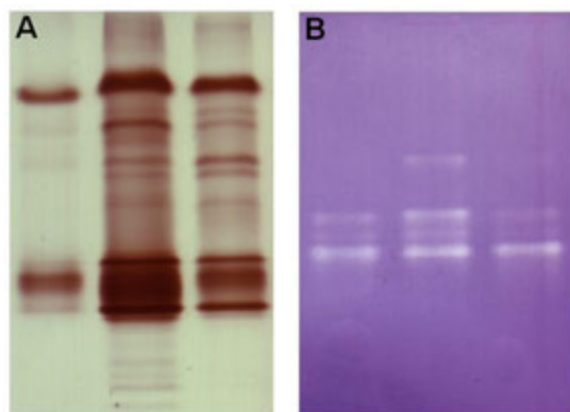
Az **autoradiográfiás detektálás** során radioaktívan jelölik a proteint, ami történhet a szintézis során, vagy radioaktív anyagokkal való kezeléssel, úgymint ^3H - vagy ^{14}C -danzil-klorid vagy ^{14}C -, ^{35}S -fenilizocianát rákötésével, ^3H - vagy ^{14}C -jódacetamiddal történő alkilálással, ^3H - vagy ^{14}C -formaldehiddel történő redukív metilációval vagy a Tyr jodinációjával (^{125}I). A detektálás során a szárított gélt Röntgen-filmre helyezve a sugárzás hatására az AgCl -ből Ag válik ki, a feketedés fotózható, denzitometrálnak. Ha oldható gélekkel dolgoztunk, a géleket szeletelés után feloldjuk, és szcintillációs számlálóval mérjük a radioaktivitást.

Glikozilált proteinek (**glikoproteinek**) kimutatására fukszin-alapú Schiff- (PAS-) festés a legelterjedtebb módszer, a legérzékenyebb módszerek közé azonban olyan kimutatások tartoznak, mint a timol-szulfáton, vagy az akár 40 ng szénhidrátot is kimutatni képes danzil-hidrazinon alapuló festés. A lektinek speciális, szénhidráthoz kötődő fehérjék. Izotóppal, fluoreszcens festékekkel jelölt vagy enzim-konjugált lektinokkal ugyancsak detektálhatók a glikoproteinek a gélekben.

Foszforilált proteinek kimutatására nukleinsavaktól tökéletesen megtisztított minta esetében van lehetőség. A kimutatásra fel lehet használni *in vivo* izotóppal jelölt mintákat, hiszen a ^{32}P a fehérjékbe csak foszforilációval épül be. A nem-radioaktív kimutatási technikák közül legérzékenyebb az alkalikus hidrolízissel szabaddá váló foszfátcsoport oldhatatlan kalcium-foszfáttá történő alakítása, és ammónium-molibdát és metilzöld festék segítségével történő kimutatása (foszfomolibdát képződik). A módszer kimutatási határa 1 nmol foszfát körül mozog. Rodamin- β -foszfomolibdát kialakításával a kimutathatóság határa 2-3-szorosára növekszik.

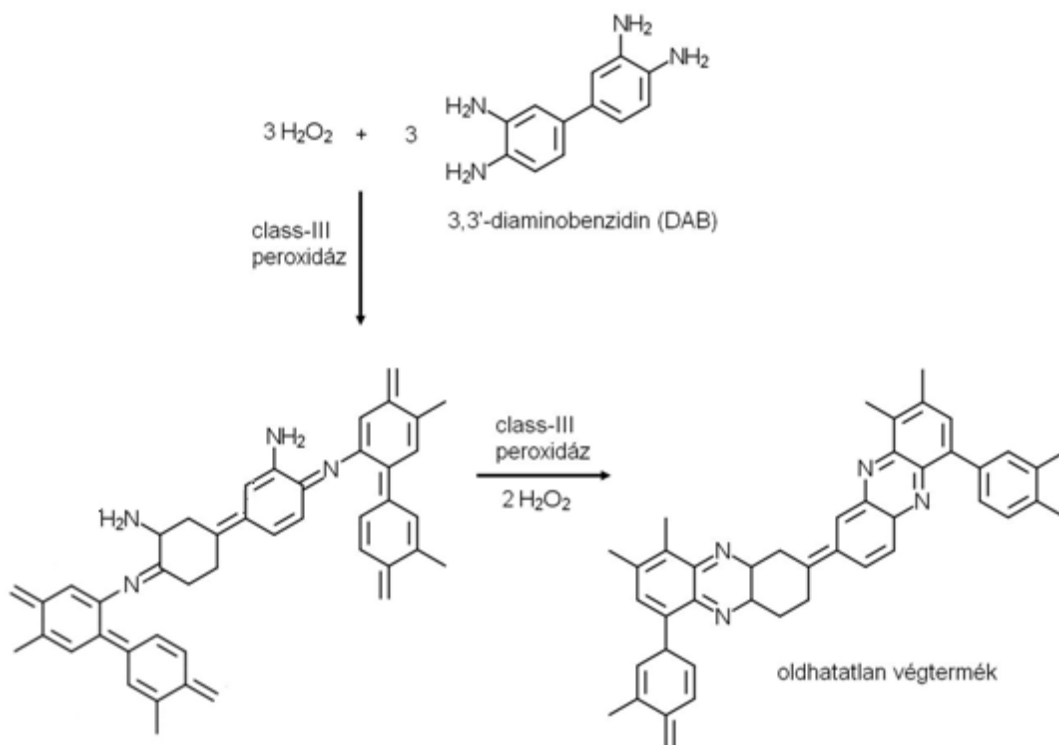
A **lipoproteinek** detektálása történhet elektroforézis utáni kimutatással (pl. Schiff-festés alapú módszerek), illetve futtatás előtti festési módszerekkel (pl. *nitroblue tetrazólium*: NBT, acetilált *Sudan black B*), melyek ideális esetben nem, vagy csak kevésbé zavarják az elektroforézist.

Enzimek **aktivitásfestése** gélekben leggyakrabban *in situ* színreakcióval történik (8.9. ábra). A módszerek szemi-kvantitatívak, és viszonylag kevés enzim festésére jól kidolgozottak. Használatukkal azonban lehetővé válik egy adott enzimreakciót mutató fehérjesáv kimutatása más fehérjék jelenlétében. Az enzimfehérjéket, aktivitásuk megőrzése érdekében, csak natív körülmények között választhatjuk el, ami csökkenti az elválasztás hatékonyságát, bár ismert néhány példa, pl. humán hasnyálmirigy enzimek közül, amikor az enzimek SDS-PAGE elválasztás után is jó enzimaktivitást produkálnak.



8.9. ábra. Enzimfehérjék aktivitásának kimutatása *in situ* aktivitásfestéssel. (A) A peroxidáz izoformák hidrogén-peroxid jelenlétében aromás monomereket oxidálnak színes végtermékké. (B) A szuperoxid diszmutáz izoformák hidrogén-peroxidot bontanak, így aktivitásuk helyén a gél nem színeződik el (negatív festés).

Redoxreakciókban tetrazólium sókat (NBT; metil-tiazolil-tetrazólium: MTT) lehet használni a kimutatáshoz, melyek végső elektron-akceptorként redukálódva színes végterméket eredményeznek. Peroxidáz enzimreakciók kinonos és benzidin jellegű szubsztátokkal mutathatók ki (8.9.A és 8.10. ábra). Az enzimreakció gélben történő kimutatásához a szubsztátnak be kell jutnia a gélbe, valamint a keletkező színes, vagy fluoreszcenciára képes terméknek nem, vagy csak kis mértékben szabad a gélben diffundálni. Minden enzimreakció pH optimummal rendelkezik, amelyet a gél megfelelő pH-jú pufferben történő inkubálásával tudunk elérni. Ritkán használt módszer a szubsztátok poliakrilamid gélbe történő szilárdítása a gélelektroforézist megelőzően.



8.10. ábra. Peroxidáz enzimreakció kimutatása poliakrilamid gélben. A szubsztátként felhasznált benzidin-vegyület a peroxidáz enzim aktivitása következtében hidrogén-peroxid jelenlétében polimerizál, majd egy következő enzimatis lépésben oxidatív ciklizálódik, így oldhatatlan, gélben maradó színes végtermék keletkezik.

8.1.7. A gélek tárolása

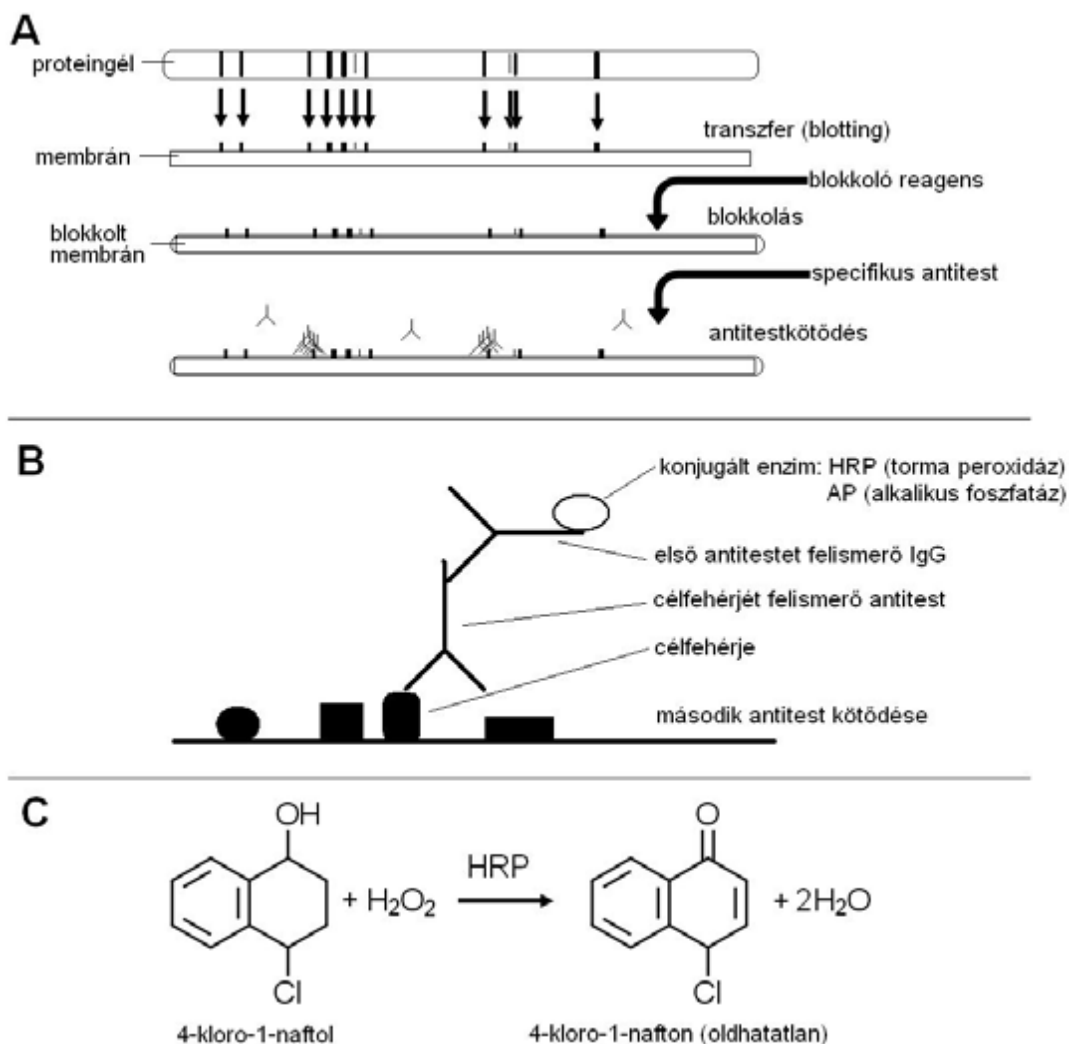
A géleket tárolhatjuk is. A tárolás történhet nedvesen (a tároló oldatban, tasakba hegesztve), illetve szárítás után. A szárítás előtt a géleket egy éjszaka 5-szörös térfogatú 1% (v/v) glicerint és 10% (v/v) ecetsavat vagy 30% (v/v) metanolt és 3% (v/v) glicerint tartalmazó oldatban áztatjuk a szárítás közbeni törés megakadályozására. Ezután szűrőpapírra helyezve, melegítőszárítóban vagy egy keret felhasználásával, a fenti oldattal megnedvesített cellofán lapok közé feszítve levegőn szárítjuk.

8.1.8. Az elválasztott proteinek jellemzése/azonosítása

A legegyszerűbb jellemző a **MW**, amely a teljesen denaturált fehérjék SDS PAGE-sel történő elválasztásakor határozható meg. A MW-et általában dalton (Da), illetve inkább kDa egységekben fejezik ki. 1 Da a ^{12}C (6 proton + 6 neutron) tömegének 1/12-ed része. Denaturáló körülmények közt elválasztott fehérjék MW-ét azonos körülmények közt futtatott standard fehérjék MW-e alapján készített kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg: a R_f – a jelzőfestékhez viszonyított mobilitás – függvényében ábrázolva log MW-et a géltől függően különböző MW tartományban egyenest kapunk. 5%-os gélben kb. 60-200 kDa, 10%-osban 15-70 kDa, 15%-osban 12-45 kDa-os tartományban egyenes a kalibrációs görbe. A MW meghatározás akkor reális, ha az SDS kötés nem anomális. (Anomália: pl. a glikoproteineknél, amikor csak a protein része köt megfelelő mennyiségű SDS-t, tehát a csökkent felületi töltéssűrűség miatt a MW nagyobbak adódik.) Növekvő T%-os géleken futtatva a mérettől függő szűrőhatás egyre inkább előtérbe kerül és így a látszólagos MW egyre jobban közelít a valódihoz.) Gradiens gélekben a log T% (lineáris gradiens log R_f) és a log MW között van lineáris összefüggés. 7-25%-os (C=1%) gélekben a 14-330 kDa, 5-20%-osban (C=2,6%) 14-210 kDa, 3-30%-osban (C=8,4%) 13-950 kDa-os tartományban egyenes a kalibrációs görbe. A gradiens géleken tehát a kalibrációs görbe szélesebb MW tartományban lineáris, mint a homogén pórusméretű géleken. A standard protein keverékek különböző MW tartományban állnak rendelkezésre. Előre festett standard proteinek is kaphatók, amelyek a western blot-nál (ld. lejjebb) jól használhatók.

Információt nyerhetünk a proteinekről **peptid térképezés** (*peptid mapping*) segítségével is. Ezzel a módszerrel eldönthetjük, hogy két minta ugyanolyan mobilitású sávjában futó proteinek azonosak-e, illetve ugyanazon mintában a különböző helyen futó proteinek közt van-e hasonlóság (prekurzor-produktum vagy oligomer-monomer kapcsolat). E kérdések eldöntésére a proteinekből specifikus peptid fragmentumokat állítanak elő. Specifikusak abból a szempontból, hogy adott aminosavak közt történik a hasítás, és a peptid fragmentumok nem túl kicsik. A fragmentálás különböző kémiai vagy enzimatisz módszerekkel történhet. Bármely módszer, ami specifikusan hasítja a fehérjét, alkalmas erre a célra, mint a proteázok alkalmazása, savas hidrolízis (Asp-Pro), hidroxilaminos vágás (Asn-Gly), cianogén-bromiddal történő hasítás (Met). A peptidok azonosítása történhet MW meghatározással (SDS-PAGE), immunológiai (*western blotting*, ld. lent), illetve aminosav szekvencia alapján (Edman-degradáció, tömegspektrográfia, ld. később).

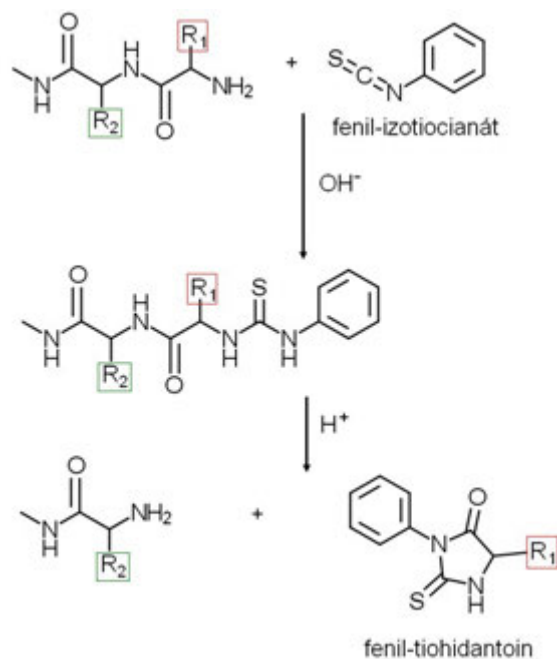
Egyes fehérjék azonosítására használhatunk immunológiai módszereket (***western blotting***). A blotolás során az elválasztott fehérjét egy vékony hordozóra transzferáljuk, amelynek a felületén a proteinek hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatásokkal kötődnek (8.11. ábra).



8.11. ábra. *Western blotting.* (A) A fehérjéket a gélből a hordozó felületére visszük át elektroforézissel (transzfer), majd a hordozó fehérjét nem kötő részeit fehérjeszerű anyaggal fedjük le (blokkolás). A vizsgálni kívánt fehérjét specifikus antitesttel reagáltatjuk. (B) A specifikus antitest-fehérje komplexhez a specifikus antitesthez kötődő második antitestet kötünk, amely egy enzimet köt. (C) Az enzimreakció termékét színes végterméket adó reakcióval mutatjuk ki.

A hordozó lehet nitrocellulóz membrán (általában 0,45 µm pórusméretűt használnak, de kis proteineknel a 0,22 µm-es a jobb), illetve nylon membrán (erősebb, nagyobb proteinkötő kapacitású, de immunológiai detektálásnál vagy festésnél az erősebb kötőképesség miatt nagyobb nem specifikus antitestkötés, illetve sötétebb háttér figyelhető meg). A blottolás fűlszárász és nedves rendszerben is végezhető. A fűlszárász rendszer kevésbé effektív nagy molekulák esetében. A transzfer hatékonysága növelhető a transzfer idejének növelésével, illetve 0.01% SDS-t is adhatunk a transzfer pufferhez, de ez redukálja a nitrocellulózhoz való kötődést is. A transzfer hatékonysága nyomon követhető színes protein standard-ek blottolásával. A transzferre azért van szükség, mivel a nagyméretű antitestek a gél szűk pórusain keresztül nehezen jutnak el a protein antigénekhez, míg a membránok felszínén kötődő proteinek könnyen hozzáférhetők. A blott azonnal analizálható, vagy 2-8 °C-on néhány hónapig eltartható. A specifikus antitest hozzáadása előtt, a nagyméretű aspecifikus antitestkötődés (ez is fehérje) gátlása céljából, a membránok transzferált proteinek nem kötő helyeit blokkoljuk, azaz inert, fehérjetermészetű anyagokkal (pl. zselatin, szérum albumin) borítjuk. Ezután, specifikus poliklonális vagy monoklonális antitesttel reagáltatjuk a membránra átvitt fehérjéket. A protein-antitest komplexet úgy mutatjuk ki, hogy anti-IgG-enzim komplexet kötünk hozzá, majd az enzim szubsztrátjával történő reakcióját színes végterméket adó reagenssel láthatóvá tesszük. A reakció érzékenységét növelhetjük sokszoros enzimműköttéssel vagy fluoreszcens módszerrel (anti-IgG-fluoreszcens anyag komplexet kötünk a specifikus antitesthez) történő kimutatással. Ugyanazon a blotton, egymást követően néhány reakció lejátszható, ha a próbát minden alkalommal eltávolítjuk.

A nem blokkolt N terminálist tartalmazó fehérjékből az N-terminális peptid meghatározható **Edman-lebontással** is (8.12. ábra). A kapott peptid szekvenciákat az ismert nukleotid/fehérje szekvenciákkal összevetve a protein azonosítható.



8.12. ábra. Edman-lebontás. A polipeptid N-terminális aminosavát (R_1 oldallánc) fenil-izotiocianát hozzáadásával fenil-tiohidantoin- R_1 komplex formájában lehasítjuk. A lehasított funkciós csoportot azonosítjuk. A reakció ismétlésével az N-terminális szekvencia aminosavról aminosavra meghatározható. A szekvenciát adatbázisokkal összevetve a protein azonosítható.

A leggyakrabban **tömegspektrográfias** módszerrel azonosítják a proteineket. A proteinfoltokat/sávokat kivágják a gélből és eltávolítják a festéket. Ezután specifikus proteázzal emésztik, leggyakrabban tripszinnel, ami a Lys és Arg C-terminális oldalán hasít. Így 0,5-2 kDa méretű peptidekre bontják a proteint. Ezután MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight) vagy ESI-Q-TOF (ElectroSpray Ionisation Quadrupole Time-of-Flight) módszerrel peptideket választanak el. A MALDI TOF spektrumok esetében a tömeg/töltés (m/z) függvényében kapják a peptid intenzitást. Az m/z peptid összetételt összehasonlítva az adatbázisokból nyert szekvenciák elméleti hasításával előállítható peptidek m/z értékeivel azonosítják a proteint. Az ESI-Q-TOF esetében a peptidek közül a kiválasztottat tovább hasítják, és az így nyert kis darabok m/z aránya alapján szekvenciák nyerhetők, amiből az adatbázisok alapján a protein azonosítható. Tömegspektrográfiával inkább csak kvalitatív információk nyerhetők, kvantitatív meghatározásra kevésbé alkalmas.

A fehérjéket jellemezhetjük/azonosíthatjuk specifikus reakciók alapján is. Ezek a fehérjék valamilyen módosítására (foszfoproteinek, glikoproteinek, lipoproteinek), illetve aktivitására (enzimreakciók) utalnak (ld. detektálás).

8.2. PAGE gyakorlatok

Vigyázat!

A polimerizálatlan akrilamid idegméreg. (A polimerizáció sohasem 100%-os!) A TEMED rákkeltő, a többi anyag hatása nem kellőképpen tisztázott.

Kesztyűben dolgozzunk! Automata pipettával mérjük be az oldatokat!

8.2.1. A fehérjék elválasztása denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE)

Gélöntés: A gélek elkészítéséhez szükséges elegyek összemérése előtt helyezzük a gélkazettákat az öntőkádba. A szeparáló gél 10-18-os (w/v) lineáris akrilamid gradienst, 0,375 M Trisz-HCl-t (pH 8,8), 10% glicerint (v/v) és 0,1% (w/v) SDS-t, a tömörítő gél 5% (w/v) akrilamidot, 0,125 M Trisz-HCl-t (pH 6,8), 10% glicerint (v/v) és 0,1% (w/v) SDS-t tartalmaz. Az akrilamid-biszakrilamid arány 30:0,8. A polimerizációt a szeparáló gélben 0,013-0,017% (v/v) TEMED gradiens és 0,04% (w/v) AP, a tömörítő gélben 0,055% (v/v) TEMED és 0,1% (w/v) AP hozzáadásával indítjuk. A gélöntéshez (4 db 7x10 cm-es 1,5 mm vastag gél) a következő elegyeket állítsuk össze (8.1. táblázat):

8.1. táblázat. Denaturáló poliakrilamid gél összemérése

	Szeparáló		Töm.
	10%	18%	5%
% akrilamid	10%	18%	5%
B (szep.), C (töm.)	4,0 ml	4,0 ml	5,0 ml
A	2,7 ml	4,8 ml	1,7 ml
60 % (w/v) szacharóz	0,8 ml	2,4 ml	-
Glicerín	1,6 ml	1,6 ml	2,0 ml
Bidv	6,8 ml	2,1 ml	11,0 ml
10% (v/v) TEMED	25 µl	20 µl	110 µl
10% (w/v) AP	60 µl	60 µl	220 µl
Σ	16 ml	16 ml	20 ml

Alárétegzéshez: 3 ml 30%-os (w/v) szacharóz.

Az összetevőket az AP oldat kivételével szívópalackban mérjük össze, majd az oldott levegőt vízlégszivattyúval távolítjuk el (kb. 0,5-1 min). Az AP hozzáadása után a gélelegyeket azonnal gradiens keverőn keresztül az előkészített öntőkádba juttatjuk, majd 30%-os szacharóz oldatot rétegzünk alá azért, hogy a géloldat teljes egészében a kazettákba kerüljön. A polimerizáció után (a víz és a gélkeverék közti éles határfelület eltűnik, majd újból megjelenik) a vizet szűrőpapír csíkkal leszívátjuk, ráöntjük a szeparáló gélelegyekhez hasonlóan előkészített tömörítő gélelegyet, és beletesszük a mintahelyek kialakítására szolgáló fésűket. A 6%-nál töményebb géleket a tökéletes polimerizáció érdekében a felhasználás előtt egy nappal öntjük.

Szolubilizáció: A tilakoid membránokat (0,3 mg klorofill ml⁻¹ ~ 1 mg fehérje ml⁻¹) szolubilizáló pufferben (62,5 mM Trisz-HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 2% (w/v) DTT, 10% (v/v) glicerín és 0,001% (w/v) brómfenolkék), szobahőmérsékleten 30 percig inkubáljuk. (A tetszőleges pufferben lévő membránfehérjékhez 1/3 térfogatban 3-szoros töménységű szolubilizáló puffert adunk – maximum 1 mg fehérje ml⁻¹). A nem szolubilizálódott anyagot centrifugálással (5 min, 10000 g) távolítjuk el.

Elektroforézis: Tegyük a kész géleket a készülékbe. 20-50 µg fehérjét tartalmazó szolubilizált mintát vagy 5 µg fehérjét tartalmazó standard fehérjekeveréket vigyünk fel a mintahelyekre. Töltsük fel a készüléket tartálypufferrel (0,025 M Trisz, 0,192 M glicin (pH 8,3), 0,1% (w/v) SDS). Az elektroforézist hűtőszekrényben, 20 mA/lap állandó áramerősséggel végezzük, amíg a jelzőfesték eléri a gél végét (~2 h).

Egyszerű festés: A géleket 50% (v/v) metanolt, 7% ecetsavat (v/v) és 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250-et tartalmazó oldattal festjük legalább 3 órán keresztül. A háttérfestődés eltávolítása érdekében a géleket

30%-os (v/v) metanolt és 10% (v/v) ecetsavat tartalmazó oldatban mossuk a háttér elszíntelenedéséig. Fixálás, festés és mosás közben a géleket folyamatosan billenő asztalon rázatjuk. A tárolás 7%-os (v/v) ecetsavban történik.

Blue Silver módszer: A géleket 50% (v/v) metanol, 2% (w/v) foszforsav elegyében fixáljuk (legalább 1 h). Ezután 3x20 min bidv-zel mossuk. A festés 0,12% (w/v) CBB G-250-et, 10% (w/v) ammóniumsulfát, 10% (w/v) foszforsav, 20% (v/v) metanol elegyében történik (1-2 h, vagy amíg a sávok erősen festődnek). A háttérfestődést bidv-es mosással távolíthatjuk el, ha szükséges, és a gélek tárolása is bidv-ben történik.

A gélek értékelése: A megfestett géleket szkennelt/fényképezett képről értékeljük. A géleket szkennelés vagy fényképezés céljából – árnyéksávok megjelenésének elkerülése érdekében – alulról kell megvilágítani. A szkennelt gélek sávdenzitását denzitometrálo programmal (Phoretix 4.01, Phoretix International, Newcastle-upon-Tyne, UK) értékeljük. A MW meghatározásához kalibrációs görbét készítünk: a standard fehérjék MW-ének logaritmusát a T% (az összes monomer %-a a gélben, a szeparáló gél elejétől a végéig 10,3%-18,5% között változik) logaritmusának függvényében ábrázoljuk. Az ismeretlen fehérjék MW-ét a szeparáló gél elejétől mért futási távolságukból számolt T% ismeretében, a kalibrációs görbe felhasználásával határozzuk meg.

8.2.2. Enzimek elválasztása natív poliakrilamid gélelektroforézissel

Mintakészítés: 100 mg friss növényi anyagot 1 ml izoláló elegyben (50 mM Na-K-foszfát puffer (pH 7,8), 2 mM MgSO₄, 2 mM EDTA, 2% (w/v) nem oldódó polivinil-pirrolidin) homogenizálunk. A szolubilis proteineket 10 min 15000 g centrifugálást követően a felüliszóban kapjuk.

Szolubilizálás: A mintákat futtatás előtt enyhén szolubilizáljuk 5 mM Trisz-HCl (pH 6,8), 0,01% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerin, 0,001% (w/v) brómfenolkék oldatban.

Elektroforézis: Ugyanúgy történik, mint a denaturáló PAGE, de a gélpufferek nem tartalmaznak SDS-t, és a kádpufferhez is csak 0,001% (w/v) SDS-t adunk. Az enzimpreparátumot szolubilizálás nélkül, de 10% (v/v) glicerin hozzáadva visszük fel a géltre.

Aktivitásfestés:

Class-III peroxidázok (POX; E.C.1.11.1.7.) hem kofaktorral működő enzimek, amelyek H₂O₂ felhasználásával oxidálnak fenolos és kinon típusú vegyületeket. A pozitív színreakció előhívását 2 mM benzidin (DMSO-ban oldva), 3 mM H₂O₂, 50 mM K-acetát puffer (pH 4,5) jelenlétében végezzük (30 min). A POX enzimreakció a benzidin konjugációját okozza, ezért az enzim izoformák aktivitásának helyén barna színreakciót kapunk. A reakció bidv-es mosással történő leállítást követően a géleket 50% metanolban fixáljuk.

A szuperoxid diszmutázok (SOD; E.C. 1.15.1.1.) fém kofaktorral működő enzimek (megkülönböztetünk FeSOD, MnSOD és Cu/ZnSOD típusú enzimeket, melyek közül a FeSOD és MnSOD enzimek egymás rokonai, míg a Cu/ZnSOD izoformák nem mutatnak az előző kettővel szekvencia homológiát), a szuperoxid anion gyök (O₂⁻) vízzé és hidrogén-peroxiddá történő diszmutációs reakcióját katalizálják a reaktív oxigénformák (ROS) elleni védekezés kezdő lépéseként. A SOD izoformák kimutatása negatív színreakcióval történik. A gélt 50 mM Na-K-foszfát puffer (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin, 60 μM riboflavin, 2,25 mM nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) oldatában történő 15 perces sötétben történő előinkubáció után 30 percre megvilágítjuk. Megvilágítás hatására a riboflavin a metioninnal O₂⁻ gyököket generál, melyek az NBT-vel reagálva lila színreakciót adnak. A SOD enzimreakció mellett a lila elszíneződés elmarad, így a gélben aktív enzimek helyén negatív (nem festődő) sávok tűnnek elő. A reakció bidv-es mosással történő leállítást követően a sávokat azonnal detektáljuk.

A gélek értékelése: A szkennelt gélek sávdenzitását denzitometrálo programmal értékeljük.

8.2.3. Izoelektromos fókuszálás (IEF)

Proteinextrakció: A fehérjeoldatból 80% (v/v) acetont és 0,07% (v/v) β-mekaptoetanolt tartalmazó oldattal -20 °C-on kicsapjuk a fehérjéket (1 éjszaka, de minimum 1 h). A kicsapódott fehérjéket centrifugálással ülepítjük (10 min, 14000 g), egyszer mossuk a fenti oldattal (felszuszpendálva 1 órát állni hagyjuk, majd újra centrifugáljuk). A fehérje csapadékot nyitott Eppendorf csőben -20 °C-on vagy nitrogéngázzal beszárítjuk.

Rehidratáció: Készen vett *strip*-eket használunk. 7 cm-es *strip* esetén 50 µg proteint viszünk fel 125 µl rehidratáló oldatban: 2 M tiourea, 8 M urea, 20 mM Trisz, 4% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0,05% (w/v) n-dodecil-β-D-maltozid, 2 mM PMSF, 0,5% (v/v) amfolin (pH 3-10). Az oxidáció elkerülésére kőolajdesztillátumot rétegzük a *strip* fölé. A rehidratáció 24 °C-os termosztátban (1 éjszaka, de minimum 2 h) történik.

Elektroforézis: Az elektroforézist állandó feszültségen, kőolajdesztillátum alatt végezzük a következő program szerint (8.2. táblázat):

8.2. táblázat. Izoelektromos fókuszálás részfolyamatai

	Feszültség	Idő	V – h	Mód
1)	250 V	20 min	-----	Lin,
2)	4000 V	2 h	-----	Lin,
3)	4000 V	-----	10000	Gyors
Totál	-----	~5 h	14000	-----
4) [opcionális]	500 V	leállításig	-----	-----

Az elektroforézist követően a *strip*-ek -80 °C-on, kőolajdesztillátum alatt tárolhatók.

A második dimenziós futtatás előtt a *strip*-eken elvált, az pI pontjaiknál denaturálódott proteineket két lépésben szolubilizáljuk. A lecsurgatott *strip*-eket 6 M urea, 0,375 M Trisz (pH 8,8), 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerin, 2% (w/v) DTT oldatban (10 min), majd 6 M urea, 0,375 M Trisz (pH 8,8), 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerin, 2,5% (w/v) jó-d-acetamid oldatban (10 min) inkubáljuk. Ennek a célja, hogy a kicsapódott proteineket visszaoldjuk (SDS), denaturáljuk (redukálószer és SDS), illetve a denaturált állapotot fenntartsuk (alkilálószer). Az optimális szolubilizálás eléréséhez fontos az inkubációs idők betartása. A második inkubáció után a *strip*-ekről a denaturáló elektroforézishez használt kádpufferrel le kell öblíteni a szennyeződésként rajta maradt kőolajdesztillátumot. A *strip*-eket brómfenolkéket tartalmazó, 0,5% (w/v) agarózzal szilárdított kádpufferben buborékmentesen rögzítjük a denaturáló gél tetejére.

8.2.4. Natív állapotú fehérjekomplexek elválasztása „blue-native” poliakrilamid gélelektroforézissel (BN-PAGE)

Gélöntés: A gélek elkészítéséhez szükséges elegyek összemérése előtt helyezzük a kazettákat az öntőkádba. A szeparáló gél 5-12%-os (w/v) lineáris akrilamid gradienst, 50 mM Bisz-Trisz-HCl puffert (pH 8,8) és 500 mM 6-aminokapronsavat, a tömörítő gél 4% (w/v) akrilamidot, 50 mM Bisz-Trisz-HCl puffert (pH 8,8) és 500 mM 6-aminokapronsavat tartalmaz. Az AA/Bis arány 32:1. A polimerizációt a szeparáló gélben 0,03-0,05 % (v/v) TEMED gradiens és 0,03-0,05% (w/v) AP gradienst, a tömörítő gélben 0,1% (v/v) TEMED és 0,1% (w/v) AP hozzáadásával indítjuk. A gélöntéshez (4 db 7x10 cm-es 1,5 mm vastag gél) a következő elegyeket állítsuk össze (8.3. táblázat):

8.3. táblázat. BN-PAGE összemérése.

	Szeparáló		Tömörítő
	5%	12%	4%
% akrilamid	5%	12%	4%
3xGB	5,5 ml	5,5 ml	7 ml
AB	1,7 ml	4,1 ml	1,75 ml
60% (w/v) szacharóz	0,8 ml	2,5 ml	-
Glicerin	1,6 ml	1,6 ml	2,1 ml
Bidv	6,8 ml	2,7 ml	9,0 ml
TEMED	8 ul	5 ul	20 ul
10% (w/v) AP	80 ul	50 ul	200 ul
Σ	16,5 ml	16,5 ml	20 ml

Alárétegzéshez: 3 ml 30%-os (w/v) szacharóz.

Mintaelőkészítés: A membránokat 330 mM szorbitolt, 50 mM Bisz-Trisz-HCl-t (pH 7,0) és 250 µg ml⁻¹ Pefabloc-ot (proteáz gátló) tartalmazó pufferben felfuszpendálva és centrifugálva (10 min, 10000 g) mossuk.

Szolubilizálás: A membránokat 750 mM 6-aminokapronsavat, 50 mM Bisz-Trisz-HCl-t (pH 7,0), 0,5 mM EDTA-t, 250 µg ml⁻¹ Pefabloc-ot és 2% (w/v) n-dodecil-β-D-maltozidot tartalmazó szolubilizáló pufferben (0,5 mg ml⁻¹ klorofill vagy 50-100 µg fehérje) 0°C-on inkubáljuk (30 min). A nem szolubilizálódott membránokat centrifugálással (20 min, 20000 g, 4 °C) távolítjuk el. 100 µl felülúszóhoz 20 µl 750 mM 6-aminokapronsavat és 5% (w/v) Serva Blue G-t (SBG) tartalmazó oldatot adunk.

Elektroforézis: Tegyük a kész géleket a készülékbe. Töltsük fel a kádat felső (15mM Bisz-Trisz, 50 mM Tricin (pH 7,0), 0,02% (w/v) SBG) és alsó (50mM Bisz-Trisz, pH 7,0) tartálpufferrel. 20 µl szolubilizált anyagot vagy szolubilizáló puffert (üres helyek) vigyünk fel a mintahelyekre. Az elektroforézist hűtőszekrényben, először 15 min 40 V állandó feszültséggel (5 mA/gél) végezzük, majd 120 V állandó feszültséggel, amíg a front eléri a gél közepét (~60 min). Ezután kicseréljük a felső puffert festék nélküli pufferre, és addig futtatjuk, míg a festék eléri a gél végét (~ 3 h).

8.2.5. Western blotting

Transzfer: a géleket buborékmentesen a blottoló pufferrel (25 mM Trisz, 192 mM glicin, pH 8,3, 20 % (v/v) metanol – ez utóbbi csökkenti a gél méretváltozását, elősegíti a nitrocellulóz fehérjekötését) megnedvesített nitrocellulóz membránra helyezük, és a tartót megnedvesített szűrőpapírokkal kibélelve (hogy a gél és a membrán egymáshoz képest ne mozdulhasson el) a blottoló kádba tesszük. A blottolás 3 óra hosszat, 4-6 °C-on, 90 V állandó feszültségen (<0,4 A) történik.

Minden további folyamat szobahőmérsékleten történik miközben billenő asztalon rázatjuk a membránokat.

Blokkolás (csökkenti a nem-specifikus antitest-kötődést a fehérjét nem kötő membránrészekben): a bidv-zel alaposan lemosott membránokat 60 percig infralámpával melegített 3 % (w/v) zselatint tartalmazó TBS-ben (Tris Buffered Saline: 20 mM Trisz, 500 mM NaCl, pH 7,5) rázatjuk.

Specifikus antitestkezelés (specifikus kötődés az adott proteinhez): antitest pufferben (1% [w/v] zselatin TBS-ben) megfelelő koncentrációban oldott antitesttel rázatás 1 éjszakán keresztül (műanyag zacskóba hegesztve kevesebb antitest szükséges).

Mosás: 2 x 20 min rázatás TTBS oldatban (0,05% Tween 20-tartalmú TBS-ben – a nem specifikusan kötődő antitest eltávolítására), majd 2 x 20 min TBS-ben.

2. antitestkezelés: 2 óra inkubálás 60 ml antitest pufferben, amely 20 µl második antitestet (minden, az adott állatból származó első antitesttel reagál, és egy kötött enzim van rajta) tartalmaz.

Mosás: 2 x 20 min rázatás TTBS oldatban, majd 2 x 20 min TBS-ben.

Előhívás: Keverjük össze 100 ml 60 µl 30%-os H₂O₂-t tartalmazó 4 °C-os TBS-t 20 ml 60 mg HRP (*horse radish peroxidase*) reagenst (fényérzékeny) tartalmazó -18 °C-os metanollal (frissen készítendő). A keverékben rázogassuk a membránokat (lejártsódnak az enzimreakció és a színreakciók), míg a sávok, foltok elég erősen látszanak. Az enzimreakciót bidv-es mosással állítjuk le.

Értékelés: A membránokat szkenneljük/fényképezzük, és denzitometráló programmal kiértékeljük.

8.2.6. Proteinek elektroforézisekor felmerülő gyakori problémák

1. A nagy T%-os gél törik a polimerizáció alatt - nagy a hőképződés, hűtsük le az oldatokat.
2. A gél buborékokat tartalmaz a polimerizáció után - az oldatokat gáztalanítsuk.

3. A tápegység nem mutat áramerősséget - valahol rossz a kontaktus.
4. A kiindulási feszültség (állandó áramerősséggel való futtatáskor) eltér a szokásostól - nem jó a puffer, illetve valahol elektromosan áttereszt a rendszer.
5. Az elválasztás után a sávok nem egyenesek
 - a. a gélek vagy a mintahelyek a polimerizáció vagy átrakás során torzultak (~),
 - b. nem megfelelő a kontaktus a gél és az üveg vagy a gél és távtartó közt (?),
 - c. „smile-effect” (∩) - az elektroforézis során a gél túlmelegszik a túl magas alkalmazott áramerősség vagy a nem megfelelő hűtés miatt.
6. A festés után a gél teteje festődik (oldhatatlan proteinek a gél tetején)
 - a. a gél T%-a nem megfelelő,
 - b. túl alacsony a denaturáló ágensek koncentrációja,
 - c. túl alacsony a minta pH-ja (pl. TCA-as koncentráció után),
 - d. a diszkontinuus rendszer nagyon koncentrált a proteineket, amelyek aggregálódtak,
 - e. a minta hőkezelése túl magas hőmérsékleten történt, a proteinek aggregálódtak,
 - f. nem megfelelően távolítottuk el a nem szolubilizálódott anyagokat centrifugálással.
7. A protein kenődik a gél egész hosszában (a sávban a háttérfestődés magas)
 - a. nem megfelelő a szolubilizáció
 - b. kontamináció jelenléte
8. A sávmintázat nem reprodukálható (pl. nagymennyiségű kis móltömegű komponens jelenik meg proteolízis következtében) - proteázok adása, hőkezelés.

8.3. Irodalom

Maurer HR. (1971) Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, *Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1971.*

Hames BD, Rickwood D. (1990) Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, *Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, ISBN 0-19-963075-5.*

Rabilloud T. (2000) Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, ISBN 3-540-65792-4.*

Laemmli UK. (1970), Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685. – **SDS-PAGE**

Schägger H, von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane proteins in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231. – **Blue native PAGE**

Schägger H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**, 16-22. – **Kis molekulatömegű peptidek**

O'Farrell PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021. – **IEF/SDS PAGE**

Reisinger V, Eichacker LA. (2007) How to analyze protein complexes by 2D Blue native SDS-PAGE. *Pract. Proteomics* **1**, 6-16. – **BN/SDS PAGE**

Van den Bergh G, Arckens L. (2004) Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 38–43. – **DIGE**

Kameshita I, Fujisawa H. (1997) Detection of calcium binding proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **249**, 252–255. – **Fémkötő proteinek**

Rais I, Karas M, Schägger H. (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* **4**, 2567–2571. – **Hidrofób proteinek**

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333. – **Blue silver festés**

Merril CR, Pratt ME. (1986) A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal. Biochem.* **156**, 96–110. – **Ag festés**

Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**, 1102–1106. – **Peptid mapping**

Gershoni JM, Pallade GE. (1983) Protein blotting. Principles and applications, *Anal. Biochem.* **131**: 1. – **western blotting**

Dunbar BS. (1994) Protein Blotting: A Practical Approach, *Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo*, ISBN 0-19-963437-8. – **western blotting**

8.4. Függelék

Oldatok készítése:

Az AA oldhatósága 30 °C-os vízben 2 g ml⁻¹, oldata sötét üvegben, 4 °C-on 1-2 hónapig stabil (fény, ultrahang és γ -sugárzás hatására imid-hidak képződnek az amid csoportok intermolekuláris polimerizációjával). Hosszabb idő alatt hidrolizálhat akrilsav és NH₃ keletkezése közben (az akrilsav megköthető, ha az oldathoz kevés Dovex 1 vagy Amberlite IRA-400 bázikus ioncserélő gyantát adunk). A Bis oldhatósága 20 °C-os vízben 0,31 g ml⁻¹, oldata hasonlóan érzékeny, mint az AA. Az AP oldata maximum néhány napig stabil 4 °C-on tartva. Minden alkalommal friss oldat készítése ajánlott. A TEMED szintelen vagy halványsárga, olajszerű, kellemetlen szagú folyadék, amely sötét üvegben 4 °C-on eltartható. Az öregedés során sárgul.

Az oldatokat, ha másképpen nem jelöltük, 4 °C-on tartjuk.

SDS-PAGE

Akrilamid-biszakrilamid keverék (A: 60% AA, 1,6 % Bis, tárolás sötét üvegben)

60,0 g akrilamid (AA)

1,6 g Bis ad 100 ml bidv

4x tömény szeparáló gélpuffer (B: 1,4 M Trisz-HCl-t (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS-t)

18,17 g Trisz

0,4 g SDS ad 100 ml bidv

4x tömény tömörítő gélpuffer (C: 0,5 M Trisz-HCl-t (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS)

6,06 g Trisz

0,40 g SDS ad 100 ml bidv

3x tömény szolubilizáló puffer (3xL: 187,5 mM Trisz-HCl (pH 6,8), 6% (w/v) SDS, 6% (w/v) DTT, 30% (v/v) glicerin és 0,003% (w/v) brómfenolkék

7,5 ml glicerin

1,5 ml DTT

9,5 ml C

1,5 g SDS ad 25 ml bidv

4x tömény kádpuffer (0,1 M Trisz [pH 8,3], 0,768 M glicin, 0,4% SDS)

18,0 g Trisz
86,4 g glicin ad 1500 ml bidv

Blue silver festékkoldat (elkészítésénél fontos a jelölt sorrend betartása, tárolás szobahőmérsékleten, sötét üvegben!)

55 ml bidv
10 ml orto-foszforsav
10 g ammónium-szulfát (feloldani!)
0,12 g CBB G250 (feloldani!)
20 ml metanol (keverés közben) ad 100 ml bidv

BN PAGE

1,65 M szorbitol (tárolás -20 °C-on!)

30,63 g szorbitol ad 100 ml bidv

1 M Bisz-Trisz-HCl (pH 7,0)

20,92 g Bisz-Trisz ad 100 ml bidv

Mosó puffer (330 mM szorbitol, 50 mM Bisz-Trisz-HCl [pH 7,0], 250 µg ml⁻¹ Pefabloc)

0,5 ml 1 M Bisz-Trisz-HCl (pH 7,0)
2,0 ml 1,65 M szorbitol
2,5 mg Pefabloc ad 10 ml bidv

2M 6-aminokapronsav (AC)

13,12 g 6-aminokapronsav ad 50 ml bidv

Szolubilizáló puffer (750 mM 6-aminokapronsav, 50 mM Bisz-Trisz-HCl [pH 7,0], 0,5 mM EDTA, 250 µg ml⁻¹ Pefabloc and 2% (w/v) n-dodecil-β-D-maltozid) (tárolás -20 °C-on!)

0,1 ml 1 M Bisz-Trisz-HCl (pH 7,0)
0,75 ml 2M 6-aminokapronsav
5 µl 200 mM EDTA
0,4 ml 10% (w/v) n-dodecil-β-D-maltozid
0,5 mg Pefabloc ad 2 ml bidv

3x tömény gélpuffer (3xGB: 1,5M 6-aminokapronsav, 150 mM Bisz-Trisz-HCl, pH 7,0)

19,68 g 6-aminokapronsav
3,14 g Bisz-Trisz ad 100 ml bidv

Katód (felső) puffer (CB: 15mM Bisz-Trisz, 50 mM Tricin [pH 7,0] – nem kell beállítani a pH-ját!)

3,14 Bisz-Trisz
8,96 g Tricin ad 1000ml bidv

Kék katód puffer (15mM Bisz-Trisz és 50 mM Tricin [pH 7,0], 0,02% SBG) (tárolás szobahőmérsékleten!)

100 ml katód puffer

20 mg SBG

Anód (alsó) puffer (50mM Bisz-Trisz-HCl, pH 7,0)

20,93 g Bisz-Trisz ad 2000 ml bidv

Akrilamid-bisakrilamid keverék (AB: 48% (w/v) akrilamid, 1.5% (w/v) bisakrilamid, tárolás sötét üvegben)

24,0 g akrilamid (AA)

0,75 g bisakrilamid (Bis) ad 50 ml bidv

Szolubilizáláshoz SBG (750 mM 6-aminokapronsav, 5% (w/v) SBG)

0,375 ml 2M 6-aminokapronsav

0,05 g SBG ad 1 ml bidv

Western blotting

TBS (20 mM Trisz-HCl [pH 7,5], 500 mM NaCl) (tárolás szobahőmérsékleten)

4,84 g Trisz

58,44 g NaCl ad 2000 ml bidv

TTBS (20 mM Trisz-HCl [pH 7,5], 500 mM NaCl, 0,05% [w/v] Tween 20) (tárolás szobahőmérsékleten)

800 ml TBS

400 µl Tween 20

Aktivitásfestés

POX (50 mM K-acetát puffer [pH 4,5], 2 mM benzidin [DMSO-ban oldva], 3 mM H₂O₂)

1,4 ml 10% KOH

140 µl 100% CH₃COOH

18,5 mg benzidin (2 ml DMSO-ban oldva először!)

15 µl H₂O₂ ad 50 ml bidv.

SOD (50 mM Na-K-foszfát puffer [pH 7,8], 0,1 mM EDTA, 13 mM L-metionin, 60 µM riboflavin, 2,25 mM nitroblue-tetrazólium-klorid; sötétben tartandó!)

9,35 ml 500 mM Na₂HPO₄

0,65 ml 500 mM KH₂PO₄

25 µl 200 mM EDTA (pH 7,8)

97 mg L-metionin

1,1 mg riboflavin

92 mg NBT (nitroblue-tetrazólium-klorid) ad 50 ml bidv.

9. fejezet - RNS kinyerése növényekből

szerző: Dr. Rudnóy Szabolcs

9.1. Miért pont az RNS?

Miért is érdemes tanulmányozni az RNS-t? A sejtek és szövetek minden működését végső soron a génexpresszió szabályozza, amelyet a génektől a fehérjékig az RNS közvetít. A transzkripció, ill. génexpresszió változása számtalan tudományos kérdést vet föl, amelyek leggyakrabban egy vagy több transzkriptum mennyiségének megváltozása körül forognak. A legfontosabb ilyen kérdések:

1. Egy sejt (vagy egy kompartment) egy vagy több transzkriptumának *mennyisége* egyensúlyi állapotban, azaz a szintézis, a stabilitás és a lebontás nettó eredményeképpen. Ez a génexpresszió leggyakoribb vizsgált jellemzője, mivel a kinyerhető RNS-ből ez az információ szűrhető le legegyszerűbben. Az RNS mennyiségi és minőségi vizsgálatát sokféle módszer alkalmazása segíti (PCR-alapú technikák, Northern analízis, nukleázos emésztés, stb.).
2. A transzkripció *sebességének*, vagy az RNS-érés valamely folyamata *sebességének* mérése. Ehhez gyakran alkalmaznak radioaktív jelölésű nukleotidokat, amelyek beépülése egyenes arányban mutatja az adott RNS előfordulását. Ha Northern analízissel, vagy hasonló, olyan vizsgálattal kombinálják, amely az egyensúlyi állapotban fennálló RNS-szintet méri, a transzkripciós és a transzkripció utáni szabályozás is vizsgálható.
3. A transzkripciós kezdőpont meghatározása. Az mRNS-molekulák térképezését eredetileg nukleázos emésztéses módszerrel határozták meg: a keresett szekvenciához antiszensz szálát hibridizáltak, majd az összes többi, egyes szálú RNS-t erre specifikus nukleázzal elemésztették, végül a megmaradt RNS-t vizsgálták tovább. Manapság viszont inkább a RACE módszer (rapid amplification of cDNA ends) használatos, ahol az mRNS 3'- és/vagy 5'-végét sokszorozzák meg egy belső és egy, a molekula végén kötő, ún. horog primer segítségével. Mivel egy adott genetikai lokuszról, pl. szövetből függően, többféle mRNS szintetizálódhat és mindegyik más-más transzkripciós kezdőpontból, e pont meghatározása igencsak fontos lehet.
4. A komplementer DNS (cDNS) szintézise. Az instabil egyes szálú mRNS templátként szolgál a sokkal stabilabb egyes, vagy kettős szálú cDNS *in vitro* szintéziséhez. A cDNS-t PCR technikával szaporítják föl, pl. a következő célokból: mennyiségi meghatározás; transzkript-térképezés, vektorba ligálás (szekvenálás, vagy a kódolt fehérje expresszálása céljából); két vagy több cDNS elválasztása; ill. teljes cDNS-könyvtár létrehozása hosszabb távú tárolás és vizsgálat céljából. Ilyenkor az adott sejt/szövet „biokémiai pillanatfelvétele” készül el, ami sokáig az egyik legfontosabb, ugyanakkor legtöbb kihívást tartalmazó feladatnak számított a molekuláris biológiai laboratóriumokban.
5. A tisztított mRNS *in vitro* translációja. A keletkező fehérje tovább vizsgálható Western analízissel, vagy immunprecipitációval. A módszer annak eldöntésére is alkalmas, hogy ha egy lokuszról alternatív transzkripciós kezdőpontokkal többféle mRNS szintetizálódik, vajon mindegyik alkalmas-e a kódolt fehérje szintézisére? Fehérjék tervezésénél szintén elengedhetetlen a módszer, hiszen a keletkezett fehérje szerkezeti és funkcionális vizsgálataihoz szükség van az mRNS vizsgálatára és translációjára.

9.2. Néhány szó az RNS-ről

9.2.1. Az RNS általában

Az RNS ribonukleozid-monofoszfát (NMP) monomerekből álló, elágazás nélküli, láncjellegű polimer molekula, amelynek egységei foszfodiészter kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Mind a pro-, mind az eukariótákban létfontosságú vegyület típus. Alapvetően egyes szálú láncot képez, de ismertek kettős szálú RNS-molekulák is. Az RNS két fő különbsége kémiaiilag DNS-hez képest az uracil (U) bázis, ill. a ribóz cukormolekula jelenléte a timin (T), ill. a dezoxiribóz helyett. Ezekon kívül számos módosult bázis figyelhető meg az RNS-ben, különösen az rRNS és tRNS típusokban. E kémiai különbségek jelentős szerkezeti változásokat okoznak, így az RNS alapvetően egyes szálú struktúrában van jelen a sejtben, viszont képes saját láncán belül, ill. más nukleinsav molekulákkal

Watson-Crick bázispárokat kialakítani és kettős szálú szerkezeti elemeket képezni. Számos RNS összetett másodlagos és harmadlagos szerkezetet vesz föl (rRNS, tRNS, sok kis RNS), más típusok láncában a bonyolultabb szerkezeti elemek egyes szálú részekkel váltakoznak (sok mRNS). Az A-T bázispár helyett itt A-U pár jelenik meg, de az U képes ún. „lötyögő” bázispárt létrehozni guaninnal is. A kémiai különbség következménye az RNS kisebb fizikai stabilitása is: a ribóz 2'OH-csoportja nukleofil reakciókban vehet részt a szomszédos foszfodiészter kötéssel, pl. lúgos közegben, vagy (nehéz)fémionok hatására.

Sok különféle RNS-típust ismerünk, amelyek mindegyike szerteágazó és fontos funkciót lát el a sejt működésében. Az RNS alapvető szerepei közt tartjuk számon a transzkripció (mRNS), az érés vagy splicing (snRNS), a transláció (tRNS, tmRNS) és a transzkripció és azutáni szabályozás (miRNS, siRNS) folyamatait. A sejt RNS közvetítésével szintetizálja fehérjeit, amelyek aktivitását első szinten az RNS-anyagcsere befolyásolásával szabályozza. A már felhasznált mRNS-ek gyorsan lebomlanak RNáz enzimek közreműködésével, amelyek viszont komoly veszélyt jelentenek az RNS kinyerésére nézve és hatékony semlegesítésük a sikeres kinyerés egyik alapvető kritériuma.

9.2.2. Az RNS a növényekben

A növények is eukarióta szervezetek, mint az állatok és a gombák, és hozzájuk hasonlóan bonyolult génexpressziós hálózatokkal és szabályozási folyamatokkal rendelkeznek. Így az állati szövetekhez, sejtekhez alkalmazott technikák az alapjai a növényeknél használatos módszereknek is. A növényi biotechnológia intenzív fejlődése megkövetelte a jó minőségű RNS kinyerését a legkülönbözőbb növényi szövetekből (levél, gyökér, kéreg, virág, termés, mag, ill. sziklelevél). Mivel a növények a környezeti körülmények változása esetén nem képesek helyük változtatásával reagálni, anyagcseréjüket változtatják meg, így RNS-profiljuk feltérképezése különösen fontos, amikor stresszreakcióikat próbáljuk megérteni. Napjainkban számos kutatás igyekszik felderíteni pl. a hidegedződés, vagy a különböző abiotikus és biotikus stresszhatások esetén indukálódó növényi géneket, ill. ezek kifejeződési mintázatát és szabályozási hálózatait. A bioüzemanyagok előállításához szükséges növényi gének vizsgálata szintén erősen kutatott terület. Eddigi ismereteink szerint a növényi RNS valamivel ellenállóbbnak tűnik a környezeti hatásokkal szemben, mint az állatoké, ami jó hír a laboratóriumban dolgozók számára és kedvező a hosszabb távú tárolás és vizsgálatok szempontjából is.

A növényi sejt három legfontosabb jellemzője, egyben az állati sejtektől megkülönböztető jegye a sejtfa, a nagy, központi vakuólum és a kloroplasztisz. Az RNS ugyan kémiai értelemben nem különbözik az állati szövetek hasonló molekuláitól, a növényi szilárdítóelemek jelenléte mégis sokkal agresszívebb feltárást igényel és a kinyerhető RNS várható mennyisége is kevesebb azonos tömegű mintát tekintve. Számos kinyerési eljárás és gyári kit létezik a különböző növényfajok, szövetek és szervek nyújtotta eltérő kihívásokhoz optimalizálva, így nincs *egy általános* procedura, amely *minden* növényi mintához alkalmas lehetne.

A növényi sejtfa fontos sejtalkotó, amely alapvető védelmi szereppel bír a sejtek és a szervezet szintjén egyaránt, de a víz, az ásványi anyagok és számos egyéb vegyület forgalmában is alapvető jelentőségű. Kísérleti szempontból a sejtfa nyilvánvaló akadályt jelent a makromolekulák kinyerésében, vagy bármilyen anyagnak (génkonstrukciók, siRNS-molekulák, stb.) a növényi sejtbe való bejuttatásában. Az érett növényi sejt sajátossága a nagy, központi, folyadékkal telt vakuólum, amelyet a sejt plazmától a tonoplaszt határol. Molekuláris biológiai szempontból a magas víztartalom gyakran együtt jár a fajlagosan kisebb nukleinsav-tartalommal. A zöld szövetek nagyszámú kloroplasztiszt is tartalmaznak, amelyek a mitokondriumokhoz hasonlóan saját genommal és a róluk kifejezett transzkriptumokkal rendelkeznek. Az RNS kinyerése során a plasztiszok – akárcsak a mitokondriumok – szétörnek és számottevő mRNS- és rRNS-tartalmuk a környezetbe kerül és gélelektroforézis során is feltűnő sávokat eredményezhet (9.5. ábra), amelyekkel az állati RNS-kivonat esetében nem találkozunk. Az élő sejt RNS-tartalmának ~80%-a rRNS, kb. 10-15%-a tRNS, míg az mRNS-ek aránya kb. 2-3, de max. 10%. Az rRNS dominanciája miatt az RNS-kivonat épsége is a két legjobban feltűnő rRNS-típus, a sejtmagi 18S és 26S rRNS (9.1. táblázat) alapján becsülhető (9.5. ábra).

9.1. táblázat. A búza sejtmagban, kloroplasztiszban és mitokondriumban kódolt rRNS-típusai és méretük (nu: nukleotid)

Sejtmagi Plasztisz		Mitokondriális	
név	méret (nu)	név	méret (nu)
5 S	120	4,5 S	95
5,8 S	164	5 S	121
18 S	1810	16 S	1492
26 S	3391	23 S	2888

9.3. Az RNS kinyerése

9.3.1. A kinyerés általános jellemzői

Az RNS kémiaiailag és biológiailag kevésbé stabil a DNS-hez képest, különösen magasabb hőmérsékleten (>65°C), ill. nehézfémionok jelenlétében. További nehézség a rendkívül ellenálló ribonukleázok (RNázok) aktivitása, amit mindenképpen semlegesíteni kell a kinyeréskor. A magas RNáz-aktivitású biológiai mintákból a szokottnál is nagyobb kihívás a jó minőségű és megfelelő mennyiségű RNS kinyerése. A növényi anyag homogenizálása során megszűnik az organellumok és a vakuólum integritása, az itt tárolt RNázok kiszabadulnak, ezért a különböző kinyerési eljárásokban nagy hangsúlyt fektetnek az RNáz-aktivitás semlegesítésére. Az izolálás során különféle szennyezőanyagok is maradhatnak a kivonatban, amelyek akár nyomnyi mennyiségben is befolyásolhatják az RNS további felhasználását. Az RNS-t felhasználó kísérleteket alaposan meg kell tervezni és a kivonatot a lehető leghamarabb fel kell használni!

Több hatékony RNS-kinyerési eljárást dolgoztak már ki és mindegyiknek tovább finomított, ill. a különböző RNS-típusokhoz optimalizált formája is elérhető különböző publikációkban. Függetlenül attól, melyik recept mellett döntünk, érdemes két lépéssel előre gondolkodni és figyelembe venni, mi lesz a tisztított RNS sorsa, milyen további mérésekben, reakciókban kívánjuk felhasználni?

A kinyerés legfontosabb részletei:

1. A membránok (és a növények esetében a sejtfalak) felszakítása egy megfelelő módszerrel. Az első lépés a sejtek feltárási módjának meghatározása, ill. a szükséges RNS-populáció kiválasztása. Különböző lízis pufferek lehetnek alkalmasak pl. sejttenyészet, állati szövet, vagy egy növényi mag RNS-ének kinyeréséhez. A DNS korai elválasztása és a sejtszervecskében levő RNS kiválasztása szintén olyan igények, amelyek befolyásolják ezt a lépést.
2. A nukleázok aktivitásának megszüntetése. Az RNázok gátlása alapvető fontosságú, ezért egyrészt minden alkalmazott eszköz és reagens tisztaságáról gondoskodni kell, másrészt a feltárt sejtnevelő RNáz enzimeit is minél előbb hatástalanítani kell. A kinyerés további lépései során is mindig szem előtt kell tartani az RNázok aktivitásának kiküszöbölését.
3. A minta fehérjéinek eltávolítása. A fehérjék tökéletes eltávolítása nem csak az RNáz-aktivitás megelőzése miatt alapvető jelentőségű, de mind DNS-, mind RNS-kivonat esetében a további reakciókat és vizsgálatokat is erősen zavarhatják a kivonatban maradó szennyező fehérjék, hiszen kapcsolatba léphetnek a nukleinsavval, ill. egyéb reagensekkel.
4. A nukleinsav koncentrációja. Ez a legtöbb RNS-kinyerési eljárás utolsó lépése, ami többnyire a nukleinsav kicsapását jelenti sók és alkohol különböző kombinációjának felhasználásával (9.2. táblázat). A különféle sók komplexet képeznek a nukleinsavakkal és jelentősen csökkentik oldhatóságukat etanolban és izopropanolban, ezt pedig tovább lehet fokozni a hőmérséklet csökkentésével, amire az RNS kinyerésénél szükség is van.
5. A tisztított RNS tárolása. Mivel az RNS kémiaiailag jóval kevésbé stabil, mint pl. a DNS, a helytelen tárolás viszonylag gyorsan a degradációját okozza.

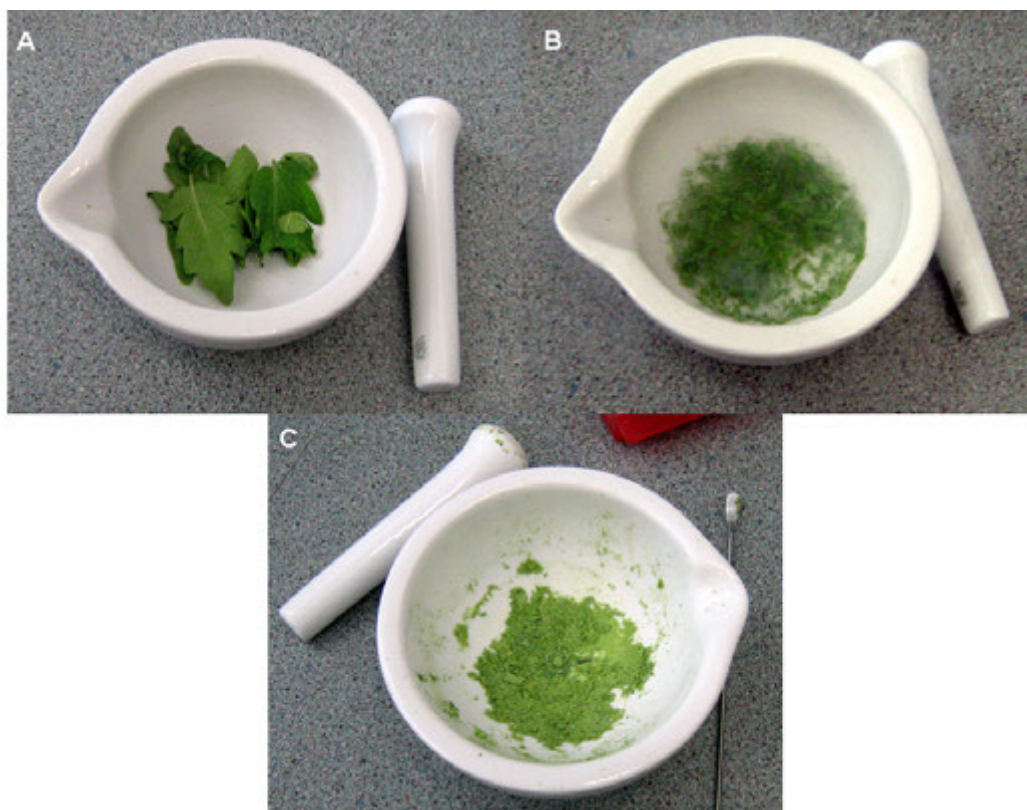
Négy fő kísérleti körülményt kell elkerülni az RNS-sel való munka során: 1) a lúgos kémhatású közeget, 2) a magas hőmérsékletet, 3) a fém-, különösen a nehézfémionok jelenlétét és 4) az RNázok jelenlétét, ill. aktivitását. A megfelelő közeg semleges, vagy enyhén savas, így el lehet kerülni a ribóz 2'OH-csoport nukleofil aktivitását, amely az RNS-lánc töredezését okozhatná. A magas hőmérséklet hasonló okból kerülendő, így végig 0-4°C között (azaz pl. jégen) érdemes végezni a kinyerést. A káros fémionok pl. ioncserélő gyanta használatával távolíthatók el a felhasznált oldatok készítése során. A másik lehetőség 0,1 M EDTA alkalmazása az oldatokban, amely komplexbe viheti a fémionokat.

Az RNS-t bontó RNázok származhatnak a biológiai mintából, ahol eredetileg nem férnek hozzá szubsztrátjukhoz, de a homogenizálás hatására az enzim és az RNS találkozik és a reakció azonnal elindul. Ezért a minta feltárásakor erős denaturáló reagenst használnak, ami természetesen nem csak az RNázokat denaturálja, hanem megszünteti az RNS-fehérje kölcsönhatásokat és az RNS másodlagos stb. szerkezetét is. Ha ezek megtartása fontos lenne, specifikusabb RNáz-inhibitor érdemes használni, mint pl. a vanadil-ribonukleozid komplexek, a heparin, vagy különböző peptid RNáz-inhibitorok. Az RNázok kívülről is a mintába kerülhetnek, akár közvetlen biológiai forrásból (korábbi mintákból, vagy a munkát végző személyekről), akár az egyéb laboratóriumi munka során alkalmazott RNS-mentesítési eljárásokból, ahol többnyire RNáz A használatos, amely rendkívül ellenálló a magas hőmérséklettel és a kémiai kezelésekkel szemben is. Az ilyen szennyeződés elkerülhető egyszer használatos eszközök alkalmazásával, a nem eldobható eszközök alapos sterilizálásával, elővigyázatos steril munkával és az RNáz A egyéb, kevésbé agresszív RNázokkal való helyettesítésével (pl. RNáz T₁). Mivel az RNázok származhatnak a kézről is, alapszabály az eldobható gumi-, vagy latexkesztyű viselése és nagyon jó szolgálatot tehet – ha van rá mód – a szűrőbetétes pipettahegyek használata is.

Ha az endogén RNázok aktivitásának megelőzésére megtettük a szükséges lépéseket, általában nincs szükség RNáz-inhibitorok alkalmazására. Ugyanakkor sok recept ajánlja a kinyerés és a további alkalmazások során használt vizes oldatok kezelését a dietil-pirokarbonát (*DEPC*) nevű vegyszerrel, amelyről ismert, hogy reakcióba lép az aminosavakkal, így semlegesíti az RNázokat is. A kezelés során a víz, ill. vizes oldat DEPC-tartalmát 0,1%-ra állítják be és 37°C-on 12 órát hagyják hatni, majd 100°C-os, 15 perces főzéssel, vagy autoklávozással távolítják el a reakcióban részt nem vett molekulákat. A DEPC azonban nem csak a fehérjékkel reagál, hanem az adenosin nukleotidokat is módosíthatja, vagyis károsíthatja az RNS-t, ezért használatát az utóbbi időben mellőzik. Egy másik gyakori megoldás az RNS védelmére a fehérjetípusú emlős RNáz-inhibitorok használata, amelyek gátolják az RNáz A, B és C enzimeket (de sok más RNáz nem). Ezek az inhibitorok az említett RNázokkal 1:1 arányú, nem kompetitív kötést alakítanak ki, viszont denaturációjuk vagy oxidációjuk hatására a kötés megszűnhet és az inaktivált RNázok felszabadulva újra működésbe léphetnek.

9.3.2. A minta feltárása és a makromolekulák denaturációja

A növényi RNS kinyerésekor az első feladat a sejtfal minél alaposabb megbontása, amelyet elsősorban folyékony nitrogénes eldörzsöléssel, ill. kézi, vagy elektromos törő szerkezettel oldanak meg. Utóbbihoz gyakran alkalmaznak kemény anyagból (pl. volfrám-karbid) készült apró gyöngyöket és hozzávaló rázókészüléket, de a folyékony nitrogénes fagyasztással is kombinálható sok gépi technika. Míg a puha szövetek többnyire könnyen homogenizálhatók fagyasztás nélkül is, a növényi minták többségénél e lépés nem hagyható el a kinyert RNS mennyiségének jelentős csökkenése nélkül (9.1. ábra).



9.1. ábra. Paradicsom levélminta feltárása folyékony nitrogénnel, mozsárban

Az összes eljárás természetesen a sejtek feltárásával kezdődik, amelyhez a mechanikai hatáson túl alapvetően kétféle puffer használatos: 1) a durva membránbontó és denaturáló ágenszt tartalmazók, amelyek szétroncsolják a membránokat és egyúttal inaktíválják az RNázokat; ill. 2) a plazmamembránt finoman megbontó, pl. nem-ionos, hipotóniás pufferek, amelyek a sejtalkotók integritását nem befolyásolják. Ez utóbbiak azonban a sejtfallal rendelkező sejteknél nem használhatók, így a növényi RNS kinyerésekor is jellemzően az előbbi típust alkalmazzák.

A kivonó pufferekben alkalmazott leggyakoribb durva membránbontó és denaturáló anyagok a következők: 1) guanidiniumsók; 2) Na-dodecil-szulfát (SDS); 3) szarkozil (Na-lauril-szarkozinát vagy Na-dodecil-szarkozinát); 4) cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB); 5) fenol; 6) kloroform; 7) urea.

1. A guanidiniumsók. A guaninból származtatható guanidin élettani körülmények között protonálódik és guanidinium kation jön létre, amelyet guanidiniumsók létrehozásához használnak. A legismertebb formák a -klorid, -hidroklorid és -tociánát sók. E vegyületek a legerősebb denaturálószer közé tartoznak, a nukleinsav-kinyerésben manapság oly gyakran alkalmazott TRI[®] reagensek alapanyagai.
2. SDS, szarkozil. Anionos detergens, erős denaturáló tulajdonsággal, ezért gyakran alkalmazzák őket makromolekulák elválasztása, pl. elektroforézis során.
3. CTAB. Kationos detergens, elsősorban a DNS kinyerése során használják, de RNS-kivonásban is használatos, pl. növényi mintáknál, ahol a magas polifenol- és/vagy poliszacharid-tartalom miatt más pufferek kevésbé hatékonyak.
4. Fenol és kloroform. A legtöbb hagyományos DNS- és RNS-kinyerési eljárás alapjai, ma már sokszor nem elsősorban a feltáráshoz, hanem a fehérjék eltávolításához használják.

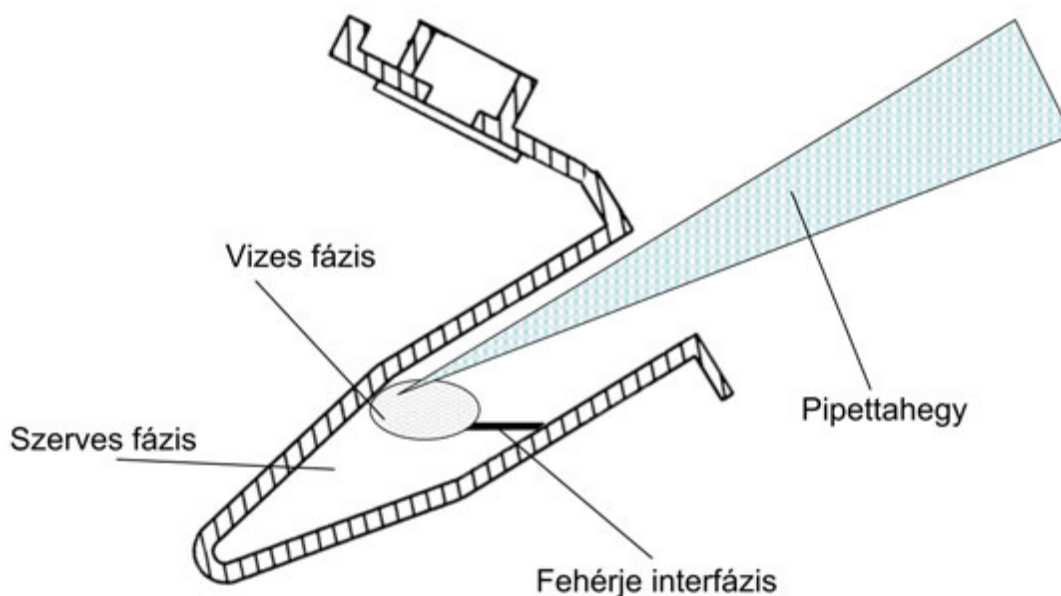
9.3.3. A fehérjék eltávolítása és az RNS tisztítása

Az RNS kinyerésénél alapvető a fehérjék eltávolítása, amelyet *fenol*al, vagy proteáz enzimekkel oldanak meg. A legtöbb fehérje denaturálódik a vizes fenolban és fázisszétválás után oldódik a fenolos fázisban, vagy mindkét fázisban oldhatatlan lévén, a vizes és a fenolos fázis között oldhatatlan hártaként megjelenő interfázist képez. Az

RNS ilyenkor, centrifugálás után a felső, vizes fázisból etanollal kicsapható. A tiszta fenol helyett gyakran fenol-kloroform elegy használatos, mivel ez még jobban denaturál és megakadályozza a poli(A)⁺ mRNS-ek oldódását a fenolban, ami bizonyos körülmények között megtörténhet. A fázisok szétválása kis mennyiségű izoamil-alkohol hozzáadásával segíthető, mivel fokozza a felületi feszültséget a fázisok határán. A fenol oxidációját pirosas, rózsás elszíneződés jelzi, az ilyen oldat már nem használható, viszont megelőzhető a sárgás színt kölcsönző 8-hidrokinolin hozzáadásával, amely megelőzi a vizes fenol oxidációját. Az említett fehérje interfázis jelentős mennyiségű nukleinsavat is visszatart, amit egy második extrakciós lépésben érdemes lehet kinyerni belőle. A gyakorlatban a fehérjék tökéletes eltávolítása megkövetelheti a Mg²⁺ és Ca²⁺ ionok előzetes eltávolítását EDTA segítségével, a fehérjék kicsapásához pedig gyakran használnak ionos detergenst (pl. SDS), vagy erősen denaturáló vegyületet (pl. guanidinium-tiocianát). A fenolos kinyerés előtt szintén gyakran alkalmazzák a fehérjék lebontására a proteináz K emésztőenzimet, amelyet később pl. SDS-sel denaturálnak. A fenolos kinyerésnél a sókoncentráció, a kémhatás és a hőmérséklet beállítása is fontos. Ha a sókoncentráció kellően magas, az összes RNS a vizes fázisba kerül. A DNS kinyerése során a pH 7 fölött tartandó, mert semleges kémhatású közegben a DNS hajlamos interfázisba kerülni, pH 7 alatt pedig a fenolos fázisban oldódik. Az RNS-ek nagy részének oldódási tulajdonságait nem befolyásolja ennyire a kémhatás, ezért pH 7 alatt DNS-szennyezéstől mentesen szelektíven izolálhatók. A poli(A)⁺ mRNS-ek viszont részlegesen oldódnak a fenolos fázisban pH 7,6 alatt és kinyerésükhöz javasolt a fenol-kloroform(-izoamil-alkohol) elegy pH 5-9 között, vagy a fenol pH 9 kémhatással.

A módszer sikerét alapvetően befolyásolja a kiindulási minta tömegének és az alkalmazott puffernek az aránya. Logisztikailag érdemes lehet koncentráltan tartani a mintát és mikrocentrifuga csövekben dolgozni, mint nagyobb méretekben. Újabban a guanidinium- és/vagy ammónium-tiocianát pufferek és a savas fenol kombinációja is előfordul a receptekben. A kombináció előnye lehet a több szerves komponens eltávolítása, így magasabb A₂₆₀/A₂₈₀ arány (9.4. ábra, 9.3. táblázat), azaz tisztább kivonat érhető el.

A vizes fázis levétele némi gyakorlatot igényel, hiszen ahogy csökken a térfogata, egyetlen cseppé ugrik össze. Érdemes a pipettahegyet a fenolos és az interfázistól legtávolabbi ponton a cső falához vezetve kinyerni (9.2. ábra).



9.2. ábra. A fehérjék eltávolítása során a vizes fázis elkülönítése a fenolos (szerves) fázistól és az interfázistól.

Egy másik lehetőség, ha a felülúszó kb. 90%-ának levétele után a szerves fázist távolítjuk el alóla úgy, hogy csak egy csepp maradjon belőle. Az ezt követő centrifugálás után a vizes fázis maradéka már könnyen eltávolítható.

9.3.4. Az RNS koncentrációja

Az RNS kinyerése a tisztított vizes oldatokból etanolos kicsapással történik. Megfelelően magas ionerő mellett (0,2 M NaCl, 0,3 M Na-acetát, 0,8 M LiCl, vagy 2-2,5 M NH₄-acetát) a minimális kicsapható mennyiség kb. 20 ng/ml. Hígabb oldatokból való kinyeréshez, ill. a kis molekulatömegű RNS-ek hatékony megtartásához a kicsapást segítő egyéb anyagokra is szükség van. A hagyományos recept szerint 0,3 M Na-acetátos oldatból 2,5-3 térfogat

(tf) hideg 96%-os etanollal kicsapható az RNS. A hőmérséklet csökkentésével (pl. 5 perc szárazjégben, ill. 15 perc -20°C -on, vagy jégen) és az idő növelésével a kinyert RNS koncentrációja növelhető, ill. a kisebb molekulák is megtarthatók. A csapadékot ilyenkor centrifugálással gyűjtik össze (12000 g, 15 perc, 4°C), a kis fragmentek visszanyeréséhez, ill. alacsony RNS-koncentráció esetén a centrifugálási időt és fordulatszámot növelni lehet. A csőből az etanolt maradéktalanul el kell távolítani. A csapadékban és a cső belső felületén szennyeződésként jelenlevő sókat egyszeri, vagy többszöri mosással távolítják el, ami történhet 70%-os etanollal, ill. 70%-os etanol és 0,25 M NH_4 -acetát keverékével. Ha a csapadék a mosás közben elmozdul a cső aljáról, rövid centrifugálással ülepítik vissza. A mosófolyadékot szintén maradéktalanul és gyorsan el kell távolítani, pl. 65°C -on 5-10 percig melegítve, vagy steril fülkében nyitva hagyva a kiszáradás elősegítése végett. Az etanos kicsapás során különböző sók használatosak az elérendő cél függvényében (9.2. táblázat). A leggyakrabban használt só a Na-acetát (NaOAc ; 0,3 M, pH 5,2), míg NaCl (0,2 M) ajánlott, ha a minta SDS detergenst tartalmaz, mert a konyhasó elősegíti az SDS oldódását a 70%-os etanolban. Ha a kicsapás nagy mennyiségű etanolt kíván, gyakran használnak LiCl sót (0,8 M), mert igen jól oldódik etanos oldatokban, így nem csapódik majd ki a nukleinsavval együtt. Ha kizárólag a nagyméretű RNS (rRNS és mRNS) megtartása a cél, akkor a kicsapást nem etanollal végzik, hanem a LiCl -koncentráció 0,8 M-ra emelése után a mintát jégen hagyják 2 órát, majd centrifugálással (15000 g, 20 perc, 0°C) ülepítik a nagy RNS-molekulákat. A sót ezután el kell távolítani, mert a LiCl zavarhatja az ezt követő reakciók némelyikét, pl. a reverz transzkripciót.

A szabad nukleotidok kicsapódását 2-2,5 M NH_4 -acetáttal lehet megakadályozni, az ammóniumionok viszont zavarhatják pl. a fág-típusú T4 polinukleotid-kináz működését a későbbi reakciók során.

9.2. táblázat. Só-alkohol kombinációk a nukleinsavak kicsapásához*

Só	A t ő r z s o l d a t koncentrációja	Szükséges mennyiség	Végkoncentráció
NaOAc	3 M, pH 5,2	0,1 térfogat	300 mM
NaCl	1 M	0,1 térfogat	200 mM
LiCl^{**}	8 M	0,1 térfogat	800 mM
$\text{NH}_4\text{OAc}^{***}$	10 M	0,2 térfogat	2 M
KOAc	2,5 M	0,1 térfogat	250 mM
Alkohol	A só hozzáadása után szükséges mennyiség		
Etanol (95–100%)	2,2–2,5 térfogat		
Izopropanol (100%)	0,6–1,0 térfogat		
*A küszöbértékek: DNS – 50 ng/ml, RNS – 100 ng/ml. Ha az oldatok ennél hígabbak, a kicsapás egyéb segédanyag nélkül nem megy végbe hatékonyan.			
** A LiCl nem csapódik ki a nukleinsavakkal együtt, mindazonáltal kerülik a használatát, ha az RNS-t reverz transzkripcióban kívánják később felhasználni.			
***A cDNS kicsapása során a legkedveltebb só, mert megakadályozza a szabad nukleotidok csapadékba kerülését.			

9.3.5. mRNS-ek és kis RNS-ek kinyerése

Az mRNS-eket leggyakrabban az összes RNS-t tartalmazó kivonatból tisztítják tovább, de léteznek eljárások, amelyek már a kinyerés elején elkülönítik őket az egyéb komponensektől. A kis RNS-ek iránti érdeklődés az utóbbi években nőtt meg, mióta számos típusuk szerepe tisztázódott a transzkripció utáni és egyéb szabályozó folyamatokban.

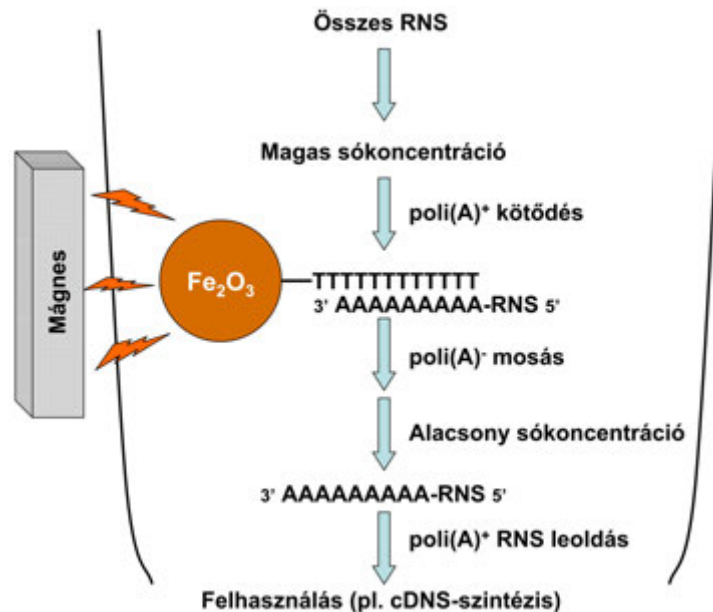
A kis RNS-ek megtartásához alkalmas kinyerési eljárás megegyezik a fentiekkel: lízis és denaturáció, extrakció és végül az RNS kicsapása. Erős denaturálószer (pl. guanidinium) és sokszor ezzel együtt erős redukálószer (pl. 2-merkaptotanol) adnak a mintához a lízis közben/után, hogy meggátolják az RNázok aktivitását és megtartsák az RNS integritását. A denaturáló közeg megszünteti a diszulfid-hidakat, a redukáló ágensek pedig megakadályozzák a polifenolok oxidációját, ami nagy veszteséget okozna a nukleinsavak oldhatatlan állapotban való megkötésével. A merkaptotanol (és hasonlóan a ditiotreitolt, DTT) szintén képes megszüntetni a diszulfid-hidakat.

Az extrakció során fenol, savas fenol, vagy kloroform a leggyakrabban használt szerves oldószer. Az ezt követő centrifugálás után az RNS elválasztható a DNS-től és a fehérjétől. Végül a felső, vizes fázisból a nagy és a kis RNS-ek egyaránt kicsaphatók alkohollal. Az ioncserélő és szilikon alapú technikák (pl. Qiagen RNeasy spin column) a növények esetében sokszor nem alkalmasak a 200 nu alatti RNS-ek, így a miRNS frakció hatékony elválasztására. A gyakran használt LiCl-os kicsapás sem megfelelő a kis RNS-ek megtartására, helyette érdemes nátriumsót és/vagy alkoholt alkalmazni.

Az mRNS-ek a sejt RNS-tartalmának mindössze 2-3%-át teszik ki, így szelektív dúsításuk megnöveli a statisztikai valószínűséget egy vagy több mRNS megtalálhatóságához egy adott mintában. A dúsítás során igyekezünk megtartani az mRNS-eket és megszabadulni a többi típustól. Így pl. 1) növelhető a transzkripciót vizsgáló módszerek érzékenysége (Northern analízis, nukleázos emésztés, RT-PCR), ill. 2) abszolút reprezentatív cDNS-könyvtár készíthető. A megtalálhatóság statisztikai növelésével a ritka mRNS-molekulák is könnyebben azonosíthatók. Az mRNS-frakció izolálásának azonban hátulütői is vannak: a szelekció egyes ritka transzkriptumok arányának csökkenésével is járhat és veszélyeztetheti az adatok megbízhatóságát.

Az mRNS-ek szelekciójának alapja szinte minden esetben a poli(A)-farkok kötése oligo(dT)-szekvenciához. Azonban fontos tudni, hogy bár a legtöbb eukarióta mRNS rendelkezik e jellegzetességgel, egy kis részüknek nincs poli(A)-farka, így az ezen alapuló szelekcióval csak a poli(A)⁺ mRNS-ek maradnak meg, a poli(A)⁻ mRNS-ek elvesznek. Utóbbiak jóval ritkábbak, de vannak olyan gének, amelyeknek mindkét típusba tartozó transzkriptumai is lehetnek.

Az oligo(dT) elemek alkalmazása hosszú múltra tekint vissza. Míg korábban latex, ill. cellulóz hordozóhoz csatolták őket és ehhez kötötték ki a poli(A)⁺ mRNS-molekulákat, az utóbbi időben 1) biotinhoz kötik az oligo(dT) elemeket és az avidin-biotin kötés kihasználásával szelektálják az mRNS-t, ill. 2) mágneses gyöngyökhöz kötött oligo(dT) láncokra kötik a poli(A)⁺ mRNS-molekulákat és mosással távolítják el a többi nukleinsavat (9.3. ábra).



9.3. ábra. A poli(A)⁺ RNS dúsítása mágnesgyöngyös módszerrel. A nyers sejtkivonatot, vagy a tisztított RNS-t magas sókoncentráció mellett oligo(dT) láncokat hordozó mágnesgyöngyökkel keverik össze. Az A-T kötések kialakulása után a kikötött poli(A)⁺ RNS tisztítható, majd a sókoncentráció csökkentésével leoldható és eltávolítható a gyöngyöktől.

9.4. A kivonat ellenőrzése

Minden vizsgálatnál, amelyhez tisztított RNS-re van szükség, erősen ajánlott a kinyert RNS mennyiségének és minőségének ellenőrzése. Maga a kinyerés is idő- és költségigényes, de ez fokozottan igaz az RNS-t felhasználó alkalmazások többségére, így fontos ismerni a kivonat mennyiségi és minőségi jellemzőit. Az ellenőrző vizsgálatot rögtön az RNS kinyerése után el kell végezni, amennyiben pedig az RNS-t hosszabb (vagy akár rövidebb) ideig

tároljuk, közvetlenül a felhasználás előtt szintén érdemes megvizsgálni, hiszen különösen érzékeny molekuláról van szó.

9.4.1. UV-spektrofotometria

A nukleinsavak mennyiségi meghatározásához leggyakrabban a 260 nm-en mért elnyelési értéket szokták figyelembe venni. Ez a legegyszerűbb, leggyorsabb és legegyszerűbb módszer a kitermelés, a tisztaság és a valószínű felhasználhatóság megállapítására. A tiszta nukleinsavak jellegzetes elnyelési profilt mutatnak 230 és 320 nm között (9.4. ábra). 320 nm-nél a tiszta nukleinsavmintának nincs már elnyelése. A normális görbétől való eltérés szennyezők jelenlétére utal, amelyeknek természetére a görbe módosulásának helyéből következtethetünk. Az elnyelés egyenesen arányos a minta RNS-tartalmával, amelynek ismerete elengedhetetlen pl. a helyes enzim : primer : RNS-templát arány beállításához, ami viszont a hatékony reverz transzkripció alapja. A nukleinsavak abszorpciós maximuma 260 nm-nél látható. Az elnyelés mértékéből a koncentráció a következő egyenlet alapján számítható:

$$\mu\text{g RNS} / \text{ml} = A_{260} \times \text{hígítás} \times 40$$

ahol

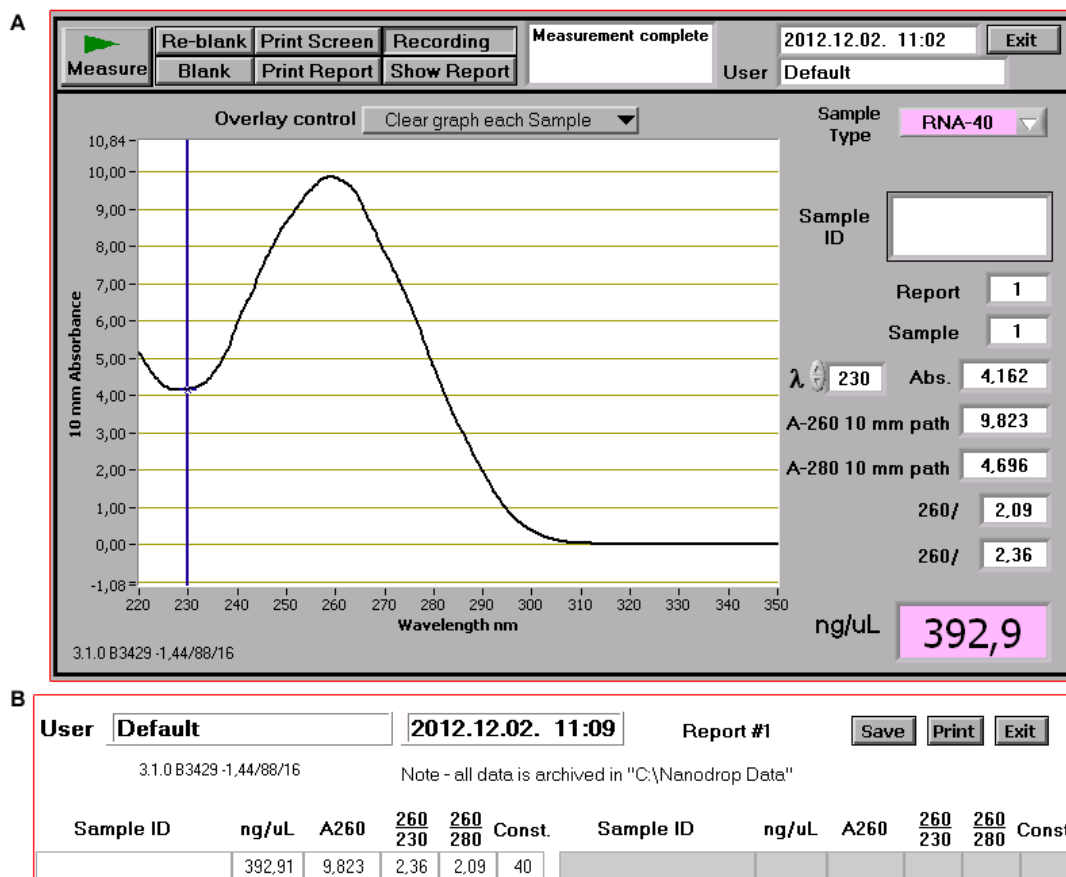
A_{260} = elnyelés (abszorpció, optikai denzitás) 260 nm-nél (OD_{260})

hígítás = a hígítás mértéke, pl. tízszeres hígításnál 10

40 = az RNS átlagos extinkciós koefficiense (40 $\mu\text{g} / OD_{260}$)

A pontos érték függ az RNS elsődleges és másodlagos szerkezetétől és a pH-tól, ill. közvetett módon az ezeket befolyásoló tényezőktől (ionerő, ionok típusa, EDTA, ill. denaturálószer jelenléte, hőmérséklet). A kettős szálú DNS koncentrációja hasonlóan számolható (50 $\mu\text{g} / OD_{260}$), de mivel a timin és az uracil extinkciós koefficiense különbözik, a DNS-szennyezett RNS-oldat, ill. az RNS-szennyezett DNS-kivonat elnyeléséből helytelen adat számolható.

A 0,1 OD alatti elnyelés főként a régebbi típusú spektrofotométereken hamis eredményt adhat, így ha hígítás miatt lett ilyen kicsi a kivonat elnyelése, érdemes töményebb oldatot mérni. Gyakorlati probléma lehet az UV-spektroszkópia alkalmazása során a mérendő RNS kis mennyisége. Az elnyelés pontos meghatározásához – egy átlagos fotométer esetében – 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fölött kell lennie az RNS töménységének, ami a szokásos küvettákat használva min. 4 μg . Ez a mennyiség nem feltétlenül áll rendelkezésre, ilyenkor hasznos lehet a mikroküvetta, amellyel már 7 μl mintát is meg lehet mérni. Egy másik, modernebb lehetőség az ún. cseppfotométerek (pl. NanoDropTM) használata, amelyek nem küvettában, hanem két száloptika között kifeszített egyetlen cseppben mérik egy adott oldat elnyelési tulajdonságait. 0,5-3 μl minta elegendő a méréshez, ami nem elhanyagolható előny egy 20-60 μl végtérfogatú nukleinsav-kivonat esetén. A készülék a mérés után a 220 és 350 nm közötti spektrumot is kirajzolja, ill. a helyes beállítás mellett ng/ μl (= $\mu\text{g}/\text{ml}$) mértékegységgel azonnal kijelzi a minta RNS-tartalmát is (9.4. ábra).



9.4. ábra. Növényi RNS-kivonat UV-spektrofotometriai vizsgálata NanoDrop fotométerrel. A: az elnyelési spektrum 220 és 350 nm között és az elnyelési alapadatok; B: táblázatos riport a készülék programjából a fenti adatokkal.

A mennyiségi meghatározást leginkább a szennyező anyagok nehezítik. Ezek tipikus példái a fehérjék, fenoloidok és kisebb mennyiségben a kinyerés egyes reagensei, mint pl. a 2-merkaptotanol vagy a DTT.

Az A_{260} érték azonban önmagában nem sokat mond a minta minőségéről és tisztaságáról, ezért az A_{260}/A_{280} és A_{260}/A_{230} (és esetleg A_{260}/A_{240}) arányokat is érdemes figyelembe venni (9.3. táblázat). A tiszta RNS-kivonat A_{260}/A_{280} értéke $2,0 \pm 0,1$, míg az A_{260}/A_{230} arány 2,0 és 2,4 között van. Az alacsony A_{260}/A_{280} érték fehérjészennyezésre utal, míg az 1,5-1,8 alatti A_{260}/A_{230} arány eredhet guanidinium, merkaptotanol, vagy egyes sók, ill. speciálisan a növényi mintáknál poliszacharidok jelenlétéből. Az A_{260}/A_{240} arány 1,4 alatti értéke azt jelezheti, hogy nagyobb mennyiségű só maradt a kivonatban. Ilyenkor érdemes újra kicsapni az RNS-t az oldatból, majd többszöri etanolos mosás után szárítani és újra feloldani a csapadékot.

9.3. táblázat. A nukleinsav-kivonatok tisztaságának ellenőrzése az UV-elnyelés alapján: a helyes és a problémára utaló arányértékek

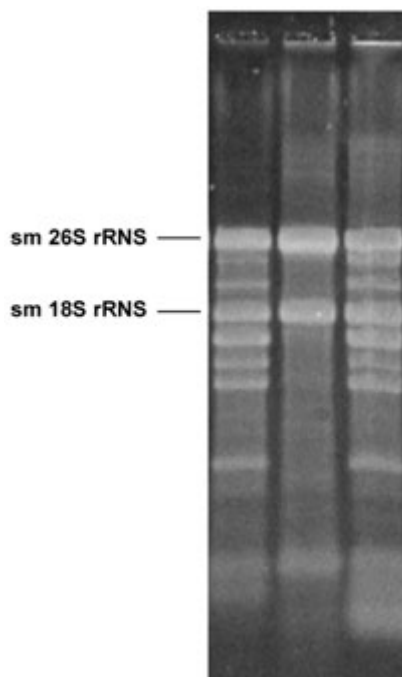
	DNS	RNS	Szennyezettségre utaló arány és a szennyezés típusa
A_{260}/A_{280}	1,8	2,0	Az 1,8 alatti arány fehérjészennyezésre utal
A_{260}/A_{230}	2,0 – 2,4	2,0 – 2,4	Az 1,8 alatti arány poliszacharidok, vagy detergens jelenlétére utal
A_{260}/A_{240}	1,4 – 2,0	1,4 – 2,0	Az 1,4 alatti arány sószennyezésre utal

9.4.2. Agaróz gélelektroforézis

A kinyert RNS agaróz, vagy poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgálható. Ha denaturáló körülmények szükségesek, formaldehidet adnak az agaróz, ill. ureát a poliakrilamid gélhez.

Az RNS integritását, sértetlenségét legegyszerűbben agaróz gélelektroforézis módszerrel ellenőrizhetjük. 1-1,2%-os, denaturáló agaróz gélen futtatva a kivonat néhány μ l-es mennyiségét, az rRNS sávok és a háttér tisztasága alapján becsülhető a kinyert RNS épsége. Az elmosódott sávok és a hosszan elnyúló háttérzaj („smear”) az RNS bomlására utal. A teljes bomláskor a sávok eltűnnek és csak nagyon alacsony molekulatömegű „smear” figyelhető meg a gélen. Denaturáló körülmények között az RNS minőségét jól jellemzi a 25-28S és a 18S rRNS sávok aránya: mivel előbbi molekula durván kétszer akkora, mint az utóbbi, így a festék (pl. etidium-bromid) intenzitása is kb. kétszerese a magasabban levő sávban, ha az RNS sértetlen állapotban van.

Növényi mintáknál a sejtmagban kódolt (sm) rRNS csíkok között és alatt megjelennek a kloroplasztisz rRNS-ek – és esetenként mRNS-ek – is, de a sávok sorrendje növényfajtól és a szövet típusától függően változhat (9.5. ábra).



9.5. ábra. Növényi RNS-kivonat elválasztása agaróz gélen. A sejtmagban kódolt (sm) 26S és 18S rRNS-ek mellett megjelennek a kloroplasztiszban kódolt rRNS és mRNS molekulák sávjai is.

A hagyományos módszer modern alternatívája a mikrofoliadék technológia, amely során az elektroforézis miniatürizált formában megy végbe egy apró üveglap („labchip”) felületén. A módszer előnye a nagyobb érzékenység, a minimális mintafogyás és a nagy felbontás. Az eredmény a hagyományos gélszerű kép mellett elektroferogram formájában is megjeleníthető és sokkal pontosabb vizsgálatot tesz lehetővé.

A kisebb RNS-molekulákat denaturáló (7 M urea) poliakrilamid gélen szokták vizsgálni. Ez a módszer (a berendezéstől függően, ill. kb. 150 nu méret alatt) elvileg alkalmas *egyetlen* nukleotid méretkülönbség feloldására is. Az RNS-gél festésére általában etidium-bromidot használnak, amely UV-megvilágítás (~300 nm) hatására narancs-vörös színben fluoreszkál (~600 nm). Fluoreszcenciája nukleinsavhoz kötve erősen nő, így a háttértől többnyire kimosás nélkül is jól megkülönböztethető.

9.4.3. Egyéb ellenőrzési lehetőségek

Az UV-spektroszkópia egyik alternatívája a fluorometriai vizsgálat, amikor az RNS-hez fluoreszkáló anyagot kötnek. Ilyen pl. a RiboGreen (Life Technologies), amelynek fluoreszcenciája a kötődés után 480 nm-en gerjesztve 520 nm-en mérhető és 1-1000 pg/ μ l tartományban alkalmazható. A RiboGreen előnye a spektroszkópiával szemben, hogy specifikus az RNS-re, míg utóbbit a DNS-szennyezés zavarja. A RiboGreen emissziója alapján egy standard hígítási sor ismeretében számolható a minta RNS-tartalma.

A PCR tulajdonképpen a minőség ellenőrzésének végső lépése is lehet: ha jó minőségű RNS-kivonaton mindig biztosan működő primerekkel (pozitív kontroll) sem sikerül terméket produkálni az új kivonattal, az biztos jele az adott minta degradációjának, vagy legalábbis használhatatlanságának.

9.5. Az RNS tárolása

Az RNS helyes tárolására érdemes nagy gondot fordítani, mert nem megfelelő körülmények esetén órák alatt számottevően csökkenhet a kivonat épsége. A folyékony nitrogénben, vagy legalább -80°C -on gyorsan lehűtött és frissen eltárolt mintákból egy évvel később is jó minőségű RNS nyerhető ki. A guanidinium pufferben homogenizált minták szintén jól tárolhatók -80°C -on és később folytatható belőlük az RNS-kinyerés. A tisztított RNS etanolos csapadék formájában a legstabilabb, szintén -80°C -on tárolva, ilyenkor hónapokig, vagy akár még tovább is biztonságosan eltartható. Ha egy héten belül biztosan felhasználásra kerül, etanolos csapadékként -20°C -on is tárolható. A vizes oldatban levő RNS a legsérülékenyebb, ezért munka közben jégen tartandó! Rövid ideig oldott formában az RNS 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vizes oldatban (semleges, vagy enyhén savas pH), esetleg TE pufferben (10 mM Trisz-HCl, pH 7,5, 0,1 M EDTA) $-20/-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolható. Ilyen körülmények között az RNS másodlagos szerkezete denaturálódik, vagyis egyes további alkalmazásokhoz renaturáció (re-folding) szükséges. Ha évekig akarjuk tárolni a kinyert RNS-t, vagy a legbiztosabb eltartási módot kívánjuk választani, etanolos csapadékként érdemes -20 vagy -80°C -on tárolni.

Ha nagyobb mennyiségű RNS-t izolálunk, a legjobb a koncentráció (és a minőség) meghatározása után alikvotokban -80°C -on tárolni, így elkerülhető a minta többszöri felolvadása. RNáz-inhibitor is lehet adni a tárolt mintákhoz, de ezzel csak akkor érdemes élni, ha a hozzáadott fehérje, vagy egyéb anyag biztosan nem fogja zavarni a soron következő felhasználási lépéseket. Előfordul még, hogy nagy tisztaságú, 100%-os formamidban, ill. a szabadalmazott *RNAlater* (Quiagen) nevű oldatban tárolják az RNS-t, ill. az utóbbi a biológiai minta tárolására is szolgál az RNS kinyerése előtt. Rövidebb idejű tárolásra alkalmas lehet még az 5 mM DTT-oldat is, mivel a DTT megszünteti a diszulfid-hidakat.

9.6. Egy gyakran alkalmazott kinyerési recept

1. 0,2 g búzalevelet kb. 0,5 cm-es darabokra vágva folyékony nitrogénben homogenizálunk, majd hozzáadunk 800 μl telített fenol – 0,01 M Trisz-HCl (pH 7,5) – 0,01 M NaCl – 0,1% SDS elegyet, amelyben a fenolos és a vizes fázis aránya 1:1.
2. Eppendorf csőbe mossuk a homogenátumot, majd centrifugáljuk (10000 g, 10 perc, 4°C).
3. A felső, vizes fázist tiszta csőbe pipettázzuk át. (Ez az RNS-ből főként a tRNS és rRNS frakciókat tartalmazza)
4. Hozzáadunk 0,1 térfogat 20 %-os K-acetátot és két térfogat 96 %-os etanolt, majd legalább egy óráig, vagy egy éjszakán át hagyjuk kicsapódni a nukleinsavakat.
5. Centrifugáljuk a mintát (10000 g, 10 perc, 4°C).
6. A felülúszót elöntjük és oldjuk a csapadékot 60-90 μl 0,3 M NaCl-oldatban.
7. Hozzáadunk 24-36 μl 5 %-os CTAB-oldatot és legalább 2 órára 4°C -ra tesszük. (A CTAB csapadékba viszi a nukleinsavakat, míg a növényi mintákban gyakori poliszacharidok és cukor-foszfatok oldatban maradnak)
8. Centrifugáljuk a mintát (10000 g, 30 perc, 4°C).
9. Elöntjük a felülúszót és kétszer mossuk a csapadékot 30 μl steril, hideg, ultratiszta vízzel, majd centrifugáljuk a mintát (10000 g, 30 perc, 4°C).
10. Oldjuk a csapadékot 30 μl 0,3 M NaCl-oldatban, majd újra kicsapjuk 2,5 térfogat 96 %-os etanolban. -20°C -on inkubáljuk 30 percig.
11. Centrifugáljuk a mintát (10000 g, 10 perc, 4°C), elöntjük a felülúszót és maradéktalanul eltávolítjuk az etanolt.

12. A csapadékot 10 µl 2 M NaCl-oldattal kezeljük, majd centrifugáljuk a mintát (10000 g, 30 perc, 4°C). Megismételjük ezt a két lépést. Az így kapott felülúszó a tRNS-eket, a csapadék az rRNS-eket tartalmazza, utóbbit 30-50 µl 0,3 M NaCl-oldatban vehetjük fel és fotometriásan, ill. gélelektroforézissel ellenőrizhetjük a minta minőségét.

9.7. Feladatok

1. Készítsünk RNS-kivonatot zöld és etiolált fiatal búzanövényekből! Hasonlítsuk össze RNS-tartalmukat UV-spektrofotometriás méréssel és vizsgáljuk meg gélen a mintákból kinyert RNS-t!
2. Készítsünk RNS-kivonatot zöld, ill. kloramfenikollal, vagy linkomicinnel kezelt fiatal búzanövényekből! UV-spektrofotometriás mérés után vizsgáljuk meg gélen a mintákból kinyert RNS-t! Magyarazzuk meg a kapott eredményeket!
3. A jó minőségű, frissen kinyert RNS-kivonat kisebb mennyiségeihez keverjünk néhány µl nyers biológiai homogenátumot és hagyjuk hatni egy-két percre, majd a reakció leállítását követően vizsgáljuk meg agaróz gélen az emésztetlen és a degradált mintákat!

9.8. Ajánlott irodalom

Accerbi, M. és mtsi: Methods for Isolation of Total RNA to Recover miRNAs and Other Small RNAs from Diverse Species. In: Plant MicroRNAs - Methods and Protocols (szerk.: B. C. Meyers, P. J. Green). 2010, Humana Press

Farrell R. E. (szerk.): RNA Methodologies, Third Edition: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. 2010, Academic Press – Elsevier

Gjerde, D. T., Hoang, L., Hornby, D.: RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography. 2009, Wiley

Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A., Westhof, E.: Handbook of RNA Biochemistry. 2005, Wiley

Nielsen, H.: Working with RNA. In: RNA – Methods and Protocols (szerk.: H. Nielsen). 2012, Humana Press

10. fejezet - DNS kinyerés növényekből

szerző: Dr. Oszvald Mária

10.1. A DNS izolálás

A molekuláris diagnosztikai, kutatási és azonosítási módszerek nagy száma igényel tisztított DNS-t. Az alkalmazott DNS szükséges tisztaságát és mennyiségét a felhasználás módja szabja meg. Ilyen felhasználási lehetőségek pl. a kórokozók detektálása, az emberi genetikai vizsgálatok, GM azonosítások vagy a molekuláris biológiai kutatások.

Az alkalmazott tisztítási eljárások eltérő tisztaságú DNS-t eredményezhetnek, ami meghatározza a felhasználási lehetőségeiket. Bár a PCR (polymerase chain reaction) reakció elvégezhető nyers DNS kivonaton is, az olyan érzékeny reakciók, mint a mennyiségi PCR és a legtöbb diagnosztikai alkalmazás nagy tisztaságú DNS-t igényelnek. A tisztított DNS-ben található szennyeződések ugyanis akadályozhatják a DNS polimerizációt, vagy a DNS restrikciós enzimmel történő hasítását.

A DNS tisztítás kihívásai

A DNS kinyerés fontosabb lépései és az izolálás során felmerülő problémák:

- A DNS molekulák tökéletes elválasztása a többi sejttes komponenstől, mint a fehérjék, lipidek, RNS-ek, de leginkább a poliszacharidok.
- Az endogén nukleázok (DN-áz enzimek) inaktíválása és a genomi DNS molekulák védelme kulcsfontosságú a tisztítási folyamatban. Az endogén DN-áz enzimek gyorsan degradálják a DNS-t, ezért gyorsan és hatékonyan kell őket inaktíválni. A legtöbb esetben az endogén nukleázok inaktíválása hővel, vagy speciális anyagokkal történik.
- A hosszú láncú DNS molekulák fizikai, illetve az endogén nukleáz enzimek okozta töredezettségének elkerülése. A DNS kinyerést lehetőleg friss szövetekből kell megkezdeni. A szövetek (levél, szár, mag) melyek nem kerülnek azonnal felhasználásra fagyasztva tárolhatók. Számos szövet előzetes fizikai kezelést pl. a mechanikus dörzsölés igényel.
- Nagy hozamú DNS kinyerése.

10.2. DNS izolálás lépései

10.2.1. A sejtek/ szövetek feltárása

A DNS izolálás első lépéseként a sejteket és a sejtmagokat fel kell tární, hogy a DNS molekulák szabaddá váljanak. A legtöbb tisztítási módszer esetében a sejtek feltárása lízis pufferek segítségével történik. Ezek olyan detergenseket és denaturáló szereket tartalmazó pufferek, melyek a sejtmembránok lipid kettős rétegét bontják, ezáltal lehetővé teszik a genomi DNS kijutását a citoplazmába illetve a külső oldatba. A sejtmembránok mellett, a pufferek a citoplazma fehérjéit is denaturálják. Olyan szervezetek, mint a növények is, melyeknek a sejtmembránon túl sejtfallal is rendelkeznek, mechanikai törést illetve további enzimeket is igényelnek a sejtfallal hatékony megbontásához, vagy durvább sejtfeltárási eljárást kell alkalmazni (pl. dörzsmozsár, kvarchomok, folyékony N-es fagyasztás)

A következő sejtípusok esetében az alábbi **enzimek** használatosak a sejtfallal megbontásához.

- Gram-pozitív baktériumok sejtfallának feltárásához lizozim enzim
- Az élesztők esetében a litikáz enzimek.
- A növényi sejtek DNS kinyerése során celluláz enzimet vagy durva homogenizálást (ld. fent) alkalmaznak.

A minta fehérjeszerkezetétől függően a detergensok lehetnek denaturálók és nem denaturálók. A denaturálók között is megkülönböztetünk anionos (SDS) és kationos (etil(trimetil)ammónium bromid) detergensokat. Ezek teljesen feloldják a membránt és denaturálják a fehérjéket a fehérje-fehérje kötések felbontásával. Ez megváltoztatja a fehérje konformációját, aminek következtében a fehérjék funkciójukat veszítik. A nem denaturáló detergensok az ún. nem ionos detergensok csoportjába tartoznak. Ilyen hatása van a Triton X-100, vagy a CHAPS kemikáliáknak.

10.2.2. Fehérje denaturáció

A denaturáció a fel nem tekeredett fehérjék konformációjának, a másodlagos szerkezetének megváltozása úgy, hogy az aminosavak közötti peptidkötések nem sérülnek. A fehérje denaturáció következtében a fehérjék oldhatósága csökken, elveszítik biológiai aktivitásuk, a proteáz enzimek aktivitása növekszik, a kromoszómális DNS elválí a nukleoprotein komplexről. DNS-kinyerés során a fehérjéket már a sejtmembrán lizálására alkalmazott detergensok is denaturálhatják (ld. fent), de más denaturáló szerek alkalmazása is szükséges lehet:

- karbamid, vagy a guanidine a hidrogén kötések felszakítására
- redukáló szerek a diszulfid hidak bontásához
- töltéssel rendelkező csoportokat tartalmazó sók, melyek alacsony vagy mérsékelt koncentrációban növelik a fehérjék oldhatóságát
- hőkezelés a nem poláris és hidrogén kötések bontására
- egyéb anyagok: EDTA, Mg^{2+}

Denaturáció helyett a fehérjék proteináz-K emésztéssel is eltávolíthatók a lizátumból.

10.2.3. RNS eltávolítása

A DNS izolálás folyamatának további lépése az RNS-ek eltávolítása a DNS mellől. Az RNS-ek lebontásának egyik leghatékonyabb és leggyakoribb módszere az RNS lebontására alkalmazott RN-áz enzim. Az RN-áz enzimmel történő kezelés a DNS extrahálási folyamat mosási lépései közé iktatható be.

10.2.4. A DNS elválasztása a fehérjéktől és a további sejtes elemektől

A nukleinsavak elválasztása a citoplazma többi sejtes elemétől többféle módon történhet.

Szerves oldószerrel

A szennyező RNS és fehérje eltávolítása történhet fenol/ kloroform/ izoamilalkoholos (25/24/1) extrakcióval. A fenol denaturálja a fehérjéket és azért használják kloroformmal együtt, mert a fehérjementesítés hatékonyabb, ha két különböző szerves oldószerrel végzik. Az izoamilalkohol a fenolos szerves és a DNS-t tartalmazó vizes fázis tökéletesebb szétválását teszi lehetővé. Egyes protokollok a fenol/ kloroform/ izoamilalkoholos extrakció után egy extra kloroformos lépést tartalmaznak, ez a fenol nyomokat távolítja el a vizes nukleinsavak oldatból.

Veszélyek

A fenol tartalmú oldatok szembe, bőrre, ruhára ne kerüljenek! Fenolozáskor a gumikesztyű használata kötelező! A csöveket gondosan zárjuk le! A kloroform erősen illékony, ezért pipettázása nehéz, fokozottan tűzveszélyes, nagyobb mennyiségben belélegezve bódító hatású. A centrifugálást kiegyensúlyozott rotorral a szabályoknak megfelelően végezzük!

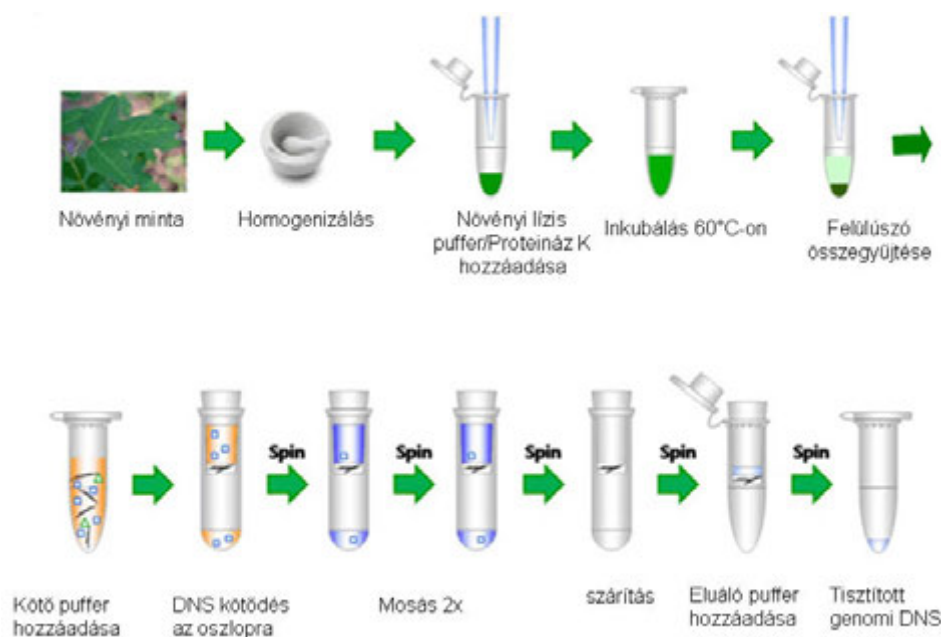
Kisózás

A nukleinsavak hidrofób tulajdonságúak a negatív töltéssel rendelkező foszfát csoportnak köszönhetően. A sókban található pozitív töltésű ionok kapcsolatba lépnek és semlegesítik a negatívan töltött foszfát csoportokat a DNS molekulán, növelve ezzel a molekula oldhatóságát. A magas sókoncentrációjú közegben a fehérjék dehidratálódnak,

elveszítik oldhatóságukat és kicsapódnak. Rendszerint a nagy koncentrációjú nátrium-klorid, kálium vagy ammónium acetát a legalkalmasabbak a kicsapásra. A kicsapódott fehérjék centrifugálással távolíthatók el. A DNS a felülúszóban marad, melyet etanollal lehet visszanyerni (kicsapni) az oldatból.

Szilárd anyaghoz kötött szelektív DNS kötő oszlopok

A legtöbb modern DNS tisztítási eljárás olyan tisztítási módszeren alapul, ahol a DNS-t a nyers sejt lizátumból szelektíven valamilyen anyaghoz kötve választják el. Ilyen lehet a szilícium dioxid, vagy az anion-cserélő gyanta (10.1. ábra). Előnyei, hogy gyors, kényelmes, szerves oldószerektől mentes, automatizálásra/minimalizálásra alkalmas.



10.1. ábra Növényi DNS izolálás lépései a kereskedelmi forgalomban kapható anion cserélő oszlopot tartalmazó kit segítségével. A két sorban ábrázolt folyamatára az egymást követő lépéseket mutatja be.

Szilícium dioxid oszlop:

- A magas koncentrációjú sók (pl. guanidinium HCl) jelenlétében a DNS szelektíven kötődik a szilícium dioxidhoz, a fehérjék azonban nem kötődnek
- A lerakódott sók alkoholos oldatokkal eltávolíthatók a membránokról vagy az oszlopkokról
- Alacsony koncentrációjú ionos pufferrel a DNS molekulák leoldhatók a membránról.

Előnye: gyors, automatizálható, centrifugálás nem szükséges (vákuum is alkalmazható), és szerves oldószert nem alkalmaz.

Anion cserélő oszlop (pl. QIAGEN Plasmid Midi Kit)

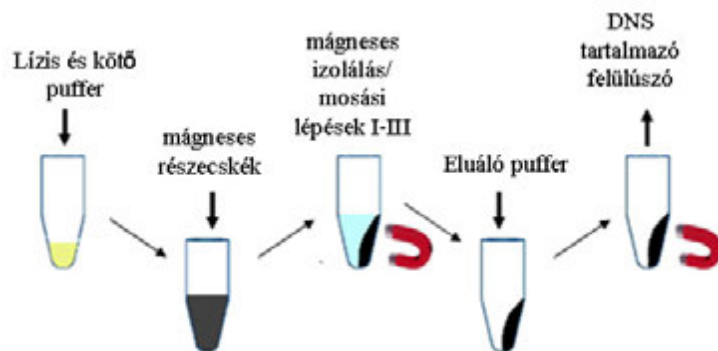
A DNS molekulában lévő negatíván töltött foszfát csoportok és pozitívan töltött részecskék közötti kölcsönhatáson alapul. A DNS alacsony sókoncentráció jelenlétében kötődik az oszlophoz. A fehérjék és az RNS molekulák közepes sókoncentrációjú pufferekben lemoshatók. A DNS eltávolítása az oszlopról nagy sókoncentráció jelenlétében lehetséges. Az oldatba vitt DNS molekulák etanollal kicsaphatók.

Előnye: Szerves oldószertmentes, gyors, de nagyobb felügyeletet igényel és drágább, mint a szilícium dioxid oszlopok.

Mágneses elválasztás (szilícium vagy töltés alapú)

Ebben az eljárásban a DNS-t mágneses részecskéhez kapcsoljuk (10.2. ábra). A mágneses részecskék lehetnek szilícium alapúak. Itt is a DNS kapcsolódása/elengedése a sókoncentráció függvényében történik. Ha mágneses részecskék töltés alapúak, akkor a részecskék töltésének a változása az oldat pH-jának függvényében változik. A negatívan töltött DNS-ek leválnak.

A mágneses részecskékhez kötött nukleinsav (DNS/RNA) izolálási módszer előnye, hogy gyors, szerves oldószer és lecsapásmentes. Könnyen automatizálható.



10.2. ábra Mágneses részecskékhez kapcsolt DNS izolálás lépései. Az ábra a DNS izolálás egymást követő lépéseit mutatja be a feltüntetett nyilak irányának megfelelően.

A kromatográfias módszerek komoly hátránya, hogy viszonylag gyenge kihozatal mellett nem alkalmas nagy molekulású (≥ 50 kb) DNS izolálására, emiatt molekuláris klónozáshoz ill. DNS blothoz más módszereket kell választani.

10.3. Egyéb DNS tisztítási módszerek

Nagy mennyiségű és nagy tisztaságú DNS izolálás CsCl-etidium bromid gradiens centrifugálással

A módszer során először centrifugálással eltávolítjuk a lizátumból a sejtalkotók és fehérjék nagy részét. Ezt követően ultracentrifugálással, CsCl (cézium klorid)- etidium bromid gradiensben történő egyensúlyi centrifugálással választjuk el egymástól az eddig oldatban maradt DNS-t, RNS-t és a szennyeződések. A lizátum minden mL-éhez 1 g szilárd CsCl-ot adunk. Ezután minden 10 mL DNS/ CsCl oldathoz 0.8 mL etidium bromidot (10 mg/ml) oldatot keverünk. Az oldatot 8000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk, a felülúszót lezárható speciális ultracentrifuga csőbe (Beckman) töltjük és 24 órán keresztül 60 000 rpm-el 20 °C-on ultracentrifugáljuk. A centrifugálás után a szétvált nukleinsavak UV fényben láthatók. Az RNS a centrifuga cső alján, a lineáris és a zárt cirkuláris DNS-ek feljebb, elkülönülő sávban jelennek meg. Egy injekciós tű segítségével leszívjuk a DNS-t. Az etidium bromidot vízzel telített butanolal eltávolítjuk, a DNS-t tartalmazó oldatot dializáló hüvelyben 24 órán keresztül Trisz-EDTA oldattal szemben dializáltatjuk. Korábban a CsCl-os DNS-tisztítást általánosan használták a génpuskás növényi transzformációhoz szükséges nagyon nagy mennyiségű, és nagy tisztaságú DNS előállítására. Mára a szilícium alapú oszlopok, illetve az anioncserélő oszlopok használata nagyrészt kiszorította ezt a munkaigényes, és az alkalmazott etidium bromid miatt veszélyes módszert.

Cetavlon módszer

Cetavlon (cetyltrimethylammonium bromide, CTA-Br) egy erős kationos detergens, mely segítségével a DNS híg sóoldatokból kicsapható. 1953-ban írták le, hogy a DNS víz-oldhatatlan sókat képez Cetavlon jelenlétében. A nukleinsavaknak ez a tulajdonsága a DNS izolálásra szolgáló Cetavlon módszer alapja. A módszer azt az előnyt használja ki, hogy a nukleinsavak nagy ionerősség jelenlétében is feloldódnak, pl. ha a NaCl koncentráció magasabb, mint 0,5 M. Az összes ismert Cetavlon módszer alkalmazása során a biológiai anyagot Cetavlon oldattal kezelik nagy ionerősség jelenlétében, majd a sejtes törmelék és a fehérjék kloroform-izoamilalkoholos extrakcióval távolítják el, végül az ionerősség csökkentésével kicsapják a DNS-CTAB komplexet. Ezután a DNS-t nátrium acetát/etanol elegyben történő mosással nátrium sójává alakítják. A kapott DNS preparátumunk erősen szennyezett fehérjékkel és RNS-sel, ezért tiszta DNS izolálás további frakcionálást (pl. fenollal kombinált extrakció) vagy

kromatográfiás tisztítást igényel. A módszer alkalmas a DNS 80%-ban történő visszanyerésére a 20-10⁶ Da és nagyobb molekulatömeg tartományban.

10.4. DNS mennyiségi meghatározási módszerek

Spektrofotométer: Az egyik leggyakrabban használt módszer a koncentráció mérésére; az oldat fény elnyelését használja fel a Lambert-Beer törvény szerint: $A = e \times c \times l$, ahol A: abszorbancia, e: exsztinációs koefficiens, c: koncentráció, l: úthossz. A spektrofotométer egy adott hullámhosszon méri az elnyelt fényt. A DNS koncentrációmérés azon alapul, hogy a DNS elnyeli a 260 nm hullámhosszú UV-fényt. A módszer nem pontos.

Egyéb nagy és kis érzékenységű módszerek: Fluoreszcenciás mérésen alapuló meghatározás fluoriméteren DNS-kötő fluoreszcens festék, Ribogreen használatával (érzékeny módszer). DNS-koncentráció meghatározása kvantitatív real-time PCR-el (a legérzékenyebb módszer) illetve a koncentráció becslése egy ismert koncentrációjú minta alkalmazásával agaróz gélen (hozzávetőleges becslés).

10.5. A gyakorlat menete

Növényi genomi DNS izolálás

1. **Anyagok:** ~ 20 mg friss vagy fagyasztott növényi szövet. Vágjuk a szöveteket kis darabokra. Ezután dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben porszerűvé dörzsöljük, majd egy steril Eppendorf csőbe tesszük. Hozzáadunk 200 µl AquaGenomic oldatot.
2. Homogenizáljuk az oldatot vortex segítségével. Majd adjunk hozzá 1/10 térfogat arányban (~30 µl) izopropanolt a habzás csökkentéséhez. Ezután a lizátumot 65 °C-on 15 percig inkubáljuk.
3. Óvatosan vortexeljük, majd a lizátumot centrifugáljuk 14.000 g-n, 5 percig.
4. A felülúszót egy új centrifugacsőbe helyezük. Adjunk hozzá 1 térfogatnyi (~180 µl) 100% izopropanolt és vortexeljük 1 percig. Centrifugáljuk az oldatot 14.000 g-én, 5 percig a DNS csapadék összegyűjtésére. Elöntjük a felülúszót, majd a DNS csapadékot 70% alkohollal mossuk. A mosást kétszer ismételjük. Az alkohol teljes eltávolítása után a DNS-t levegőn, 37 °C-on szárítjuk. Adjunk 40 µl TE puffert vagy desztillált vizet a DNS oldatba viteléhez.

11. fejezet - Nukleinsavak elválasztásának módszerei

szerző: Dr. Oszvald Mária

DNS-fragmentek egymástól való elkülönítésére leggyakrabban elektroforetikus módszereket alkalmaznak, melyek a kromatográfia elvén alapulnak. A kromatográfias módszereknél álló és mozgó fázist alkalmaznak, ahol az álló fázishoz kevésbé kötődő anyagok gyorsabban haladnak át a rendszeren (eluálódnak). Pl. gélelektroforézisnél a gélben kevésbé elakadó, kisebb méretű molekulák adott idő alatt messzebbre jutnak, mint a nagyok. Az elektroforézis során az egyenáramú elektromos térbe helyezett töltéssel rendelkező molekulák a töltésükkel ellentétes pólus irányában mozdulnak el. A molekulák az elmozdulásuk mértéke alapján azonosíthatók. Az elektroforézis preparatív célra is használható, vagyis a számunkra szükséges fehérje- vagy DNS-molekulát tartalmazó sávot ki lehet vágni a gélből, a molekulákat pedig vissza lehet nyerni belőle.

A nukleinsavak elektroforetikus elválasztása a fehérjéknél egyszerűbb, mert a foszfát csoport miatt töltéssel rendelkeznek, így jól mozognak elektromos erőterben. Azt, hogy milyen elektroforézist használunk, a DNS-fragmentek mérete, az elválasztandó DNS-mennyisége és az igényelt pontosság dönti el:

A) **poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)**: 500 nukleotidnál rövidebb fragmentek elválasztására használatos és segítségével egyetlen nukleotid pontossággal meg lehet a fragmentek méretét határozni. Régebben DNS-szekvenálásnál is használták.

B) **agaróz gélelektroforézis**: koncentrációtól függően hús – több ezer nukleotid hosszú fragmensek elválasztására alkalmas, kevésbé pontos. Egyes speciális alkalmazásainál (pulse field, illetve rotation GE, ld. lejjebb) több MB méretű egész kromoszómák is elválaszthatók. Az agaróz gélelektroforézis a legáltalánosabban használt módszer a DNS-elválasztására, érzékenysége (2 ng már látszik egy fél centis zsebben Etidium bromiddal festve, SYBR Greenel v. Golddal még kevesebb is) a legtöbb laboratóriumi munkához elegendő.

C) **Kapilláris elektroforézis (CE)**: maximum néhány száz bp. hosszú DNS-fragmentek elválasztására alkalmas, akár egy nukleotid pontossággal. Itt egy vékony, belülről töltött részecskékkel borított kvarc kapillárisban áramoltatják az elválasztani kívánt molekulákat, magas feszültséggel. Nagyon pontos, érzékeny (akár 0,1 ng/μL DNS érzékelhető) és jól automatizálható, de drága. DNS-szekvenálásnál, vagy pl. igazságügyi DNS-laborokban PCR-termékek elválasztására használják.

11.1. A gélelektroforézis

Töltéssel rendelkező részecskék elektromos térben töltésüknek megfelelő irányban mozognak. A pozitív töltésű kationok a negatív katód, míg a negatív töltésű anionok a pozitív anód felé haladnak. Az elektródok felületéhez érve az ionok töltésüket veszítik. Elválasztástechnikai szempontból az ionok áramlása az ún. *elektroforézis* a lényeges; az ionok semlegesítődése az *elektrolízis* másodlagos kísérőfolyamatnak tekinthető.

A „gél” olyan mátrixot jelent, mely tartalmazza, majd elválasztja a molekulákat. A legtöbb esetben a gél egy keresztkötött polimer, mely összetétele és porozitása a meghatározandó molekula összetételén és méretén alapul.

Kis molekulaméretű nukleinsavak (DNS, RNS vagy oligonukleotidok) elválasztására az akrilamid és a keresztkötő vegyület különböző koncentrációjú keverékéből kialakított eltérő pólus méretű térhálós szerkezetű poliakrilamid gél használható. Nagyméretű nukleinsavak (néhány száz bp-nál hosszabb molekulák) esetében a tisztított agaróz az előnyben részesített elválasztási módszer. Mindkét esetben a gél szilárd, porózus mátrixot alkot. Az akrilamid, a már polimerizálódott formájával, a poliakrilamiddal ellentétben erős idegméreg, ezért megfelelő óvatossággal kell kezelni.

Az elektroforézis során a molekulák elektromos térbe helyezve tömegük/méretük által meghatározott távolságra jutnak el a mátrixban, az elektroforézis ideje alatt.

Alkalmazás

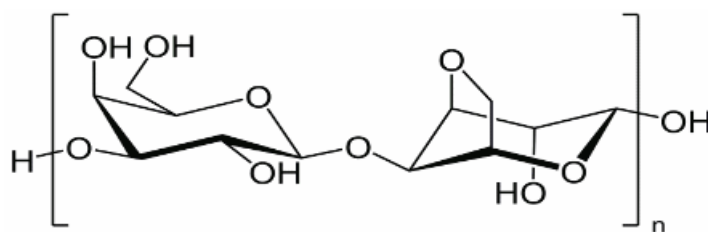
A gélelektroforézis a növényi molekuláris biológiában, genetikában, mikrobiológiában és a biokémiában gyakran használt módszer. A dupla szálú DNS fragmentek a gélben hosszú rúdként viselkednek. Az egyszálú DNS vagy RNS molekulák komplex alakú molekulákká tekerednek fel és harmadlagos szerkezetük alapján egy összetett viselkedés szerint vándorolnak a gélben. Ezért olyan anyagok, mint a nátrium hidroxid vagy a formamid, melyek a hidrogénkötéseket bontják, gyakran használatosak a nukleinsavak denaturációjára. A denaturáció következtében a DNS molekulák ismét hosszú rúdként viselkednek.

A denaturáló agaróz gélelektroforézis rendszerint RNS preparátumok minőségének és méretének az ellenőrzésére szolgál. Az RNS molekulák sok különböző másodlagos szerkezetet alkothatnak, mely befolyásolja a mobilitásukat elektromos térben. Egyik ilyen RNS denaturáló szer a formaldehid, amely denaturált formában tartja az RNS-t. Az elektroforézis után az RNS etídium bromid festékkel vizualizálható. A TBE puffer is denaturálja az RNS-t.

A lúgos agaróz gél alkalmas egyszálú DNS-ek és a cDNS szál méretének az ellenőrzésére.

11.2. Agaróz

Az agaróz egy lineáris agarobióz diszacharid az 1,3 kapcsolt béta-D-galaktopiranoz és 1,4 kapcsolt 3,6-anhidro-alfa-L-galaktopiranoz összekapcsolódásából álló poliszacharid, melyet tengeri vörös algából nyernek. A polimert alkotó diszacharid egység képletét az 11.1. ábra mutatja.



11.1. ábra Az agarobióz szerkezeti képlete. A molekula az agaróz polimert felépítő alegység molekulát mutatja.

Az agaróz gél agarózból és az elektroforézis pufferből áll össze. Az agar-agar (agaróz) melegítés hatására feloldódik az elektroforézis pufferben. Az így kapott víztiszta oldat megfelelő formába öntve 32-40°C körüli hőmérsékletre hűlve megszilárdul, és térhálós szerkezetet alkot oly módon, hogy a lineáris polimer szálak dupla helikális szerkezetbe rendeződnek, melyeket a jelenlévő vízmolekulák hidrogén hidak kialakításával stabilizálnak.

Az agaróz jellemzői, típusai

Az agaróz legfőbb jellemzői az olvadási/ gélesedési hőmérséklet, a gél erőssége, és az elektroendozmózis (EEO). Az agaróz gélek alacsony olvadási hőmérséklete (alacsonyabb, mint a DNS denaturálódási hőmérséklete) lehetővé teszi, hogy a DNS sértetlen maradjon a gél melegítése során. Így lehetővé válik a nukleinsavak gélből történő könnyű tisztítása. A gél további fizikai paraméterei közül az erőssége is fontos, ha a felhasználása mechanikai változásokat vagy kezeléseket is magába foglal, mint pl. a Southern vagy a Northern blot analízis során. Az agaróz EEO-ja (a nem töltött molekulák mozgása a katódon keresztül az elektroforézis során) meghatározza a makromolekulák természetes mobilitását a gélen belül. Az alacsony EEO érték esetén a nukleinsavak gyorsabban vándorolnak növelve az elválasztás hatékonyságát, mert ilyenkor a vándorlást csak a molekulaméret határozza meg.

Az alacsony EEO nagy elektroforetikus mobilitást biztosít a makromolekuláknak, lehetővé téve a rövidebb futást megnövekedett sávfelbontással.

A magas olvadási hőmérséklettel rendelkező agaróz gélek leginkább analitikai elektroforézishez használatosak. Ideális kisméretű 30-2000 bp DNS, RNS és PCR fragmentek elválasztására, illetve Southern valamint Northern blot analízishez.

A) Alacsony olvadáspontú agaróz

Az alacsony olvadáspontú agarózok ideális 1000 bp-nál nagyobb DNS és RNA fragmentek elválasztására, illetve nukleinsavak agaróz gélből történő visszanyerésére, mivel olvadási hőmérsékletük 65.5°C, ami alacsonyabb, mint

a legtöbb nukleinsav olvadási hőmérséklete. Az oldat folyékony állapotban marad 37°C-on, míg 25°C alatt gyorsan megszilárdul. Az alacsony olvadáspontú gél a precíz analízisekhez, beleértve az enzimekhez kapcsolt reakciókat, mint a klónozás, a PCR, restrikciós hasítás, ligálás, vagy fluoreszcens illetve radioaktív jelölések a legalkalmasabbak. A klónozáshoz, PCR-hez, szekvenáláshoz szükséges DNS kinyerhető a felolvasztott gélből.

B) Nagy felbontású agaróz

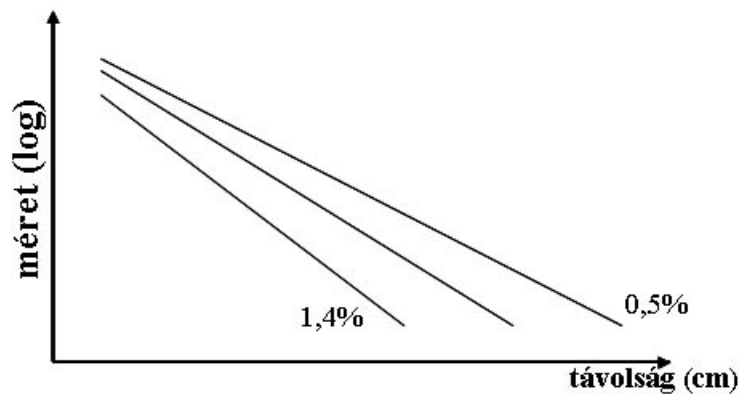
Ebbe a csoportba tartozik a közepes gélesedési hőmérséklettel rendelkező agaróz, mely alkalmas kisméretű DNS és RNS fragmentek elválasztásra 20-800 bp hosszúságban. Ideális DNS és RNS molekulák visszanyerésére, valamint kisméretű nukleinsavak analitikai és preparatív elektroforézisére. Az erősebb gélszerkezet következtében a gél kezelése könnyebb, a gél tisztasága és láthatósága nagyobb lesz.

A nukleinsavak vándorlását befolyásoló tényezők

DNS molekula mozgási sebességét több tényező is befolyásolja. Ilyenek a *molekula mérete, az agaróz koncentrációja, a DNS konformációja, az alkalmazott feszültség, a festék jelenléte vagy a puffer összetétele.*

A molekula mérete

Az elektromos tér hatására a kettős hélixet alkotó DNS molekula a méretének fordított logaritmusával megfelelő sebességgel vándorol a gélben. Azaz a nagyobb DNS darabok lassabban, a kisebbek gyorsabban mozognak (11.2. ábra). Ez részben a korábban tárgyalt molekulaszűrő hatással illetve a nagyobb sűrűlési ellenállással magyarázható, mivel a nagyobb molekulák átjutása a gél pórusain nehezebb.



11.2. ábra Kettősszálú DNS vándorlása 0,5-1,4 % agaróz gélben. A diagram az agaróz gélben a DNS molekula által megtett távolság (x tengely) függvényében mutatja a molekula méretének logaritmikus értékét (y tengely)

A molekula mérete és a gélben megtett vándorlási távolság között a kapcsolat logaritmikus és nem lineáris. Ezért a nagy fragmentek közelebb vannak egymáshoz, míg a kis fragmentek messzebb vándorolnak. A kisméretű fragmentek festés után széles gyenge sávokat mutatnak a gélben. Ennek oka, hogy a sávok intenzitása függ a DNS molekulába beépült etidium bromid mennyiségétől. Mivel a kisebb nukleinsav fragmenteknek kevesebb bázisból épülnek fel, ahova az etidium-bromid be tud épülni, így a kisebb molekulák intenzitása alacsonyabb lesz. Továbbá, ahogyan a molekulák egyre messzebb haladnak a gélben, úgy a DNS egyre inkább hajlamos a diffúzióra. Ezért a kisebb fragmentek homályos sávokat fognak képezni. A laboratóriumi gyakorlatban leggyakrabban használt 1%-os agaróz gél leginkább közepes méretű fragmentek megkülönböztetésére alkalmas, és gyakran alkalmatlan nagyon nagy és nagyon kicsi molekulaméretű DNS molekulák elválasztására.

Az ismeretlen méretű DNS molekulák méretének megállapításához ismert méretű DNS darabokból álló standardot alkalmaznak, és ehhez viszonyítják annak mozgékonyosságát. Az ismeretlen DNS méretének megállapításához legtöbbször a λ fág HindIII restrikciós enzimmel történő emésztésével nyert fragmentumait használják. Újabbán népszerű az ún. „1 kb-os létra” (gyári DNS-fragmentum keverék) alkalmazása.

Az agaróz koncentrációja

A nukleinsavak vándorlását meghatározó harmadik tényező, a gél koncentrációja. Az alkalmazott agaróz koncentrációja meghatározza a gél sűrűségét és a pórusok méretét. A háló pórusméretének növelése megkönnyíti a nagy molekulájú DNS fragmentek áthaladását, míg a háló méretének csökkenése késlelteti a kisméretű molekulák haladását, ami csökkenti a diffúzió mértékét is.

A gyakorlatban használatos agaróz gélek koncentrációja általában 0,5-3% között változik. Kisebb DNS-molekulák elválasztásához töményebb (pl. 150 bp DNS – 2%-os gél), még nagyobb DNS-molekulákhoz hígabb (pl. 1500 bp-os DNS-hez 0,8 %) gél használatos. A gél sűrűsége a nukleinsavak szétválasztására van hatással. A gél átlagos pórusmérete megszabja, hogy a gél milyen méretű DNS darabokat tud hatékonyan szétválasztani. A DNS mozgékonyasága és a gél koncentrációja között a következő összefüggés írható fel:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K r T$$

ahol a μ mobilitás a T pedig a gél koncentráció.

A DNS konformációja

A DNS mérete mellett annak alakja is befolyásolja a vándorlás sebességét; a szuperhelikális, cirkuláris és lineáris DNS mozgékonyasága az elektroforézis körülményeitől (áramerősség, ionerősség) függő módon eltérő.

Az azonos molekulásúlyú zárt cirkuláris (I. forma), nicked cirkuláris (II. forma) és a lineáris (III. forma) DNS különböző sebességgel vándorol az agaróz gélben. A három forma relatív mobilitása elsősorban az agaróz koncentrációjától függ, de hat rá az áramerősség, a puffer ionerőssége és az I. formán levő szuperhelikus menetek sűrűsége.

Alkalmazott feszültség, festék jelenléte

Az elektroforézis során az ionok vándorlási sebességét a töltéssűrűségük és az alkalmazott feszültség- gradiens nagysága szabja meg. A feszültség-gradiens egyenesen arányos a két elektród közötti feszültségkülönbséggel és fordítottan arányos az elektródok távolságával. Az elektródok távolsága a készülék geometriájától függ; mivel az elektródok fix beépítésűek, ezt a tényezőt nem áll módunkban megváltoztatni. Szabályozható viszont az elektródokra kapcsolt egyenáramú áramforrás feszültsége. Minél nagyobb a feszültségkülönbség (egy bizonyos határig), annál gyorsabb az elválasztás, azonban a nagy feszültséghez nagyobb áramerősség tartozik; ami a futtató puffer és a készülék felmelegedéséhez is vezet. Nagyobb hőmérsékleten gyorsabb a diffúzió mértéke is, ami rontja az elválasztás hatékonyságát. Ezért olyan optimális feszültséget kell megválasztani, ami a lehető legrövidebb idő alatt megfelelő elválasztást biztosít. A futtatáshoz ajánlott feszültség 5 V/cm.

A puffer összetétele

Elektroforézis puffer összetétele: A DNS mobilitása az elektromos térben függ az elektroforézis puffer összetételétől és ionerősségétől is. Ionok hiányában (pl. nem elektroforézis pufferrel készített gél esetében) az elektromos vezetőképesség minimális és a DNS csak lassan, vagy egyáltalán nem mozog. Ha a puffer ionerőssége túl magas (pl. 10x töménységű elektroforézis puffer használatánál), a vezetőképesség nagyon nagy lesz, ami jelentős hőképződéssel jár. Legrosszabb esetben a gél megolvadhat, és a DNS denaturálódhat.

Több elektroforézis puffer ismert a gyakorlatban. Ezek a pufferek ionokat biztosítanak az adott pH fenntartására egy viszonylag konstanst értéken. Az elektroforézishez leggyakrabban használt puffer a Trisz/acetát/EDTA összetételű TAE, illetve a Trisz/Borát/EDTA TBE pufferek.

További pufferek, mint pl. a lítium borát (LB) meglehetősen ritkán használatosak. A legtöbb esetben alacsony áramerősség (ami kevesebb hő termel) és/vagy azonos ion mobilitás jellemző rájuk, ami hosszabb puffer élettartalmat eredményez. A borát használata a pufferben azonban problémás lehet, mivel polimerizációra képes, illetve kapcsolatba léphet az RNS-ben is található cisz-diol kötésekkel. A TAE-nek van a legalacsonyabb puffer kapacitása, de a legjobb minőségű elválasztást biztosítja a nagy molekulaméretű DNS molekulák elektroforézist során. Ilyenkor nagyobb feszültségen és hosszabb ideig történik az elválasztás, de jobb minőségű terméket eredményez.

DNS tisztítás agaróz gélből

Az elektroforézist követő gélből történő izolációs technikák a szükséges DNS szakasz visszanyerését teszik lehetővé. A kinyerés után a fragmentek összekeverhetők, lecsaphatók majd enzimesen összekapcsolhatók, ligálhatók.

A nukleotidok agaróz gélből történő visszanyerésére több módszer is létezik. A módszer kiválasztásánál fontos figyelembe venni a DNS hozamot és a tisztaságot. Az agaróz számos szennyeződést tartalmazhat, ami gátolhatja a visszanyerés folyamatát, ha nem megfelelően választjuk el az agarózt a nukleotidoktól. A kereskedelmi forgalomban kapható modern tisztító oszlopokat tartalmazó kitek egyidejűleg végzik a DNS tisztítást és az enzimek aktivitásának gátlását, ezért nagyon jók a szennyeződések eltávolítására, míg a korábbi módszerek kevésbé hatékonyak.

Első lépésben az etidium bromiddal megfestett DNS molekulákat UV fényel világítják meg a keresett DNS fragment azonosítására. A DNS mutagenézis elkerülésére az UV fényel történő megvilágítás idejének minimálisnak kell lennie. Ezután az azonosított DNS molekulát pengével elválasztjuk a gél többi részétől. A kivágott gél tartalmazza a számunkra érdekes DNS fragmentet. Alternatívaként SYBR Safe DNA gél festék használható a DNS töredezés elkerülésére. Ezután a melegítéssel az agaróz gél felolvasztható, majd a nukleotidok oszlopon tisztíthatók, illetve a mosási lépések után visszanyerhetők. A legtöbb módszer hatékonysága azonban alacsony.

Elektroelúció

A legnépszerűbb alternatív módszer a teljes DNS tisztításra az elektroelúció. Az elektroelúció legközvetlenebb módja, ha a DNS sávot kivágjuk a gélből, majd egy dialízis membránzacskóba helyezük. Ezt a membránt aztán elektroforézis pufferrel töltjük meg, majd elektromos térbe helyezük. A DNS-ek kivándorolnak a gélből a pufferbe, majd a puffert benne a benne lévő DNS molekulával együtt összegyűjtjük a membránból. A nukleinsavak alkoholos kicsapás után felhasználhatók további enzimes, kémiai és biológiai reakciókban.

Agaráz

Az agaráz enzim specifikusan emészt a poliszacharidokat agaró-oligoszacharid magokra. Az agaráz enzim lehetővé teszi a nukleotid fragmentek hatékony visszanyerését alacsony olvadáspontú agaróz gélből. Az így visszanyert nukleinsavak közvetlenül használhatók klónozáshoz vagy a szevenáláshoz. Kíméletes, nagy hatékonyságú módszer, mely ideális mind hosszú, mind rövid (<100 bp) DNS fragmentek visszanyerésére. Az enzim aktív TAE és TBE elektroforézis pufferben egyaránt.

11.3. Váltott elektromos mezejű gélelektroforézis (Field Inversion Gel Electrophoresis)

1984-ben Schwartz és Cantor írták le először a pulzáló mezejű (pulsed field) gélelektroforézist (PFGE), bevezetve ezzel egy új módszert a DNS elválasztására. PFGE először tette lehetővé extrém nagyméretű DNS fragmentek elválasztását, növelve a DNS elválasztás méretkorlátait a 30-50 kb-tól egészen a 10 Mb-ig. Így nagyszámú kisméretű fragment klónozása helyett a PFGE lehetővé teszi kisszámú, nagyméretű genom darabok analizisét és klónozását.

Alkalmazása: mesterséges élesztő kromoszóma klónozása, fizikai térképezés, *in vivo* kromoszóma degradáció és törés detektálása, kromoszóma méretek meghatározása és detektálása.

Elmélete: A folyamatos elektromos térben a 30-50 kb-nál nagyobb DNS molekulák a mérettől függetlenül együtt mozognak, kb. elakadnak az agaróz hálóban, eltömik a gélt. Ez a gélen egy nagy diffúzió sávként tűnik fel. Ha a DNS-t a mozgás irányának megváltoztatására kényszerítjük, akkor a különböző méretű fragmentek ezen a diffúzió sávon belül elkezdnek szétválni egymástól, ki tudnak kerülni a „kátyúból” és elválaszthatók. Az elektromos mező átrendeződése következtében a kisméretű DNS molekulák gyorsabban kezdenek az új irányba mozogni, mint a nagyobb nukleotidok. Így lehetővé válik a nagyobb fragmentek elválasztása a kisebb méretű DNS molekuláktól.

Forgó gélelektroforézis (RGE)

Az RGE az egy leggyakrabban használt fajtája a pulzáló mezejű technikáknak. Az elektródok meghatározott polaritással az ellentétes oldalakon helyezkednek el a pufferben. A DNS új irányba történő elválását a gélben egy mágneses hajtómű egyszerű elforgatásával lehet elérni. Mivel a DNS orientációs szögét egy mechanikus kapcsolat határozza meg, így a RGE nagy rugalmasságot biztosít a gél futtatás során viszonylag alacsonyabb költségek mellett.

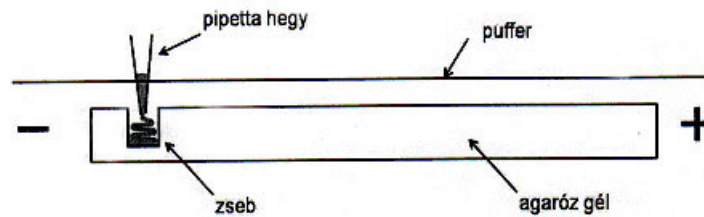
Számos paraméter szerepet játszik a PFGE-vel történő elektroforézis során. Ilyen az alkalmazott feszültség és elektromos mező erőssége, a pulzusok hossza, a re-orientáció szöge, az agaróz típusa és koncentrációja, az alkalmazott standardok, és ha lehetséges, akkor a feltöltött DNS mennyisége. Pl: egy 18x20 cm-es 1-1,2%-os

agaróz gél futtatása 1-8V/cm feszültséggel, 100-120 fokos orientációs szöggel, 60-120s pulzushosszal. A futtatás ideje 16-50 óra.

Agaróz gél készítése

Készítünk egy 1%-os (vegyes %) agaróz gél (100 ml 1x TAE pufferben 1g agarózt teszünk). Mikrohullámmal 1-2 percig (szakaszosan) melegítjük, gyakran rázogatójuk. A jó agaróz oldat vízszertű, áttetsző, sűrűbb agaróz szemcséket nem tartalmaz. Ha már homogén és teljesen víztiszta, akkor kb. 50-60 °C-osra hűtjük, majd a gél beleöntjük az előre elkészített gél tálcába. A gél méretétől függően legalább 20-40 perc dermedési időt kell hagyni, mielőtt a "fésűt" és a szigetelő szalagokat (léceket) eltávolítjuk. A megszilárdult gél behelyezzük az elektroforézis kádba úgy, hogy a puffer ellepje (kb. 1 cm-rel). Óvatosan kihúzzuk a fésűt a gélből és eltávolítjuk a ragasztószalagot a tálca két végéről. A zsebek sérülésének megakadályozásához a zsebek környékén a gél felületére 1xTAE oldatot csepegtetünk.

A mintákhoz hozzáadunk 2 µl „sample loading dye”-t, majd óvatosan 7 µl-t bepipetázzuk a gélen lévő zsebekbe, a puffer alá rétegezve. A minták mellé standardként 7 µl DNS létrát vagy *HindIII*-mal emésztett λ-fág DNS-t viszünk fel. A gél a futtatókádba helyezük és feltöltjük pufferrel (kb. 600 ml 1xTAE) (11.3. ábra). Bekapcsoljuk a tápegységet, ügyelve a polaritásra (a DNS a pozitív sarok felé vándorol). A mintákat 100 V feszültségen 0,5-1 órát futtatjuk. A „sample loading dye” (Biorad) két kék festéket tartalmaz, amelyek nem festik meg magát a DNS-t, de megkönnyítik a zsebek megtöltését és segítik az elektroforézis állásának nyomon követését. A „gyorsabb” festék a brómfenolkék a körülbelül 300 bp méretű, a „lassabb” a körülbelül 2,5 kb méretű DNS fragmentekkel vándorol együtt. A gél futását a brómfenolkék állása alapján követjük, ált. akkor állítjuk meg, ha kb. 1 cm-re van attól, hogy kifusson. A futtatás után a DNS fragmentek elhelyezkedését festési eljárás segítségével vizsgáljuk. Az elektroforézis befejezése után a gél 5 percre etidium-bromid oldatba áztatjuk, majd UV lámpa alatt vizsgáljuk.



11.3. ábra Nukleotid minta felvitele és futtatása agaróz gélben. A mintát pipetta segítségével visszük fel a géltre a mintatartó zsebbe, majd a gél pufferben elektromos erőterbe helyezzük.

A gélkép alapján nyerhető információk:

- A DNS sávok helyzete és intenzitása felvilágosítást ad a *minta tisztaságáról*. Ha a várt sáv (ok) mellett további sáv(ok) is észlelhetők, ez a minta szennyezettségére utal. A várt és extra sávok intenzitása a szennyezés mértékéről ad tájékoztatást. Elképzelhető, hogy a szennyezés a minta degradációjának eredménye, ilyenkor a vártnál kisebb méretű extra sávok jelennek meg. Az aspecifikus módon degradálódott DNS nem ad jól elkülöníthető sávokat, a gélen széles mérettartományban detektálható festődés. Hasonlóan elmosódott sávot okozhat mRNS szennyezés is.

- Ha a minta DNS pontos koncentrációját nem ismerjük, a sáv(ok) intenzitásából következtethetünk a felvitt minta *körülbelüli koncentrációjára*. Ilyenkor célszerű a mintából különböző térfogatokat felvinni egymás melletti zsebekbe és a festődés intenzitását ismert mennyiségű DNS-t tartalmazó sávok intenzitásával összehasonlítani.

- Lehetőség van az ismeretlen DNS darab *méretének* meghatározására. Ehhez ismert méretű (standard) DNS minták mozgékonyásával kell az ismeretlen anyag mozgékonyágát összehasonlítani.

11.4. Feladatok

1, Nyerjen ki DNS-t 100 mg búza levélmintából a DNS-kötő oszlopokkal! Majd készítsen 2%-os agaróz gélt! Adjon a DNS mintához megfelelő mennyiségű felvivő puffert (6 µl), keverje össze! Vigyen fel az agaróz géltre 15 µl mintát a kontroll mintájukból és a frissen kinyert DNS-t. Futtassa meg a géleket, fesse meg etídium bromid oldatban, majd mosás után UV lámpánál vizsgálja meg őket.

11.5. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) a leggyakrabban használatos gélelektroforézis, ahol az elektroforézis során hordozó közegeként poliakrilamid gélt használnak.

Bár a PAGE végrehajtása jóval körülményesebb, a módszer több előnnyel is rendelkezik az agaróz gélelektroforézissel szemben:

- 1, Kisebb méretű fragmentumok elválasztására alkalmas az akrilamid koncentrációjától (3,5%-20%) függően 1000-6 bp.
- 2, A felbontása sokkal nagyobb, akár 0,2% különbség is kimutatható DNS fragmentumok méretében.
- 3, Sokkal nagyobb mennyiségű DNS-t lehet egy zsebbe tölteni, mint agaróz gél esetében (akár 10µg/zseb).
- 4, A poliakrilamid gélből izolált DNS nagyon tiszta, így a DNS tisztaságára kényes módszereknél (pl. embriók injektálása) is felhasználható

Az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok és iniciátorok jelenlétében gyökös polimerizációra képes, és a reakció során nagy mólsúlyú lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Ez utóbbi vizes oldata rendkívül nagy viszkozitású. Megfelelő keresztkötő ágens, N,N-metilén-bisz-akrilamid jelenlétében a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre. Az elektroforézis során a nukleotidok ebben a gélben vándorolnak.

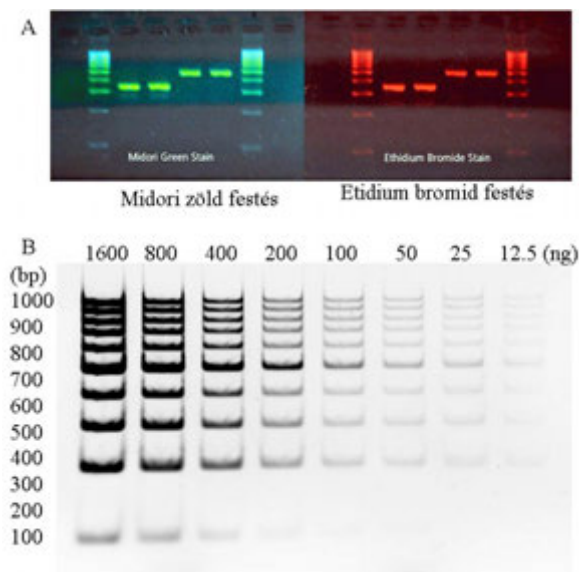
Az poliakrilamid gél nagy felbontóképességnek oka, hogy a relatív töltések különbségén alapuló elválasztással egy időben a gélben a molekulák méret és alak szerint is elválnak egymástól. Ezt a hatást a gél átlagos pórusmérete szabja meg, ami az akrilamid-monomer koncentrációjának és a térhálósító metilén-bisz-akrilamid százalékos arányának megválasztásával változtatható. A gél mechanikus tulajdonságai leginkább a kb. 4-20% akrilamid koncentráció-tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilén-bisz-akrilamid mennyisége az alkalmazott akrilamid-monomernek rendszerint 1-3%-a. A poliakrilamid gélek előnyös tulajdonságai, hogy hidrofílek, kémiaiilag közömbösek, stabil vegyületek, az elválasztandó molekulákkal nem lépnek specifikus kölcsönhatásba, nem zavarják a detektálására szolgáló festési reakciókat, valamint kompatibilisek a legtöbb általánosan használt puffer rendszerrel.

A polimerizáció a TEMED (tetrametil-etiléndiamin) és az APS (ammónium-perszulfát) hozzáadásával indukálható. Az APS egy szabad gyököt tartalmaz, mely aktiválja a TEMED-et, ami a továbbiakban aktiválja az akrilamid monomert. Az aktivált és a nem aktivált monomerek reakciója elindítja a polimerizáció folyamatát. A meghosszabbodott polimer lánc pedig keresztbe köt a bisz-akrilamiddal.

A polimerizációs folyamat fizikai-kémiai tulajdonságain túl, az alkotóelemek tisztasága, különösen a poliakrilamidé, meghatározza a gél minőségét. A katalizátor anyagok mennyiségének csökkentése hosszabb polimer láncokat eredményez, ami növeli a gél tisztaságát és növeli annak nyújthatóságát. Az alapanyagokon túl egyéb tényezőknek, mint a reakció hőmérsékletének és az oxigén koncentrációjának is fontos szerepe van az elkészített gél minőségében. A polimerizáció exoterm folyamat, mely során a kezdetben kibocsátott hő gyorsítja a folyamatot. Az alacsony hőmérsékleten (4°C) polimerizált gélek rugalmatlanok lesznek, míg a magas hőmérsékleten (25°C) történő polimerizáció átlátszó, kevésbé porózus, rugalmas gélt eredményez.

A nukleotidok szétválasztásához használt poliakrilamid gélt üveglapok közé öntik. Az üveglapok közötti távolságtól függően különböző vastagságú gél önthető. Az üveglapoknak szennyeződés és nukleáz enzimektől mentesnek kell lennie.

Az agaróz gélhez hasonlóan a poliakrilamid gél koncentrációja meghatározza az elválasztható fragmentek méretét (11.4. ábra).



11.4. ábra: A: DNS agaróz gélektroforézis kétfajta festékanyaggal (fent). B: Eltérő mennyiségű DNS molekulák poliakrilamid gélektroforézise etidium bromid festékkel (lent).

A DNS molekulák függőleges gélektroforézise a genetikai térképezéshez, a fragmentek klónozásához tökéletesen megfelelő. Ha a vizsgálni kívánt nukleonid molekula mérete 1000 bázispár alatti, az elválasztás felbontása szignifikánsan romlik, ami alternatív módszer használatát teszi szükségessé. A poliakrilamid gél 5% akrilammal már meggyőző elválasztási rendszert biztosít 10 bp-ig a fragmentek vizsgálatához.

A poliakrilamid gélek egy bázispárnyi különbségek kimutatására is alkalmasak lehetnek pl. PCR termékek esetében. Az elválasztás specifikussága nem csak a termékek (nukleinsavak) méretétől, illetve a DNS töltésétől függ, hanem azok másodlagos szerkezetétől is, ezért szükséges a konformáció okozta különbözőségek megszüntetése. Ez denaturáló gélen történő elektroforézissel érhető el, ami olyan denaturáló szereket tartalmaz, mint a nátrium hidroxid, a karbamid, metil-higany hidroxid, formaldehid és a nátrium dodecil szulfát (SDS).

A nem denaturáló poliakrilamid géleket natív géleknek is nevezzük, melyben a nukleinsavak elválasztása detergensnek jelenléte nélkül történik. A denaturáló gélekkel ellentétben a natív gélek alacsony, 1-8 V/cm feszültségen futnak.

Detektálás

Az etidium-bromiddal történő DNS festés a legjobb választás, mivel gyors, egyszerű és összehasonlíthatóan érzékeny. A DNS vagy RNS molekulák a poliakrilamid gélen ezüsfestéssel is láthatóvá tehetők. Az ezüsfestés hozzávetőlegesen 2-10 szer érzékenyebb módszer, mint az etidium-bromidos. Különösen a denaturáló gélek esetében ajánlott az ezüsfestés, mert az etidium-bromid festés ezekben a gélekben gyorsan elhalványul.

A gél fixálása során használt oldatok tioszulfát tartalma teszi lehetővé a nukleinsavak festésének fejlesztését és a detektálását nanogrammban tartományban is. A meglehetősen mérgező etidium-bromid kiváltására szolgál a kevésbé káros SYBR® Safe festés, mely egy érzékeny festési módszer a DNS vizualizálására agaróz és poliakrilamid gélben egyaránt.

11.6. A gyakorlat menete

Tisztítsa meg az üveglapokat. Az újabb szennyezések elkerülésére tartsa őket az oldalaknál, vagy viseljen kesztyűt. Ezután egy etanolos mosást is végezzen el az esetleges nukleáz enzimek eltávolítására, majd hagyja az üveglapokat megszáradni. Készítse el a szeparáló gélt a 11. 1. táblázatban szereplő recept alapján.

11.1. táblázat A különböző koncentrációjú PAGE gélek összetétele (végtérfogat 10 ml)

Gel % 30% Akrlamide (29:1) H₂O 5x TBE 10% APS TEMED

	(ml)	(ml)	(ml)	(µl)	(µl)
8 %	3.2	6.4	2.4	200	10
10%	4.0	5.6	2.4	200	10
12%	4.8	4.8	2.4	200	10

Az APS-t és a TEMED-et csak közvetlenül a készülékbe töltés előtt szabad az oldatba bemérni, hiszen ez indítja el a polimerizációt! Ezután öntse az oldatot a két üveglap közé, majd helyezze bele a fésűt. A polimerizáció után helyezze a gélt a vertikális elrendezésű készülékbe, a fésűt óvatosan távolítsa el. Adjon a kinyert DNS mintákhoz mintafelvívő puffert, majd vigyen fel a mintákból 10µl-t a géltre egymás mellé, a sorrendet gondosan feljegyezve. A poliakrilamid gélekben a minták futtatására TBE puffert használjon. A futtatást jeges hűtés mellett végezze! Amíg a minta teljesen be nem vándorol a gélbe, a feszültséget 100V-ra (kb. 10 V/cm), ezután pedig 200V-ra (kb. 20 V/cm e) állítsa!

Amikor a jelzőfesték elérte a gél alját, a készüléket áramtalanítsa, szedje szét, minden alkatrészét gondosan mosogassa el, a gélt pedig helyezze etídium-bromidos oldatban, majd UV fényben analizálja!

- Az akrilamid neurotoxikus és karcinogén hatású. Mindig használjon kesztyűt!

- Akrilamid por kimérésekor elszívófülke, porálarc használandó!

Feladat:

10%-os poliakrilamid gél készítése, majd PCR termékek (100 bp hosszúságú fragmentek) futtatása, festése és értékelése.

12. fejezet - PCR a növényi molekuláris biológiában

szerző: Dr. Tamás László

PCR módszerek alkalmazása búzafajták azonosítására

A gyakorlat célja: búzafajták azonosítása tartalékfehérje géneik alapján PCR alapú markerek alkalmazásával.

Bevezetés

12.1. A PCR módszer

A polimeráz láncreakció során szekvenciaspecifikus oligonukleotidok segítségével megsokszorozzuk a növény genetikai állományának egy jól meghatározott darabját. A reakcióhoz szükséges egy hőstabil polimeráz enzim, valamint puffer, négy különböző dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP), Mg^{2+} , DNS templát és két oligonukleotid. Ez utóbbi két rövid DNS szakasz, azaz primer szükséges a kiegészítő (komplementer) DNS szál szintézisének elindításához. A kiválasztott DNS szakasz nagy mennyiségű – agaróz gélen látható – előállítását biztosítja a ciklusba szervezett három lépés (denaturálás, kapcsolás, lánchosszabbítás) többszöri (25 - 45) ismétlése. A reakció során a DNS mennyisége exponenciálisan nő a 2 hatványai szerint. A reakció hatékonysága azonban nem mindig éri el a 100 %-ot, ami csökkenti a szintetizált DNS mennyiségét az elméletileg várt értékhez képest. Ennek oka lehet az enzimpreparátum minősége (szennyezettség, alacsony féléletidő), a DNS nem megfelelő tisztasága, a reakcióelegy különböző komponenseinek alacsony koncentrációja, esetleges szennyezettsége, továbbá a rosszul megválasztott (magas) ciklusszám is.

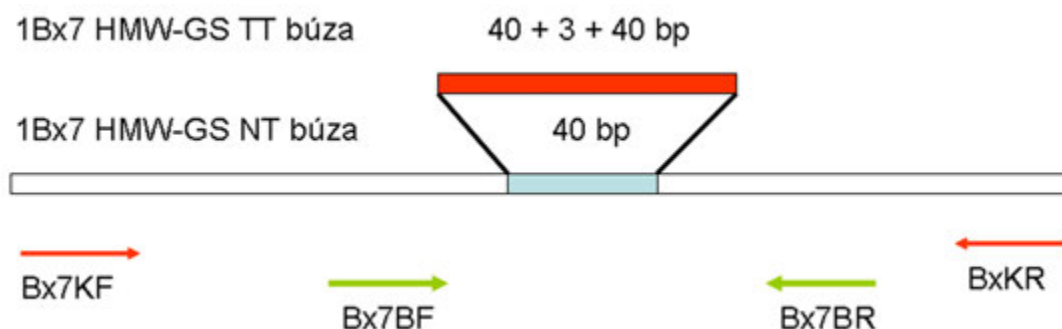
(Búza genomi DNS preparátumban 0,6 fg mennyiségben lévő DNS szakaszból 36 ciklus során, 70%-os hatékonyság mellett 70 ng DNS szintetizálható.)

12.1.1. A gyakorlaton alkalmazott két PCR módszer ismertetése

A PCR reakció többek között alkalmazható analitikai és preparatív célokra is. Az analitikai célok között szerepelhet egy adott szekvencia létének kimutatása a növény genetikai állományában, vagy egyszerű nukleotid mutációk (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), ill. metilációs helyek vizsgálata. Mindkét esetben többféle megközelítés is alkalmazható.

12.1.1.1 Nested PCR

A szekvencia kimutatására a hagyományos módszer mellett alkalmazzák az úgynevezett nested PCR-t, melynek során két egymást követő PCR reakcióban sokszorozzák meg a keresett DNS szakaszt olyan mennyiségben, hogy az agaróz gélen kimutatható legyen. A 'nest' szó magyarul fészket jelent, amit a módszernél úgy lehet értelmezni, hogy a második szintetizálódó DNS molekula az elsőre kapott szakasz belsejében, azaz azon belül található (lásd 12.1. ábra).



12.1. ábra Példa a nested PCR-re. A második PCR reakcióban a Bx7BF és Bx7BR primereknek (zöld nyilak által közrefogott szakasz) az első PCR reakcióban, a BxKF és BxKR (piros nyilak) által felszorzott termékek szolgálják a templát DNS-t.

Az első reakció során előállított, valamivel nagyobb méretű DNS fragment a következő PCR reakcióban – hígítás után – templátként szolgál. Ezt a bonyolult, összetett módszert annak ellenére alkalmazzák, hogy az alap módszerhez képest nagyobb a keresztszennyeződés veszélye, mivel a reakciócsövet ki kell nyitni, a mintákat hígítani kell. A módszer előnye, hogy nagyon kis mennyiségű DNS molekula (alacsony DNS koncentráció) esetén is detektálható mennyiségű DNS-t állíthatunk elő anélkül, hogy túlzottan magas ismétlésszámú reakciót kellene elvégezni. Ilyenkor olyan nagy koncentrációban kellene használni a reakcióelegy egyes komponenseit, hogy valószínűleg csökkenne a reakció specifikussága.

A nested módszer alkalmazásának másik területe, amikor nagyon hasonló szekvenciájú DNS szakaszok közül kell kimutatni egy keresett fragment meglétét a genomban. Egyetlen PCR reakcióban nem tudnánk a kívánt specifikusságot és megbízhatóságot elérni, ezért van szükség a második reakcióra is. Az első lépésben tulajdonképpen szűkítjük a templátként szóba jöhető szakaszok számát, míg a második során teljesen specifikus lehet az amplifikáció. Egyes génekben, ill. promóter, vagy terminátor szekvenciákban meglévő méretbeli különbségek kimutatására is alkalmas a módszer. A szintetizálódott DNS meglétét, vagy hiányát, valamint méretét, annak polimorfizmusát agaróz gélelektroforézist követően, a gél festése után vizsgáljuk, ill. határozzuk meg.

12.1.1.2. Pontmutációk vizsgálata SNP PCR-rel

Az egyszerű, vagy pontmutációk (SNP) kimutatására alkalmas PCR módszer alapja, hogy a specifikus oligonukleotidok egyike (pl. a Forward típusú) optimális reakciókörülmények között nem kapcsolódik a mutáns szekvenciájú DNS-hez. Az oligonukleotid megfelelően választott bázissorrendje lehetővé teszi, hogy csak a 'vad' típusú allélhez kapcsolódjon tökéletesen, hidrogénhid kötések keresztül. A Reverz típusú primer olyan DNS szekvenciát ismer fel, a DNS olyan szakaszához kapcsolódik, amely mind a két allélban teljesen azonos. Az úgynevezett „kiegészítő” szál szintézise, az elmélet szerint, csak stabilan kapcsolódó kettős szálú DNS-en indul el. Ha a primer 3' végi nukleotidja nem tud pontosan kapcsolódni a templát DNS-hez, akkor a polimeráz enzim működése gátolt. A példánkban maradván, a 'mutáns' allélról nem, ellenben a 'vad' allérről szintetizálódik DNS. A PCR során keletkezett terméket általában agaróz gélelektroforézist követő festéssel (pl. etidium bromid) tesszük láthatóvá, UV fényel megvilágítva a gélt.

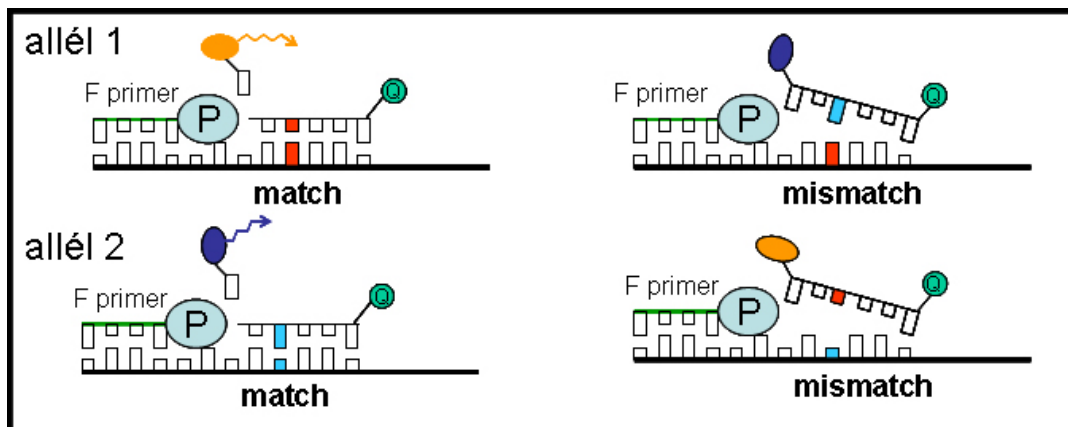
12.1.2. A szintetizált termék vizsgálata

Az elmúlt években a PCR módszertanának (készülék, DNS festék) fejlődése következtében lehetőség nyílt a termék keletkezésének valós idejű követésére is. Ezt nevezzük real-time PCR-nek. Ebben az esetben nincs szükség agaróz gélelektroforézisre és a gél festésre, hanem a keletkezett specifikus termék mennyiségét a fluoreszcencia mérés alapján tudjuk követni. A keletkezett kettős szálú DNS-hez kötődő festék (SYBRGreen) fluoreszcenciája arányos a termék mennyiségével. (Fontos megjegyezni, hogy a real-time PCR módszer alkalmazása SNP kimutatására csak a van-nincs kérdésre keresi a választ és nem mennyiségi kérdésekre.)

Mindkét kimutatási módszer csak akkor alkalmazható, ha a vizsgált minta homozigóta. Ha mindkét allél előfordulhat a növény genetikai állományában, azaz heterozigóta növényről beszélünk, akkor olyan amplifikált termékekre, ill. módszerre van szükség, ahol a 'vad' és 'mutáns' allérről keletkezett DNS fragment elkülöníthető.

TaqMan próba

Az egyik megoldás az úgynevezett TaqMan próba használata. A kétféle szekvenciának megfelelő fluoreszcencia hozam mérésével folyamatosan detektálható a 'vad', a 'mutáns', vagy mindkét allél jelenléte a reakcióelegyben a reakció során. A TaqMan próba egy a PCR reakcióban alkalmazott harmadik oligonukleotid, mely vagy a 'mutáns', vagy a 'vad' allélhoz képes specifikusan kapcsolódni a primerek által közrefogott rövid DNS-szakaszon belül. A kétféle próba két eltérő fluoreszcenciával (fluoreszkáló molekulával) jelölt a próba DNS 5' végén. A polimeráz enzim – miközben szintetizálja az új DNS szálát – a templáthoz kapcsolódó DNS-t képes elbontani, mivel rendelkezik 5' – 3' irányú exonukleáz aktivitással is. Mivel az 5' végi nukleotid ezután már nem kapcsolódik a próbához, és ezért a fluorofor csoportja felszabadul az oligonukleotid 3' végén lévő 'Quencher' molekula gátló hatása alól, így megfelelő hullámhosszon mérhető a fluoreszcenciája (12.2. ábra).



12.2. ábra SNP kimutatása TaqMan próba használatával.

Ha csak a 'vad' allélhoz tud kapcsolódni a próba, akkor csak a 'vad' allélra jellemző fluoreszcenciát, ha a 'mutáns' allélhoz akkor az erre jellemző fluoreszcenciát mérhetjük. Ha mindkét allél jelen van a növényi genomban, akkor mindkét fluoreszcencia megjelenik a PCR reakció ciklusszámának növekedésével. A módszer gyors, megbízható és nagy mintaszámok esetén annak ellenére széles körben elterjedt, hogy drágább a hagyományos kimutatást alkalmazó PCR módszernél.

SYBRGreen alkalmazása

Mindkét termék egymás melletti detektálására alkalmas az úgynevezett Tm shift PCR módszer. Ebben az esetben mind a 'vad', mind a 'mutáns' allélhoz kapcsolódni képes eltérő szekvenciájú oligonukleotid (pl. Forward primer) jelen van a reakcióelegyben, A két Forward típusú primer 5' végi szekvenciájához eltérő hosszúságú, a templáttal nem komplementer plusz szakaszt szintetizáltatunk, így például a 'vad' típusú felismerő primer néhány nukleotiddal hosszabb, mint a 'mutáns' allélt felismerni képes primer. A keletkezett kétféle termék ennek következtében eltérő méretű és olvadáspontú. Ennél a példánál maradva, a 'vad' típusú allélról szintetizálódó termék olvadási hőmérséklete magasabb. Az olvadási hőmérséklet jól vizsgálható a reakció befejezése után SYBRGreen jelenlétében. Az olvadási görbe első deriváltja megadja a szignoid görbe inflexiós pontját, ill. pontjait. A matematikai művelet eredményeként kapott függvény egy, ill. két csúcsa megmutatja a szintetizálódott termék (termékek) olvadáspontját. Homozigóta minta esetén egyetlen csúcsot kapunk a fluoreszcens jel mérése és feldolgozása után, melynek azonosítása a két allélhoz tartozó hőmérsékleti érték alapján történik. Heterozigóta minta esetén a függvény két maximumot mutat.

12.2. A PCR reakció optimalizálása

Az SNP megbízható kimutatásához szükséges a reakció nagyon pontos optimalizálása. Az optimalizálás a reakcióelegy szinte minden komponensére értelmezhető, ami elsősorban a megfelelő koncentráció alkalmazását jelenti. Az alkalmazott templát DNS mennyiségének meghatározásakor azonban gondolni kell a preparátum tisztaságára is.

12.2.1. Templát DNS kinyerése, tisztítása

Különösen magas olaj, keményítő, vagy másodlagos anyagcseretermékeket tartalmazó növényi részekből kinyert DNS esetében fontos a megfelelő tisztaság elérése. A szennyező komponenseket, ha szükséges, extra tisztítási lépések során kell eltávolítani. Nehézséget jelent a sejtek feltárása, pl. elszáradt vagy fás növényi részek esetében. A minta porításához ilyenkor nemcsak dörzsmozsarat, rázógépet vagy kalapácsot használnak, hanem folyékony nitrogént és kvarchomokot is (lásd a DNS kinyerés fejezetet). Több biotechnológiai cég fejlesztett ki speciális célokra szolgáló DNS kinyerő, tisztító kit-eket. Az oldat koncentrációját, tisztaságát spektrofotométerrel mérjük (lásd fejezet). Csak a megfelelő minőségi és mennyiségi paraméterekkel rendelkező DNS preparátum használható PCR analízisre.

A reakcióhoz szükséges templát DNS mennyisége függ a növényi genom méretétől. Arabidopsis DNS-ből kevesebb kell, mint rizs DNS-ből, és ez utóbbiból kevesebb kell, mint búza DNS-ből. A genom méretén túl a kópiaszám is meghatározza a szükséges templát mennyiséget. SNP kimutatásnál egy kópiáról beszélhetünk, s ezért búzából 80-100 ng DNS-re van szükség, míg rizsből 20-40 ng, míg arabidopsis-ből már 5 ng alatti mennyiség is elegendő sikeres PCR reakcióhoz 10-20 µl reakció térfogatban.

12.2.2. Mg ion koncentrációja

Azon túl, hogy a polimeráz enzim megfelelő működéséhez Mg iont igényel, az oligonukleotidok specifikus kötődéséhez is nélkülözhetetlen, azaz biztosítani kell az optimális koncentrációt a reakcióelegyen. Magas koncentráció mellett a primer aspecifikus kapcsolódása esetén is stabilizálódhat a templáttal való kölcsönhatás, és ez hibás lánckezdéshez vezethet. Ennek következtében hamis pozitív eredményt kaphatunk. Alacsony Mg^{2+} koncentráció mellett nem elég stabil a DNS-DNS kölcsönhatás, így nem jön létre stabil kapcsolat, nem tud elindulni a lánchosszabbítás, ami pedig hamis negatív eredményre vezethet. Az $MgCl_2$ vagy $MgSO_4$ optimális koncentrációja a reakcióelegyen 1,5-5 mM között van. Az optimális értéket kísérleti úton kell meghatározni, 0,5 mM-os változtatásokkal, 1,5 mM koncentrációtól elindulva.

12.2.3. Oligonukleotidok koncentrációja

A reakcióhoz használt oligonukleotid törzsolatok koncentrációját 10 mM Trisz/HCl puffer felhasználásával 10 µM értékre szokták beállítani. Ebből az oldatból adnak annyit a reakcióelegyenbe, hogy koncentrációjuk 100 nM és 500 nM között legyen. A magas koncentráció azon túl, hogy aspecifikus lánckezdéshez is vezethet, megnöveli a primer-dimer keletkezésének valószínűségét is, ha nem használunk 'hot-start' polimeráz enzimet. Alacsony koncentráció esetén nem kapunk megfelelő mennyiségű terméket. A szükséges koncentrációt kísérleti úton kell meghatározni itt is, 200 nM koncentrációtól kiindulva.

12.3. Polimeráz enzim tulajdonságai

Nagyon fontos az enzim koncentrációja a reakcióelegyen, valamint annak tulajdonsága is a sikeres, megbízható PCR-hez. Az enzim koncentrációja szintén hatással van a specifikusságra, ezért meg kell határozni az ideális értékét az egyes reakciókhoz, különösen nagy mintaszámon végzett szkrinelés (szekvencia szűrés) esetén. A leggyakrabban alkalmazott koncentráció 0,1 és 1,0 Unit/10 µl érték között van. A polimeráz tulajdonságai (hőstabilitás, ideális reakcióhőmérséklet, pontosság, processzivitás, lánchosszabbítás sebessége) közül az egyik legfontosabb a másolási hűség (angolul proofreading). A különböző eredetű enzimek kisebb vagy nagyobb pontossággal másolják a DNS templát szekvenciáját, attól függően, hogy rendelkeznek-e 3' – 5' irányú exonukleáz aktivitással. Ezen tulajdonság megléte javítja a másolási hűséget, mivel a tévesen beépített nukleotidokat el tudja távolítani az exonukleáz funkcióval is rendelkező polimeráz az újonnan szintetizálódott DNS 3' végéről. A szintetizáló és bontó képesség együttes megléte azt eredményezi, hogy az enzim lánchosszabbítási sebessége csökken, azaz összességében lassabban halad a DNS szál mentén.

Általában fontosnak tartjuk a PCR reakció pontosságát, de pl. analitikai célú PCR munkákban nem szükséges ez a tulajdonság, mivel a keletkezett termék szekvenciája nem érdekes a vizsgálat, az ellenőrzés, a kísérlet értékelésekor. Különösen előnytelen, sőt káros a 3' – 5' exonukleáz aktivitás SNP kimutatására irányuló munkák esetén, mivel az enzim lehasítja a hibás nukleotidot a primer 3' végéről, és ebben az esetben a primer nem tud különbséget tenni a 'vad' és 'mutáns' típusú allél között.

12.4. A reakcióelegy összemérése

Már két DNS minta vizsgálata esetében sem külön-külön állítjuk össze a reakcióelegyet, hanem minden mintához egyszerre egy közös reakcióelegyet, mixet készítünk. A reakció mix nem tartalmazza természetesen a templát DNS-t és az enzimet. A reakció mix mennyiségét úgy kell meghatározni, hogy az eredmény megbízható értékeléséhez szükséges egy pozitív és egy (néhány esetben két) negatív kontroll minta is. A pozitív mintában kapott termék bizonyítja, hogy működött a reakció, hogy minden komponens rendelkezésre állt az enzim működéséhez, és egyben megadja a vizsgált mintákban várt DNS termék méretét is. A negatív kontrollként használt reakcióelegy DNS helyett molekuláris biológiai tisztaságú vizet tartalmaz, s így DNS nem keletkezhet benne. Transzgenikus növények DNS mintáinak vizsgálatakor egy második negatív kontroll mintát is összeállítunk, melyben nem transzgenikus növényből származó DNS van. A kimutatásra alkalmazott oligonukleotidok ezen a templáton nem adhatnak terméket, ill. ha kapunk terméket, annak mérete nem megfelelő. Az egyszerre vizsgált minták értékelése csak akkor megbízható, akkor fogadható el, ha mindkét, ill. mindhárom kontroll minta a vártnak megfelelő eredményt adta.

12.4.1. Primer-dimer keletkezésének elkerülése, 'hot-start'

A PCR reakció eredményeként kapott termék ellenőrzésekor többször megfigyelhető, hogy a termék mennyisége nem megfelelő, ill. aspecifikus termékek is keletkeznek. Ezek között különösen jelentős mennyiségben jelennek meg nagyon rövid méretű, nem specifikus termékek. A nagyon rövid aspecifikus DNS neve primer-dimer, mely az oligonukleotidok egymáshoz kapcsolódása miatt keletkezik. Ennek oka, hogy a primerek a jeges vízfürdőben rövid szakaszok átfedésével is képesek stabil kettős szálú DNS-t kialakítani, s nem csak primerként, de templátként is szolgálnak a reakcióelegyben jelen lévő polimeráznak. Az enzim, ha nagyon lassan is, de képes új szálát szintetizálni, s ezáltal ellenőrizetlen 3' végű oligonukleotidok keletkeznek. Az enzim aktivitása az első denaturációs lépéshez felmelegedő oldatban egyre nagyobb, és ha talál kettős szálú DNS molekulákat, egyre nagyobb sebességgel végzi az új szál szintézisét.

A nem kívánt, hibás, specifikusságot rontó termék keletkezésének megakadályozása érdekében meg kell oldani, hogy a polimeráz csak a denaturációs lépés után tudja az első lánchosszabbítást elvégezni. Egyik lehetséges megoldás, ha az enzim csak azután válik aktívvá, hogy minden kettős szálú DNS denaturálódott. Az ilyen enzimeket 'hot-start' enzimnek nevezzük. A 'hot-start' enzim komplexet alkot egy másik fehérjével, s ezért átmenetileg elveszíti aktivitását. A hőmérséklet emelkedésével a denaturálódott hőlabilis fehérje már nem képes a kölcsönhatást fenntartani, s így az enzim aktív helye szabaddá válik. A kapcsolási hőmérsékleten létrejövő specifikus, kettős szálú DNS 3' végén elindul a lánchosszabbítás, amely maximális sebességgel 72 °C-on folytatódik.

A viszonylag drága 'hot-start' enzim használatán kívül másképp is csökkenthető az aspecifikus termékek keletkezési valószínűsége, ha úgynevezett 'hot-start' módszert alkalmazunk. Ennek kivitelezése kétféle módon lehetséges. Az egyik esetben a nem 'hot-start' enzimet a 95 °C-ra felmelegített reakcióelegybe pipettázzuk. Ennek a megoldásnak a legnagyobb veszélye a minták keresztbe szennyezése, ezért csak kevés minta esetén ajánlott az alkalmazása. A másik megoldás sokkal egyszerűbb, s ezért a szennyezés veszélye is sokkal kisebb. Ilyenkor a reakció mix-hez csak a legvégén adjuk a nem 'hot-start' enzimet, majd gyors összekeverés után azonnal belemérjük a már templát DNS-t is tartalmazó reakciócsőbe, és azt a készülék előre felmelegített (95 °C) reakció blokkjába helyezzük. Nagy mintaszámokkal azonban ebben az esetben sem szabad dolgozni, mert a mix kimerésével túl sok idő telik el, s addigra az utolsó mintákban a korábban leírt folyamatok lejátszódhatnak.

12.5. A PCR hőmérsékleti programja

A PCR hőmérsékleti programjának összeállítása során figyelembe kell venni a keresett DNS-fragment hosszát, a GC tartalom arányát, az oligonukleotidok hosszát, szekvenciáját és az alkalmazott enzim tulajdonságait.

Az első lépés a növényi DNS teljes denaturációja, amikor a kettős szálú DNS egyszálúvá válik. Ezt általában 95-97 °C-on végzik a templát DNS méretének függvényében 1-től 5 percig. Ha a polimeráz enzim egy 'hot-start' enzim, akkor ez a legelső lépés 7-10 perc (az enzimet előállító cég előírása szerint), hogy a hő labilis fehérje partner tökéletesen denaturálódjon. Az ezt követő általában 3 lépéses ciklus első eleme a kapcsolás, amikor a Forward és a Reverz típusú primerek pontosan kapcsolódnak a templát DNS szálhoz. A kapcsolás pontossága, specifikussága

egyértelműen meghatározza a PCR reakció sikerét. A kapcsolási hőmérséklet mindig alacsonyabb, mint az olvadási hőmérséklet. Az olvadási hőmérsékletet elsősorban az oligonukleotid összetétele határozza meg. Pontos értéket megállapítani csak kísérleti úton lehetséges, mert a számolására alkalmas algoritmusok nem tudnak minden körülményt tökéletesen figyelembe venni. Alacsonyabb hőmérséklet választásánál sok aspecifikus termék keletkezik, mely „szennyezi” a kísérlet során keresett, kimutatandó DNS fragmentet, míg magasabb hőmérséklet választásakor nem kapunk terméket. Az optimális kapcsolási hőmérséklet meghatározásához az első PCR reakcióban 5 °C-kal alacsonyabb értéket állítanak be, mint amennyi a számított olvadási hőmérséklet. Az eredménytől függően emelik vagy csökkentik a kapcsolás hőmérsékletét. A kapcsolás idejét a hőmérséklet emelésekor növelni, fordított esetben csökkenteni szokták. A kapcsoláshoz szükséges inkubáció idejét általában 15-20 másodperc között választják, ha 55 °C a kapcsolási hőmérséklet.

A kiegészítő DNS szál szintézise, az elongáció hőmérséklete többnyire 72 °C, de időnként ettől alacsonyabbat is szoktak alkalmazni. Ezt a polimeráz enzim tulajdonságai határozzák meg, amit a gyártó cég megad. A lánchosszabbítás ideje függ az enzim sebességétől és a szintetizálni kívánt termék hosszától. Ha nem említik külön, akkor általában 1000 nukleotid/perc sebességgel számolnak. A rekombináns Taq polimeráz esetében akár 6000 nt/perc is lehet, míg a Pfu polimeráz sebessége csak 1000 nt/2 perc körül van.

A harmadik lépés a PCR ciklusban a denaturáció. A szintézis során megkettőződött DNS-ből újra egyszálú DNS-t kell előállítani. A denaturáció hőmérséklete általában 94-95 °C, s hossza ritkán haladja meg az egy percet, inkább 30 másodperc körül szokott lenni. Nagyméretű PCR termék (> 4 kbp) esetén természetesen egy percnél hosszabb időtartamot kell beállítani.

A fentebb leírt 3 lépésű ciklust többször ismételve érhető el a megfelelő mennyiségű DNS előállítása, felszaporítása. A ciklusok száma igen széles intervallumban változik, de ritkán megy 25 alá és 45 fölé. Az első esetben nem mindig szintetizálódik elegendő mennyiségben a DNS, míg a második esetben a reakcióelegy egyes komponenseinek koncentrációja sebesség meghatározó lehet, így csökken az enzim aktivitása és a polimeráz reakció hatékonysága.

A fentebb leírt lépések, időintervallumok a hagyományos PCR módszerre jellemzők. Ezt követve egy 1 kbp hosszúságú DNS molekula felszaporítása növényi genomból 36 ciklusos PCR keretében kb. 2 órát vesz igénybe. Az utóbbi időben egyre elterjedtebb 'fast PCR' módszer alkalmazásával az idő 35-40 percre rövidíthető. A szükséges feltételek között három jelentős van. *i)* A készülék blokkjának hőmérsékletét gyorsabban kell változtatni, így lerövidül a felmelegítés és a lehűtés időtartama. (Általában kisebb reakciótér fogatot is választanak a gyors hőmérséklet átadáshoz az elegyen.) *ii)* A polimeráz enzim lánchosszabbítási sebessége magas (6000 nt/perc). Érdemes a gyártótól vásárolni PCR mixet, amelyhez csak az oligonukleotidokat és a templátot kell hozzáadni. *iii)* A program szervezése is eltér a hagyományostól. A kezdeti denaturáció magasabb hőmérsékleten rövidebb ideig tart (98 °C, 30 másodperc) a 'hot-start' enzim aktivizálásával együtt, továbbá a 3 lépésű ciklust 2 lépésűvé alakítják úgy, hogy a kapcsolási és lánchosszabbítási lépést összevonják. Ezen kívül csökkentik a kettő együttes idejét is (65 - 72 °C, 20 másodperc). A denaturáció inkubációs ideje nagyon rövid, 1-5 másodperc.

12.6. A búzaliszt és a tészta

12.6.1. A liszt összetétele

A lisztet a búza szemtermésének endospermium szövetéből állítják elő. A malomipari eljárások során többféle lisztet készítenek, melyek kinézete, tulajdonsága attól függ, hogy milyen arányban tartalmazza a fehér endospermium szövetet. A fehér lisztben nem találhatóak meg a búzaszem más komponensei, pl. embrió vagy csíra, magháj, termésháj, míg a teljes kiőrlésű lisztben minden benne van. A fehér liszt összetételét és tulajdonságait az endospermium összetétele határozza meg. Legnagyobb mennyiségben keményítő található benne (~70-75%), kevesebb fehérje (~10-15%) és még kevesebb zsír (~1-2%), valamint ásványi sók és vitaminok nagyon kis mennyiségben. Az endospermiumban található, többnyire fehérje testecskében felhalmozódott fehérjéket tartalékfehérjéknek nevezzük. Az oldhatóság alapján négy csoportba sorolható fehérjék közül kettő van jelen nagy mennyiségben az endospermiumban: a 70%-os etanolban, ill. 50%-os propanolban oldódó fehérjék, valamint a híg savakban, ill. lúgokban oldódók. Ezt a két fehérje csoportot együttesen prolaminoknak nevezzük.

A prolamin fehérjéknek enzimatisuk aktivitásuk nincs. Az endospermiumban valószínűleg egyetlen feladatot látnak el: biztosítják a csírázás és a csíranövény kezdeti növekedésének tápanyagellátását. Lebomlásuk során keletkező

aminosavak új fehérjék szintézisét teszik lehetővé amíg nincs aminosav szintézis, továbbá a különböző szintetikus folyamatokhoz szénvázat biztosítanak.

12.6.1.1. A liszt tulajdonságai

A liszt tulajdonságát a sütőipari minőségén keresztül értelmezzük, mivel jelentős részben pékárut sütnek belőle. A jó sütőipari minőségű lisztet úgy definiálják, hogy belőle jó minőségű, azaz magas –jellemzően nagy térfogatú, egyenletes bélszerkezetű kenyeret lehet sütni. Jó minőségű kenyeret lehet sütni abból a lisztből, víz hozzáadása után dagasztással készíthető tésztából, melynek nagy a rugalmassága és jó a nyújthatósága. Ezen két tulajdonság aránya határozza meg a tészta minőségét, vagy reológiai tulajdonságát. Bármelyik irányba mozdul el az arány, az a kenyértészta minőségének romlását eredményezi. A kenyérsütéshez szükséges megfelelő arány csak a búzalisztből készített tésztára jellemző. Sem a rozs, sem az árpa vagy kukorica lisztjéből nem készíthető a Magyarországon kenyérnek ismert hagyományos termék, mivel a tészta szerkezete nem teszi lehetővé, hogy a kelesztés során keletkező CO₂-ot a tészta visszatartsa, térfogata megnövekedjen, és a sütés során megtartsa formáját. Az utóbbi időben sok helyen kapható hasáb, vagy téglalakú „kenyereket” tepsiben kelesztik (ha egyáltalán kelesztik), és sütik meg.

A liszt tulajdonságát nem csak kenyérsütési szempontból lehet, illetve kell jellemezni. Vannak olyan termékek, ahol a nyújthatóság fontosabb a rugalmasságnál, pl. rétesek, kekszek. Ebben az esetben előnyösebb, ha a nyújthatóság erősebb, míg a rugalmasság gyengébb értékkel jellemezhető.

Amikor a liszt minőségi tulajdonságairól beszélünk, mindig meg kell határozni milyen szempontok alapján értékeljük, azaz mi készül a lisztből, ill. tésztából. A vásárló más és más tulajdonságokat vár el a végterméktől függően, amit a pék igyekszik kielégíteni, hogy a termékét el tudja adni. Az ehhez szükséges lisztet a molnártól vásárolja, aki azt, a megfelelő lisztet biztosítani képes búzafajta őrlésével állítja elő, vagy különböző lisztből keveri össze. A megfelelő búzafajtát a mezőgazdasági termelő állítja elő nagy mennyiségben, aki a vetőmagot a nemesítőtől vásárolja. A nemesítő feladata olyan vetőmagot biztosítani, amire vevő a piac.

12.6.1.2. A tészta tulajdonságait meghatározó komponensek

A liszt, ill. a belőle készült tészta tulajdonságait meghatározó komponensek hatásáról az elmúlt évtizedek munkájának eredményeként nagyon sokat tudunk, s ez felhasználható a nemesítésben. A nemesítő munkáját egyre szélesebb körben tudja támogatni a molekuláris biológus a liszt fehérje, ill. más összetevőinek szerkezet-funkció vizsgálatával, vagy például az egyes tulajdonságokkal kapcsolható markerek kifejlesztésén és alkalmazásán keresztül. Ezek alkalmazásával célzottabb és gyorsabb lehet a szelekció, rövidíthető a nemesítés folyamata.

Ahhoz, hogy megértsük a markerek használatának lehetőségeit a nemesítésben és az egyes, a gyakorlaton használt PCR markerek kapcsoltságát a különböző tulajdonságokkal, szükséges egy rövid ismertető a tészta szerkezetéről és a kialakításában résztvevő egyes fehérjekomponensek tulajdonságairól.

A siker fogalma és tulajdonságai

Sikérnek nevezzük a búza lisztjéből víz hozzáadásával, dagasztással keletkező tészta fehérjehálózatát, melyet tisztán is előállíthatunk, ha a keményítőt és más nem prolamin fehérjéket mosással eltávolítjuk. Dagasztás során a hidratálódó fehérjék nagyon bonyolult hálózatot hoznak létre, mely biztosítja a tészta különleges viskoelasztikus tulajdonságát, a rugalmasságát és nyújthatóságát. E két sajátosság teszi lehetővé, hogy a búza lisztjéből kenyeret, és sok más lisztipari terméket készíthessünk. A sikerben lévő fehérjéket a szerkezet kialakításában játszott szerepük szerint két csoportba sorolhatjuk. Az egyikbe a polimerizálódásra képes molekulák (gluteninek) tartoznak, melyek diszulfid hidakon keresztül hozzák létre az óriás méretű polimereket. A másik csoport a monomer molekulák (gliadinok) csoportja, melyek másodlagos kötésekkel kapcsolódnak a fehérje hálózathoz, így befolyásolják annak tulajdonságait. A két fehérjefrakció funkcionális tulajdonságai eltérőek. A gluteninek a tészta rugalmasságát és elasztikusságát, a gliadinok a plasztikusságát és nyújthatóságát befolyásolják. A prolamin fehérjék mindkét csoportjának megvan a funkciója a kívánt reológiai tulajdonságokkal rendelkező tészta (siker, makropolimer) kialakításában. Egy adott felhasználásra (kenyér, száraztészta, piskóta, rétes, keksz, stb.) alkalmas tésztában a két tulajdonság, ill. az azt meghatározó fehérjekomponensek aránya a meghatározó. Kenyér esetében például inkább a rugalmasság a domináns a nyújthatóság felett, de ha nem megfelelő a nyújthatóság, akkor nem képes a tészta térfogata növekedni kelesztés során, azaz a rugalmasság önmagában nem elegendő a jó kenyértésztahoz. Keksz esetében a jó nyújthatóság az elsődleges követelmény.

Búza prolamin fehérjék

Csak a búzalisztben vannak olyan fehérjék, melyek diszulfid hidakon keresztül megfelelő méretű és erősségű fehérjemátrixot, azaz sikért tudnak kialakítani. A búza prolaminjai közül a legfontosabb szerepe ebben a nagy molekulatömegű glutenin alegységfehérjéknek (HMW-GS High Molecular Weight Glutenin Subunit) van. A nemesítés során ez az egyik legfontosabb jellemző, amit vizsgálnak, ill. követnek a nemesítési vonalak jellemzésekor, ha a jó sütőipari minőség a cél. A gyakorlat feladatainak megértéséhez ezért a fehérjék ezen csoportjának tulajdonságait részletesebben ismertetjük.

HMW glutenin alegységfehérjék

A HMW-GS fehérjék híg savakban és lúgban oldódnak, de redukálószeres [pl. DTT (ditiotreitól), vagy β -merkaptóetanol] kezelés után 70%-os etanolban vagy 50%-os propanolban is. Ez azt jelzi, hogy a molekulák diszulfid hidakkal összekötött hosszú molekulák, polimerek kialakítására képesek, melyek csak méretük miatt nem oldódnak alkoholban. A makropolimerben a fehérjealegységek fej-láb (N-terminális C-terminális) formában kapcsolódnak egymáshoz. A makropolimer mérete, tulajdonsága jelentős mértékben meghatározza a tészta (siker) reológiai tulajdonságait, sütőipari minőségét.

A prolamin fehérjék szerkezetére, így a HMW-GS fehérjére is jellemző, hogy a molekula közepén található egy ismétlődő aminosav szekvenciákból felépülő, repetitív régióknak nevezett szakasz, melynek másodlagos szerkezetére a β -sheet és β -turn a jellemző. Ezt a szerkezetet úgy képzelhetjük el, mint egy rugót. A HMW-GS fehérjék esetében ez a szakasz viszonylag hosszú, s ennek következtében a molekulák jelentős rugalmassággal rendelkeznek. Minél hosszabb a molekula annál nagyobb a rugalmassága. Ilyen tulajdonsággal rendelkező fehérje csak kevés van az élővilágban.

A HMW fehérjék génjei a hexaploid búza mindhárom genomjában, annak 1-es kromoszómáján található. Mindhárom lókuszt egy-egy eltérő méretű fehérjét kódoló gént tartalmaz. A hosszabbat x-típusúnak, a rövidebbet y-típusúnak nevezik. Az egyes búzafajtákban az adott lókusztban szekvenciájukban kissé eltérő alléleket találunk. Ez a kismértékű eltérés alkalmas korlátozott, fehérje szintű fajtaazonosításra. A fehérjék SDS poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel történő elválasztása esetén a hexaploid kenyérbúza (*Triticum aestivum*) fajtákban 3, 4, vagy 5 HMW glutenin alegységfehérjét tudunk elkülöníteni. A Dx, Dy és Bx jelű alegységfehérjék mindig jelen vannak az egyes fajtákban, míg az Ay alegységfehérje nem található az endospermiumban. A tetraploid (pl. *Triticum durum*) búzában 1, 2, vagy 3 HMW glutenin alegységfehérje expresszálódik.

Az elektroforézis során mutatott mozgékonyaságuk alapján megkülönböztethető HMW glutenin fehérjékhez számokat rendeltek, és ez alapján alakult ki a nevezéktan. A fehérjéket kezdetben az SDS poliakrilamid gélelektroforézis során mutatott mobilitásuk alapján számozták, így a legkisebb mobilitású az Ax1, míg a legmozgékonyabb fehérje a Dy12 HMW-GS. A később megismert fehérjék számozásánál el kellett térni a rendszertől, így pl. nem a Bx20 jelű fehérje mozog a leggyorsabban SDS-PAGE-en.

12.7. A gyakorlaton vizsgált nukleinsav szekvenciák kapcsolata a liszt tulajdonságaival

12.7.1. A D genom alegységfehérjéi

A legismertebb allélpár az 1Dx2-1Dy12 és az 1Dx5-1Dy10, melyek minőségre gyakorolt hatását részletesen tanulmányozták először keresztezési kísérletekben (*in vivo*), később pedig molekuláris biológiai módszerekkel (*in vitro*) is. A tisztított natív és heterológ rendszerekben termeltetett fehérjékkel, valamint transzgenikus búza növényekből kinyert lisztokkal végzett kísérletek megerősítették a korábbi következtetéseket és eredményeket. A molekuláris biológiai módszerek bevezetésén túl jelentős hatással volt e terület fejlődésére a szerkezet-funkció vizsgálatokat megkönnyítő kis mintamennyiséget (2-4 g liszt) igénylő módszerek kidolgozása és elterjedése. A 2+12 fehérjét tartalmazó búzafajtákból általában gyengébb minőségi paraméterekkel rendelkező tészta készíthető, mint az 5+10 fehérjéket tartalmazókból. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy míg az Dx2 HMW glutenin fehérjében csak 3 cisztein aminosav található az N-terminálison, amiből az egyik alkalmas molekulák közötti diszulfid híd létrehozására, addig az Dx5 HMW fehérjében van egy további SH csoport is, ami a polimer fehérjelánc

elágazódásához vezethet. A negyedik cisztein aminosav valószínűleg egy pontmutáció során keletkezett a Dx2 HMW glutenin fehérje génjéből.

A pontmutáció alapján tervezhető olyan primer, amely megfelelően választott kapcsolási hőmérséklet mellett PCR reakcióban meg tudja különböztetni az 1Dx2 és az 1Dx5 HMW-GS alléleket egymástól (12.3. ábra). Ez az SNP marker segít a hagyományos nemesítésben az utódnemzedékek szelekciójában.



12.3. ábra A búza D genomján kódolt két alegységfehérje génje közötti pont mutáció (SNP) megkülönböztetésére tervezett primer.

A különböző minőségi osztályba tartozó búza sütőipari tulajdonságait az egyes HMW glutenin alegységfehérjék jelenléte és relatív mennyisége egyaránt befolyásolja. A Bánkúti 1201 tájfajta, bár az 1Dx2-1Dy12 allélpárt tartalmazza, egyes törzseinek lisztjéből mégis kiváló reológiai tulajdonságú tésztát lehet gyúrni. Ennek egyik oka nagy valószínűséggel, hogy a D genomon kódolt HMW glutenin alegységfehérjék mellett más HMW-GS fehérjéknek is erős hatásuk lehet a tészta minőségére, még ha kisebb mértékben is.

12.7.2. A Bx7 HMW-GS fehérje

SDS-PAGE módszerrel vizsgálva az egyes búzafajták tartalékfehérje-mintázatát és mennyiségét megállapítható, hogy a Bx7 HMW-GS fehérje mennyiségében eltérések vannak. Funkcionális vizsgálatokkal bizonyították, hogy a Bx7 HMW alegységfehérje mennyiségének növekedése a tészta erősségének, rugalmasságának növekedését vonja maga után. Ez, mint előnyös tulajdonság, fontos a hagyományos nemesítésben, a jó sütőipari minőségű lisztet adó fajták előállításában, s ezért igény volt szelekciós marker kifejlesztésére. Kimutatták, hogy a Bx7 HMW-GS fehérjét nagy mennyiségben termelő búzafajtákban a gén promóter régiójában egy 43 bp hosszú inszerció található. Az erre létrehozott kodomináns marker megkülönbözteti az átlagos mennyiségű fehérjét termelő fajtákat (rövidebb méretű PCR termék) az úgynevezett túltermelő fajtáktól (hosszabb méretű PCR termék).

Transzgenikus búza

Az elmúlt években több genetikailag módosított búzafajtát hoztak létre, különböző tudományos gondolatok, ötletek bizonyítására. Tanulmányozták, vajon a GM búza megváltozott tulajdonságai megfelelnek-e az elméleti megfontolások alapján várt eredményeknek, valamint hogy az *in vitro* kísérletekben kapott eredményekből lehet-e egyértelmű következtetéseket levonni a növényben várható, megváltozott tulajdonságokkal kapcsolatban. Vizsgálták többek között, hogy hogyan lehet módosítani a szemtermés egyes tulajdonságait, például a szemkeménységet, az endospermium keményítő összetételét (amilóz-amilopektin arány), vagy a lisztből készült tészta reológiai tulajdonságait.

Az utóbbi tulajdonság módosításakor a keletkező fehérje hatásának vizsgálatához olyan búzafajtából indultak ki az egyik kutatási program keretében, amelyik nem termel, nem expresszál sem Dx, sem Dy típusú HMW glutenin alegységfehérjét. A búza genetikai állományába egy Cheyenne búzafajta eredetű, a Dx5 HMW-GS fehérjét kódoló gént juttattak. A DNS fragment tartalmazta a megfelelő méretű promóter és terminátor régiót is. A transzformálás során a pAHC25 plazmidot használták ko-transzformációban, ami szelekciós markergént (pat gén, foszfinotricin acetyl-transzferáz) és riporter gént (uidA, β-glükuronidáz/GUS) is tartalmaz. Az *E. coli* uidA gén transzkripcióját egy un. konstitutív (nem szövetspecifikus és folyamatosan működő) promóter, a foszfinotricin acetyl-transzferáz génjét a kukorica Ubi-1 gén promótere irányítja. A GUS enzimet kódoló szekvencia mögött az *Agrobacterium tumefaciens* nopalín szintáz (nos) gén terminátora található. A GM növényben a termelt GUS fehérje hisztokémiai festéssel kimutatható.

12.8. Gyakorlat

12.8.1. Genomi DNS kinyerése a 12.1. táblázatban megadott négy búzafajta leveléből

Határozza meg a DNS preparátum koncentrációját és tisztaságát a 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia értékek segítségével (lásd a DNS kinyerés növényekből fejezetet)!

12.1. táblázat A gyakorlat során vizsgálandó búzafajták HMW-GS összetétele

Fajta	Ax	Bx	By	Dx	Dy	pAHC25 plazmid
Bánkúti 1201 TT	2*B	7 ^{TT}	8	2	12	-
Chinese Spring	-	7 ^{NT}	8	2	12	-
Glenlea	2*	7 ^{TT}	8	5	10	-
GM búza	-	17	18	5	-	+

Hígítással készítsen 100 ng/μl koncentrációjú DNS oldatot mind a négy DNS mintából!

12.8.2. DNS minták ellenőrzése

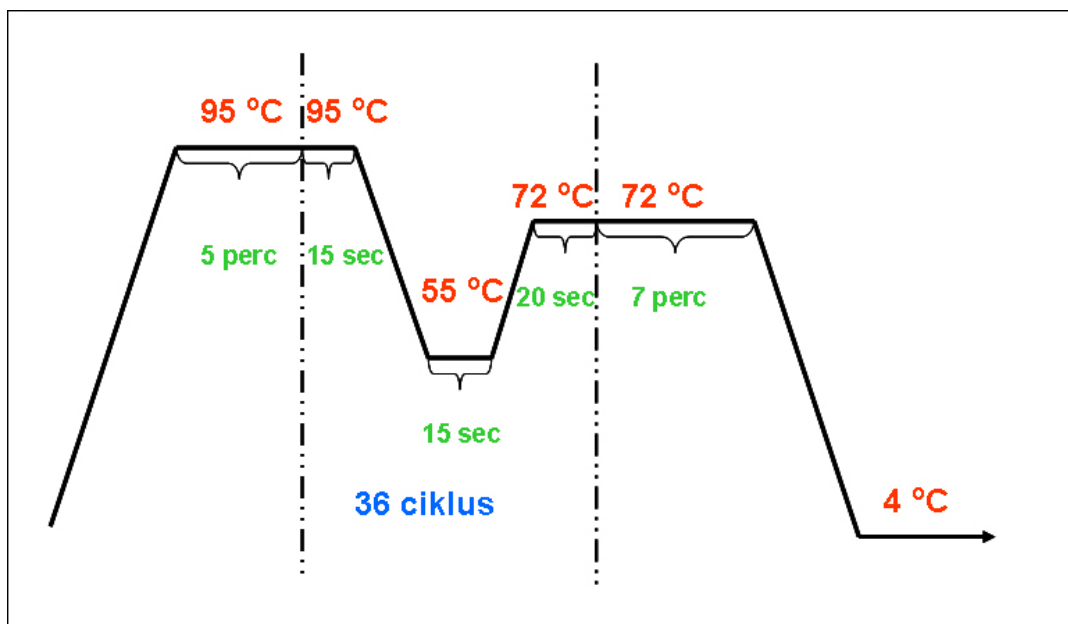
Meg kell győződni arról, hogy a tisztított DNS alkalmas-e PCR alapú vizsgálatra. Olyan primerpárt és olyan PCR programot kell használni, amikor a reakció eredményeként biztosan kapunk terméket. Erre alkalmas a Dx51 és a Dx52 jelű primerpár, mely az 1Dx HMW-GS allél jelenlétének kimutatására alkalmas 55 °C-on. Mind a négy mintában megtalálható vagy a Dx2, vagy a Dx5 HMW-GS fehérjét kódoló gén, és alacsony kapcsolási hőmérsékleten a Reverz típusú primer (Dx52) mindkét génhez képes kapcsolódni, és a lánchosszabbítás elindul. Ha a PCR reakció eredményeként valamelyik DNS mintában nem kapunk terméket, akkor lehetséges, hogy az a DNS minta nem megfelelő tisztaságú PCR vizsgálatokhoz. Ha szükséges, a reakciót kétszer, háromszor meg kell ismételni, vagy ha ez sem vezet eredményre, új DNS mintát kell preparálni.

A reakcióelegy összetételét a 12.2. táblázat tartalmazza.

12.2. táblázat A Dx allél kimutatására szolgáló reakcióelegy összetétele

Komponensek		Térfogat
DNS templát	100ng/μl	1 μl
Puffer	10x	1 μl
Taq polimeráz	1U/μl	0,5 μl
dNTP	2 mM	1 μl
Forward primer Dx51	10 μM	0,5 μl
Reverz primer Dx52	10 μM	0,5 μl
MgCl ₂	25 mM	0,6 μl
Steril desztvíz, mol biol grade		
Összesen		10 μl

A PCR program a 12.4. ábrán látható.



12.4. ábra A Dx allél kimutatására szolgáló PCR reakció programja.

A reakció során keletkezett terméket, annak mennyiségét és méretét 1%-os agaróz gélen végzett elektroforézissel ellenőrizzük (lásd a Nukleinsavak elválasztásának módszere fejezetet). Egyetlen, 450 bp hosszú terméket várunk.

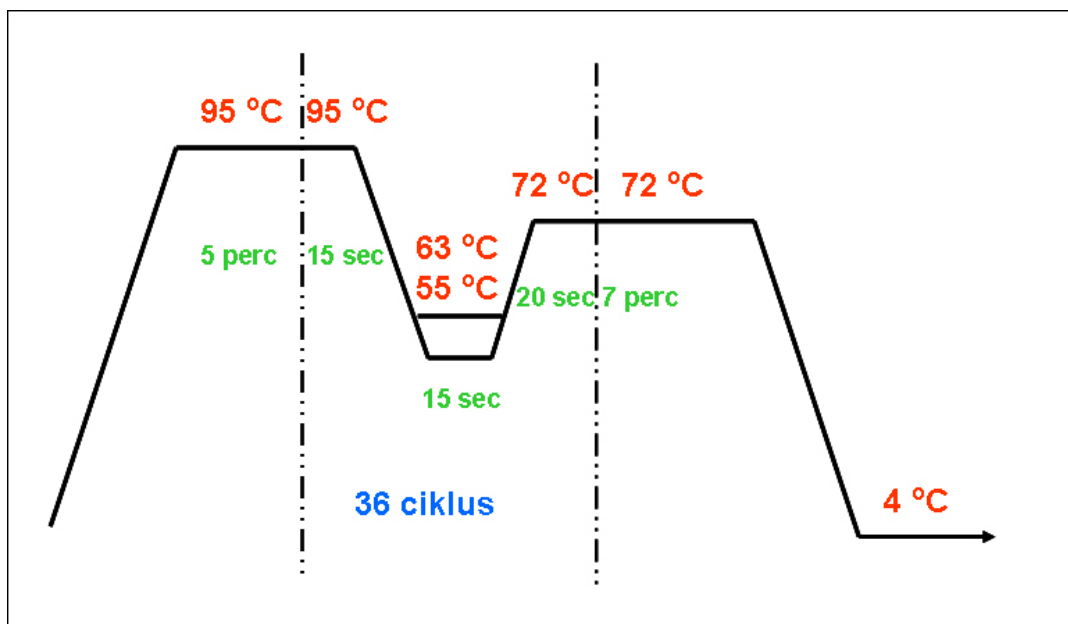
12.8.3. Határozza meg gradiens PCR program alkalmazásával, hogy mely DNS mintában van az 1Dx2, illetve az 1Dx5 HMW-GS allél!

Ha ellenőriztük és bizonyítottuk, hogy a DNS mintánk alkalmas további PCR alapú vizsgálatokra, akkor állítsunk össze két párhuzamos mintasort a 12.2. táblázatban megadottak szerint. Az elkészült reakció mixet kettéosztjuk (10 μ l + 10 μ l). Az egyik mintasorozatot az alacsony, míg a másikat a magas kapcsolási hőmérsékletű sorba (oszlopba) helyezük, és végezzük el a PCR reakciót az 5. ábrán látható program segítségével.

A PCR készülékek egy csoportja (Gradiens PCR készülék) úgy programozható, hogy a mintatartó blokk minden egyes sora vagy oszlopa különböző hőmérsékletű lehet. A felhasználó által megadott hőmérsékleti intervallumot a készülék szoftvere osztja be 8 (sor) vagy 12 (oszlop) emelkedő értékre. A felhasználó a monitoron megjelenő értékek között választhat, hogy hova helyezze a mintákat tartalmazó reakciócsöveket.

A reakció után az egyes mintákat agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük. Alacsony (55 °C) kapcsolási hőmérséklet mellett minden mintában kell terméket kapni, míg magas (63 °C) kapcsolási hőmérséklet mellett csak az 1Dx5 HMW-GS allél génjét tartalmazó reakcióelegyben (2 minta) kaphatunk terméket.

A PCR program az 12.5. ábrán látható.



12.5. ábra Gradiens PCR reakció programja.

12.8.4. Határozza meg nested PCR módszerrel, hogy mely DNS mintában van a normál, illetve a nagy mennyiségben termelődő Bx7 HMW-GS fehérje génje!

Az NT és TT 1Bx7-HMW-GS gént tartalmazó búzafajták megkülönböztethetők a promóter szekvenciában lévő méretbeli különbség alapján. A marker kifejlesztésekor nehézséget jelent, hogy a homeológ kromoszómákon kódolt HMW glutenin alegységfehérje gének promóter szekvenciái nagyon hasonlóak. Ilyen esetben egy rövid inszerció, delécio, vagy duplikáció kimutatására szolgáló specifikus primerpár tervezése nagy körültekintést igényel. Egyik megoldás lehet a nested PCR módszer alkalmazása, amikor az első PCR reakcióban a specifikus DNS szakasz koncentrációját erőteljesen megnöveljük, majd ezen belül mutatjuk ki, detektáljuk a méretbeli eltérést. Az első lépésben az úgynevezett külső primerpár segítségével megsokszorozzuk az 1Bx7 HMW-GS gén promóter mennyiségét a többi HMW gén promóterével szemben, majd a második lépésben ebben a mintában határozzuk meg a jellemző szakasz méretét a belső primerpár használatával.

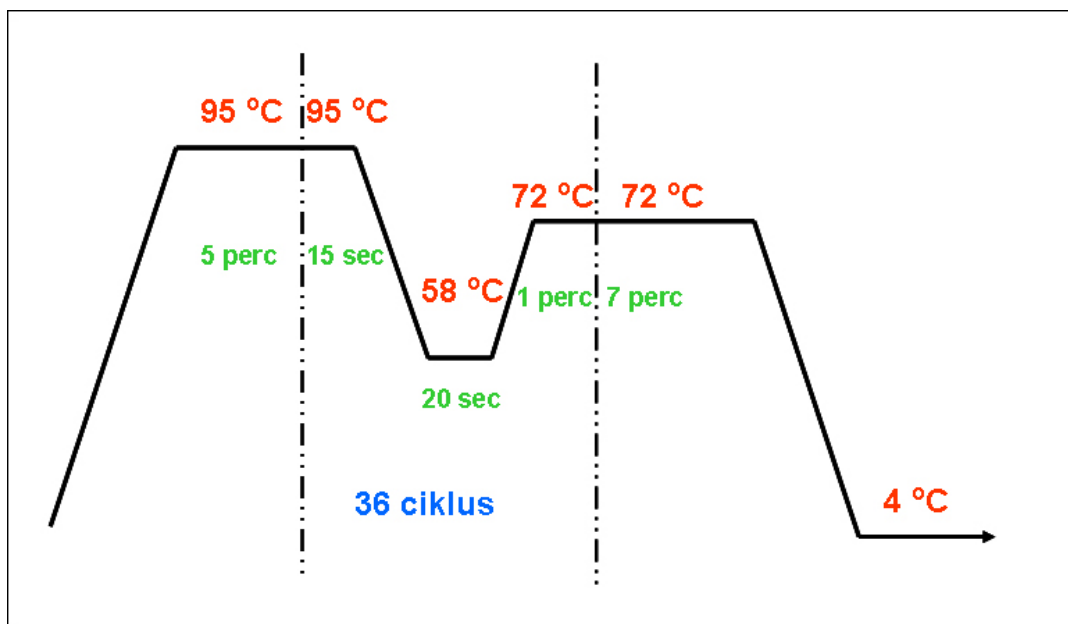
Az első reakcióhoz az elegy összetételét a 12.3. táblázat mutatja.

12.3. táblázat Bx promóter vizsgálata nested PCR-rel. Az első (külső primerpár) reakció összetétele

Komponensek		Térfogat
DNS templát	100ng/μl	0,5 μl
Puffer	10x	1 μl
Taq polimeráz	1U/μl	0,5 μl
dNTP	2 mM	4 μl
Forward primer Bx7KF	10 μM	0,5 μl
Reverz primer Bx7KR	10 μM	0,5 μl
MgCl ₂	25 mM	0,6 μl
Steril desztvíz, mol biol grade		
Összesen		10 μl

12.6. ábra A búza 1Bx7 HMW-GS gén promóterének vizsgálatára használt nested PCR első, a külső primerpárra alkalmazott programja.

A PCR program a 12.6. ábrán látható.



A reakció során felszaporított DNS szakasz mérete kb. 1200 bp, melyet 1%-os gélben, agaróz gélelektroforézissel ellenőrizhetünk. (Előfordulhat, hogy nem látunk a gélen terméket, de ilyenkor is érdemes elvégezni a második reakciót.) Ha az agaróz gélen festés után több, eltérő méretű terméket kapunk az azt jelenti, hogy a PCR reakció nem volt specifikus. Ilyenkor jobb, ha megismételjük a reakciót, bár ebben az esetben is eredményes lehet a második PCR reakció, azaz meg tudjuk különböztetni az eltérő promóter szakaszt tartalmazó fajtákat egymástól. A külső primerpárral végzett PCR reakcióelegyből a második (belső primerpárral végzett) reakcióhoz 100x hígítást készítünk, és ezt használjuk templátként. Különös figyelmet fordítsunk arra, hogy elkerüljük a minták keresztbe szennyezését.

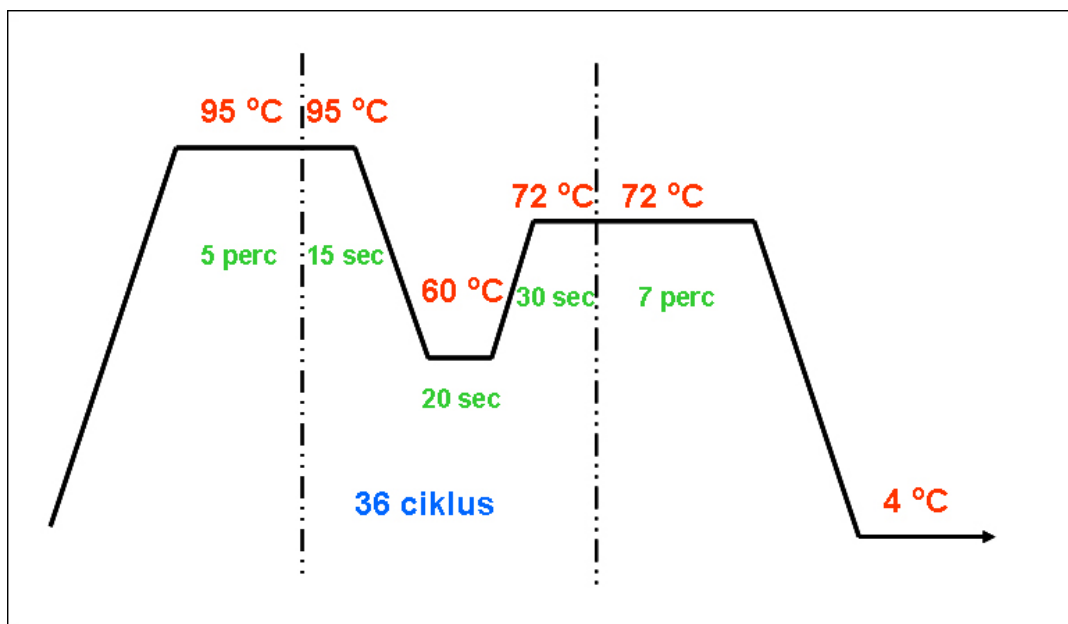
A második reakcióhoz az elegy összetételét a 12.4. táblázat mutatja.

12.4. táblázat Bx promóter vizsgálata nested PCR-rel. A második (belső primerpár) reakció összetétele

Komponensek	Térfogat
DNS templát	0,5 µl
Puffer 10x	1 µl
Taq polimeráz 1U/µl	0,5 µl
dNTP 2 mM	4 µl
Forward primer Bx7BF 10 µM	0,5 µl
Reverz primer Bx7BR 10 µM	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	0,6 µl
Steril desztvíz, mol biol grade	
Összesen	10 µl

12.7. ábra A búza 1Bx7 HMW-GS gén promóterének vizsgálatára használt nested PCR második, a belső primerpárra alkalmazott programja.

A PCR program a 12.7. ábrán látható.



A Bx7 HMW-GS fehérjét túltermelő (TT) búzafajtáknál egy 427 bp, a normál termelőknél (NT) egy 384 bp hosszú terméket kapunk. A két fragmentet meg tudjuk különböztetni 1,5% agaróz gélen végzett elektroforézis után.

12.8.5. Határozza meg mely minta tartalmazza a GM búzára jellemző uidA gént!

A transzgenikus búza genetikai állományában jelen van a pAHC25 plazmid által kódolt információ is. Ebben a plazmidban található gének terméke vagy szelekciós előnyt jelent a transzgenikus búza vonalaknak foszfinotricin kezelés esetén, vagy felhasználható a transzkripció és a transláció gyors ellenőrzésére. A termelő GUS enzim hisztokémiai festéssel már a fejlődés korai stádiumában egyszerűen kimutatható a regenerált növény leveleiben, míg a tartalékfehérje csak a szemtermésben expresszálódik.

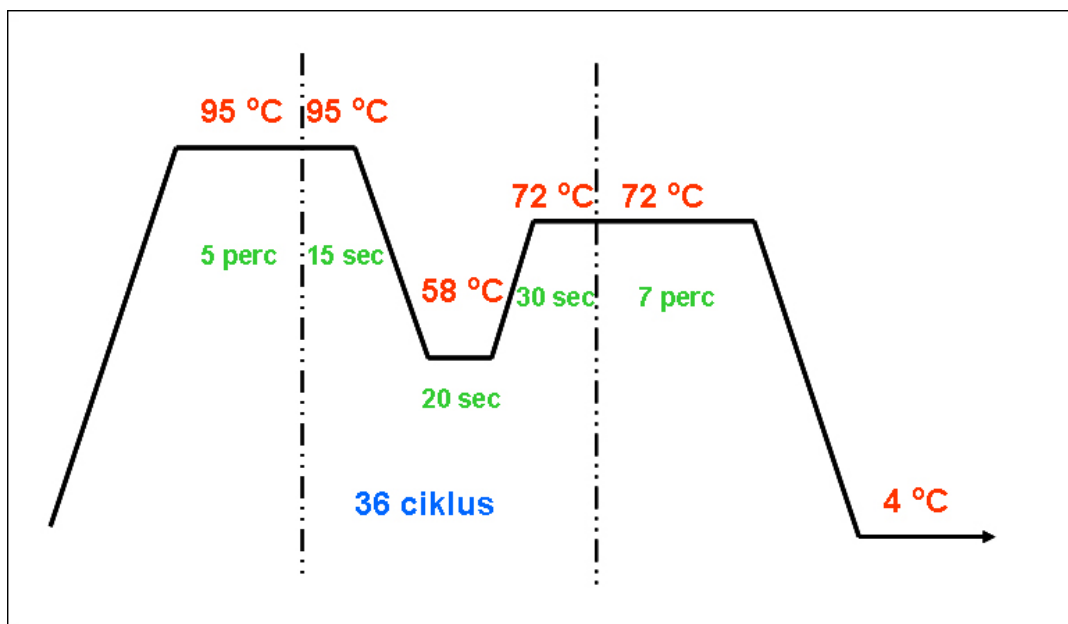
A riporter gén kimutatására olyan primerpárt használunk, melyből a Forward típusú primer az *uidA* gén 3' végéhez közel kapcsolódik, míg a Reverz típusú gén a NOS terminátorhoz.

A reakcióelegy összetétele a 12.5. táblázatban látható

12.5. táblázat Az *uidA* riporter gén kimutatására szolgáló reakcióelegy összetétele

Komponensek		Térfogat
DNS templát	100ng/μl	0,5 μl
Puffer	10x	1 μl
Taq polimeráz	1U/μl	0,5 μl
dNTP	2 mM	4 μl
Forward primer GUS1765F	10 μM	0,5 μl
Reverz primer NOSR	10 μM	0,5 μl
MgCl ₂	25 mM	0,6 μl
Steril desztvíz, mol biol grade		
Összesen		10 μl

A PCR program a 12.8. ábrán látható.



12.8. ábra Az *uidA* riporter gén kimutatására szolgáló PCR reakció programja

A domináns marker a transzgénikus minta esetében egy 400 bp hosszú terméket ad, míg a nem GM búza mintából származó DNS esetében nincs termék.

Feladat

A kapott eredmények alapján határozza meg, hogy az egyes levélminták milyen búzából származnak a 12.1. táblázat segítségével! Ha szükséges, végezzen ellenőrző PCR vizsgálatokat is!

13. fejezet - Kvantitatív Real-Time PCR

szerző: Tóth Gábor

A Kvantitatív Real-Time PCR (Q-PCR) olyan PCR alapú módszer, mely lehetővé teszi a PCR ciklusok során keletkező termék valós idejű detekcióját és mennyiségi mérését. A módszer széleskörűen alkalmazható génexpresszió analízisre, genetikailag módosított organizmusok (GMO) kimutatására, SNP genotipizálásra, allél diszkriminációra, vírus terhelés mérésére.

13.1. Elméleti áttekintés

13.1.1. PCR kinetika és fluoreszcens detekció

A PCR ciklusok során a reakcióelegyben lévő vizsgálni kívánt **templát DNS**-hez (mely lehet genomi DNS, vagy cDNS) szekvensspecifikus oligonukleotidok kapcsolódnak, és az általuk közrefogott **templát szekvencia (Target)** felszaporodik. A megsokszorozódott templát szekvencia az **amplikon**. A vizsgálat céljától függően az amplikon lehet az érdekes gén egy szakasza - az angol szakkifejezésnek megfelelően - **Gene Of Interest = GOI**, vagy a **Referencia gén (Reference)** egy szakasza (lásd: Normalizáció).

Az amplikon optimális esetben minden ciklus során megkétszereződik, így a templátról keletkező DNS koncentrációjának növekedése exponenciális. A mérés fluoreszcencia detektáláson alapul. A reakció kezdeti ciklusaiban (1-10) az amplikon mennyisége a reakcióban eredetileg jelenlevő templát DNS-hez képest nem számottevő, így az exponenciális DNS koncentrációnövekedésnek megfelelő fluoreszcens jel erősödése a detekciós határ alatt van. Amikor az amplikon mennyisége meghaladja a templát DNS mennyiségét a reakció detektálhatóan az exponenciális szakaszba lép, amely a 10-30. ciklus közé eső intervallumra korlátozódik. A reakció késői ciklusaiban (ált. 30-40) előbb az elérhető szabad enzim és az amplikonok újraegyesülése válik limitáló tényezővé, majd a reakciókomponensek (primer, dNTP) kimerülésével a reakció platófázisba kerül.

Hagyományos detektálás során a PCR terméket a reakció platófázisában – agaróz gélelektroforézist követően – etídium-bromiddal jelöljük, amikor annak mennyisége már nincs összefüggésben a kezdeti templát mennyiséggel. Ennek megfelelően azt meg tudjuk mondani egy templát szekvenciáról, hogy benne volt-e a reakcióban vagy sem. Azonban azt, hogy milyen mennyiségben, csak más PCR-re épülő, összetett módszerek alkalmazásával tudjuk meghatározni, pl. szemi kvantitatív PCR, PCR-ELISA, Digital PCR.

A Real-Time PCR során a DNS mennyiségének mérése fluoreszcens detektáláson alapul, amihez kettős szálú DNS-hez kötődő fluoreszcens festékeket (SYBR Green I, EvaGreen) vagy fluoreszcensen jelölt szekvensspecifikus próbákat (pl.: Taqman, Hibridizációs próba, Molecular Beacon... stb.) használnak. A Q-PCR mérés alapvető feltétele, hogy a fluoreszcens jel erőssége egyenesen arányos legyen az amplikon mennyiségével.

A SYBR[®] Green I egy kettősszálú DNS-kötő fluoreszcens festék, melynek fluoreszcenciája kb. 2000-szer magasabb kettős szálú DNS-hez kötötten, mint szabadon. Gerjesztési maximuma 494 nm, emissziós maximuma 521 nm. A Real-Time PCR-ben a SYBR Green fluoreszcenciájának detekciója minden ciklusban a lánchosszabbítási lépés végén történik. Univerzális kettős-szálú DNS-kötő tulajdonságából következik, hogy bármilyen szekvenciához használható, ugyanakkor a fluoreszcens jel nem specifikus egy adott amplikonra. Különösen fontos ezért a primerek specifikitása (lásd még: olvadási görbe), és a primer-dimer képződés elkerülése (lásd még: Hot Start).

A fluoreszcensen jelölt szekvensspecifikus próbák esetében a detekció általában a FRET (Fluorescens Resonance Energy Transfer) jelenségen alapul. A Taqman próba az amplikon egy rövid szakaszával komplementer egyszálú oligonukleotid, melyhez két fluoreszcens festéket kötnek: az úgynevezett Riporter-t és Quencher-t. A Riporter fluoreszcens emissziós spektruma átfed a Quencher gerjesztési spektrumával. A fluoreszcens próbákat úgy tervezik, hogy a két festék fizikailag közel legyen egymáshoz (maximum 10-100 Å). Alapesetben a Riportert gerjesztve nem detektáljuk annak fluoreszcenciáját, mert átadja az energiát a Quenchernek. A reakció során a Riporter és a Quencher eltávolodnak egymástól (pl. Taqman próba esetében a festékek közötti oligonukleotidot a Taq polimeráz 5' -3' exonukleáz aktivitásánál fogva lebontja). A FRET megszűntével a Riporterre jellemző fluoreszcens szignál detektálhatóvá válik, erőssége a reakció előrehaladtával az amplikon mennyiségének megfelelően nő.

13.1.2. Real-Time PCR készülék

Jelenleg sokféle Real-Time készülék található a piacon és a kínálat egyre bővül. A készülékekkel párhuzamosan a különböző fluoreszcens festékek és próbák száma is gyarapszik.

Fontos, hogy a kutató tisztában legyen az általa használt készülék alapvető működésével, fizikai képességeivel és korlátaival. Ezekről egy adott készülék használata előtt mindig érdemes tájékozódni.

Noha a működés részletei készülékről-készülékre változnak, minden esetben megtalálható 3 fő komponens: i) a fényforrás, ami meghatározza, hogy az adott készülék milyen fluoreszcens festékeket képes gerjeszteni; ii) a detekciós rendszer, amitől a detekció spektrális tartománya és érzékenysége függ; iii) a fűtés-hűtés mechanizmusa és egyben a minták elhelyezése (thermal cycler), ami a reakció sebességét és a minták pozíciójából adódó különbségeket határozza meg, valamint azt, hogy egyszerre hány minta vizsgálható az adott készülékben.

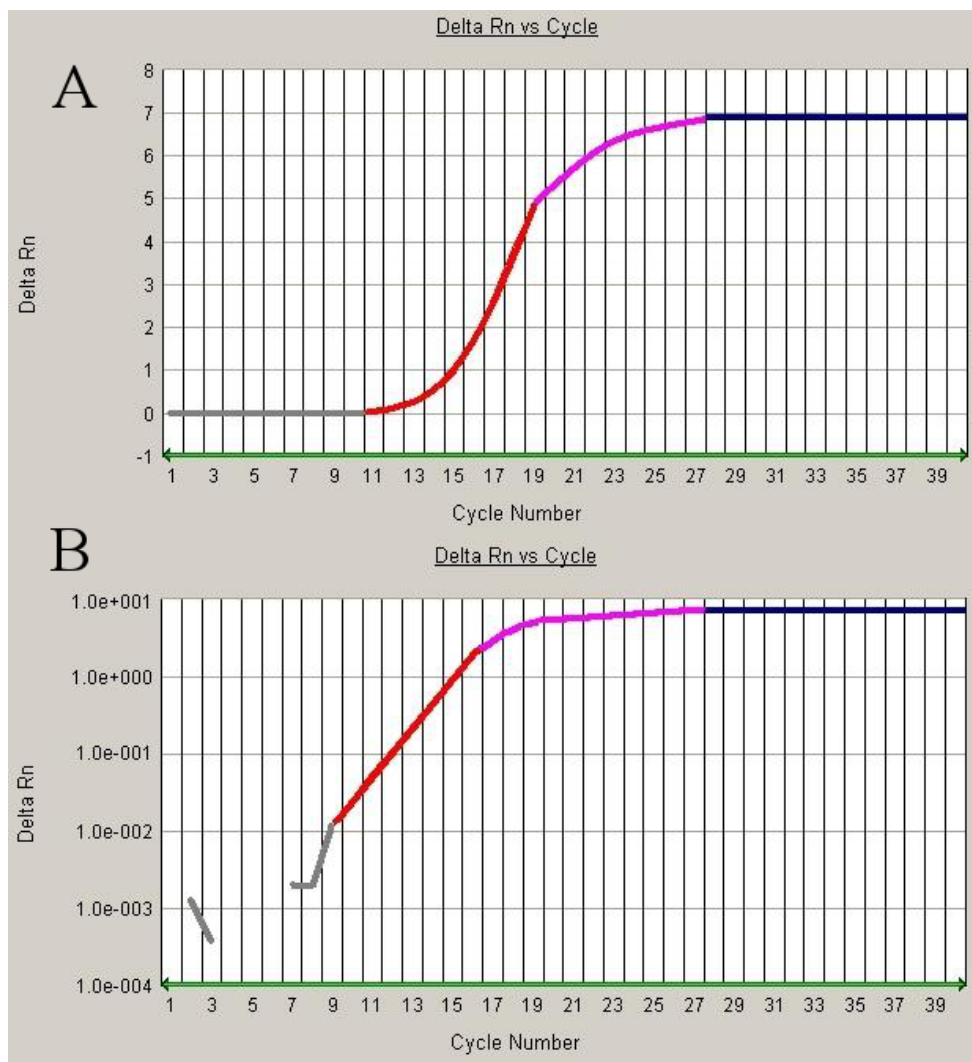
A műszer mellett a megfelelő szoftver alkalmazása jelentősen befolyásolhatja az adatok értelmezését. Fontos megjegyezni, hogy bár a legtöbb szoftver az automata adatelemzés különböző szintű lehetőségeit biztosítja, az így kapott eredmények nem lesznek annyira megbízhatóak, mintha a kutató manuális beállításokat (pl. alapvonal, küszöbérték...stb.) alkalmaz. Rendszerint lehetőségünk van az adatelemzés különböző fázisaiban a nyers, félkész vagy kész adatokat exportálni és MS Excel-ben megnyitni. Azon túl, hogy itt manuális adatelemzésre és különböző grafikus megjelenítésekre is lehetőségünk van, az Excel-ből importálva az adatokat más programokkal kiterjedtebb értékelést tudunk végezni (pl. geNorm és LinReg szoftverek).

13.1.3. Az amplifikációs görbe és az alapvonal, küszöbérték, Ct fogalma

A **Riporter szignál** a SYBR Green vagy fluoreszcensen jelölt specifikus próba fluoreszcens jele.

A **passzív referencia** festék a PCR reakció elegy komponenseivel nem reagáló, inert fluoreszcens festék (pl. ROX), melynek alkalmazása lehetővé teszi, hogy figyelembe vegyünk a pipettázásból vagy fluoreszcens fluktuációból származó különbségeket az egyes minták között.

A Normalizált riporter szignál (**Rn**) a Riporter emissziós jelének és a passzív referencia festék emissziós jelének hányadosa. Az Rn változását (ΔRn) a ciklusok függvényében ábrázolva az **amplifikációs görbét** kapjuk (13.1. Ábra.). Ez a PCR kinetikának és a detekció korlátainak megfelelően a következő részekre különíthető: lineáris, exponenciális, átmeneti és plató fázis.



13.1. Ábra. Amplifikációs görbe A. Y tengely lineáris nézetben; B. Y tengely logaritmikus nézetben; a görbe részei: lineáris (szürke), exponenciális (piros), átmeneti (lila), plató (kék). (ABI Prism 7000 szoftver)

Általában az első kb. 1-10 ciklusban a specifikus amplifikációból származó fluoreszcens jel keveset változik és nem lépi át a nem specifikus **háttér (Background)** fluoreszcenciát. Fluoreszcens próbák használata esetében ez származhat a nem megfelelő fluoreszcens kioltásból (a FRET gyengén működik), illetve SYBR Green kémianál a nagy mennyiségű DNS templáthoz (pl. genomi DNS) kötődő SYBR Green fluoreszcenciájából. Az amplifikációs görbe első részét alkotó pontokra egyenes illeszthető, ez az **alaponal (Baseline)**. Az alapvonalat kezdeti és végpont ciklusszámmal definiáljuk.

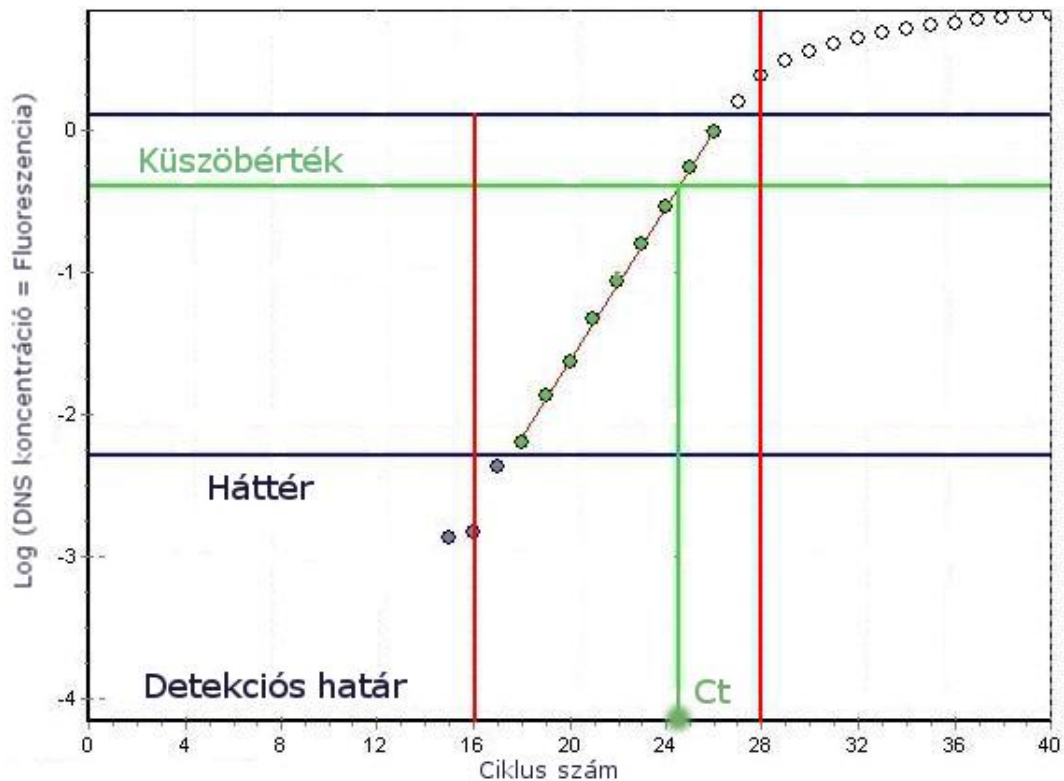
A görbék exponenciális szakaszára a következő matematikai összefüggés érvényes: $F_N = C_0 \times 2^N$, ahol N az a ciklus szám, aminél a fluoreszcencia szintet vizsgáljuk, F_N az N-edik ciklusban a fluoreszcens jel erőssége (= termék mennyisége), C_0 a kiindulási templát szekvencia mennyisége. A mérés célja a C_0 meghatározása, mivel a reakció kezdetén nagyon kis mennyiségben van jelen, ezért a C_0 -nak megfelelő fluoreszcens jel nem detektálható a háttér fluoreszcencia mellett. A reakció előrehaladtával az EXPONENCIÁLIS szakaszban mért amplikon mennyiségéből (F_N) következtetünk a kiindulási templát szekvencia mennyiségére (C_0), a fenti egyenletnek megfelelően.

A PCR görbe könnyebb elemzésének érdekében a fluoreszcens jel, **ΔRn logaritmusát** ábrázoljuk a ciklusok függvényében. Ekkor az exponenciális szakasz lineáris formában jelenik meg, amire egyenest tudunk illeszteni (lásd: 13.1/B. Ábra.)

Az amplifikációs görbék exponenciális szakaszán kiválasztunk egy adott fluoreszcencia szintet, ez a **küszöbérték (Threshold)**. Azt a ciklust, ahol a görbe eléri ezt a fluoreszcencia értéket, küszöb ciklusnak nevezzük, rövidítése

az angol kifejezésnek megfelelően lehet **Ct** (Threshold Cycle) vagy **Cq** (Quantification Cycle) vagy **Cp** (Crossing point) (lásd: 13.2. Ábra). A különböző reakciókban jelen lévő kezdeti templát szekvencia mennyiségét úgy tudjuk összehasonlítani, ha ugyanazon küszöbérték mellett vizsgáljuk őket. Ekkor az amplikon mennyisége minden reakcióban egyenlő, és a Ct értékek különbségéből következtetni tudunk a kiindulási templát mennyiségének különbségére: $F_N = C_0 \times 2^N \rightarrow F_N(A) = C_0(A) \times 2^{Ct(A)} = F_N(B) = C_0(B) \times 2^{Ct(B)}$. \rightarrow Pl.: Ha A minta Ct értéke 1-el nagyobb, vagyis egy ciklussal később éri el ugyanazt a fluoreszcencia szintet (vagyis amplikon mennyiséget), mint B mintáé, akkor B minta mennyisége kétszer nagyobb, mint A mintáé. (Lásd még Δ Ct módszer.)

Minden amplikonhoz külön küszöbérték állítható be, de értelemszerűen csak az azonos küszöbértékkel rendelkező minták vizsgálhatóak együtt.



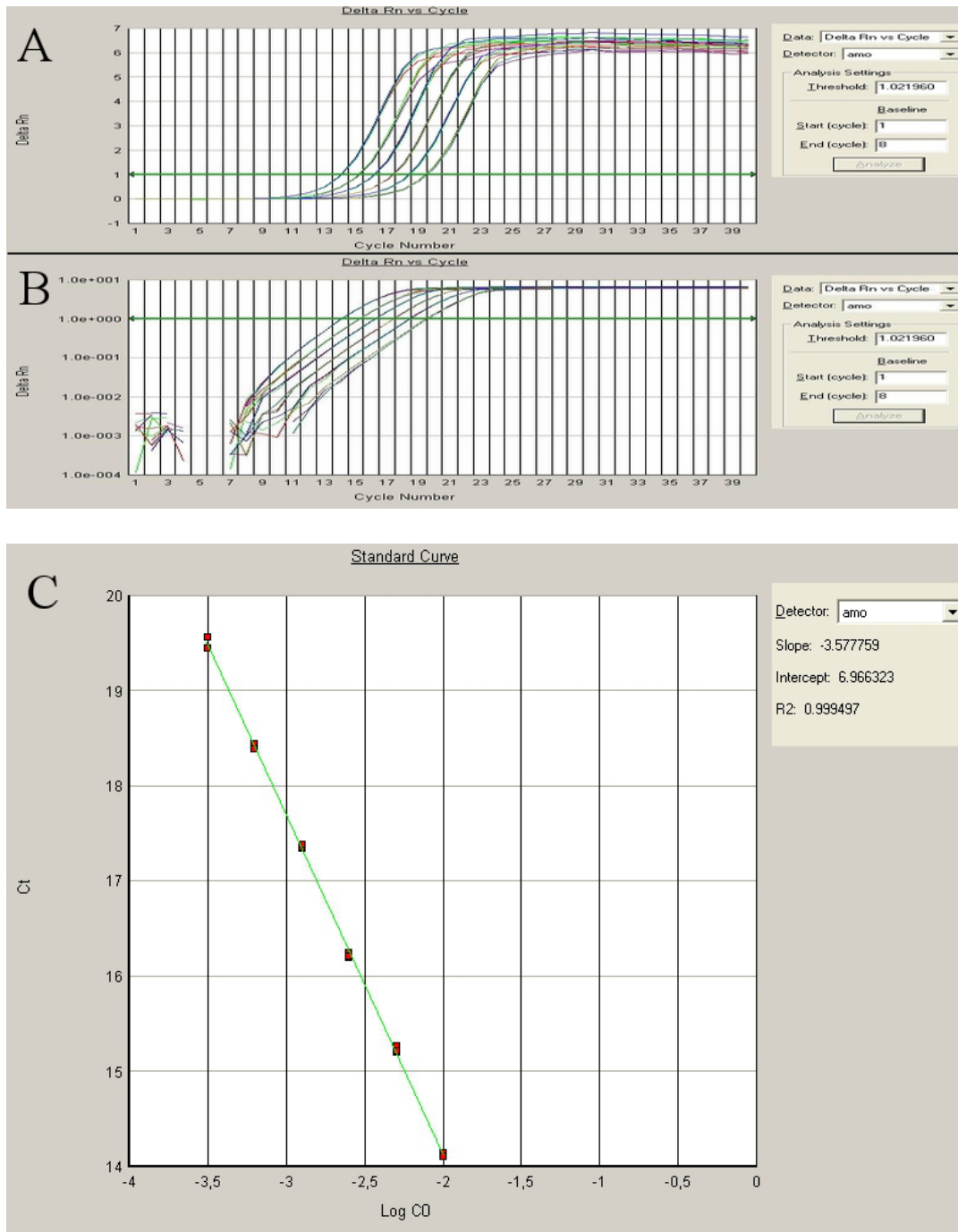
13.2. Ábra. Küszöbérték és Ct A fluoreszcens jel erősségét logaritmikus skálán ábrázoljuk a ciklusok függvényében. Az amplifikációs görbe lineáris szakaszán választunk egy fluoreszcencia szintet (vízszintes zöld vonal), ez a küszöbérték. Azt a ciklust, ahol a görbe eléri ezt a fluoreszcencia értéket, küszöb ciklusnak nevezzük (Ct).

13.1.4. Standard görbe és PCR hatékonyság

Egy kitüntetett mintából (lásd pl.: Kontroll/Kalibrátor) hígítási sort készítünk. Ha a kitüntetett minta koncentrációja vagy a templát szekvencia kópiája pontosan ismert, akkor Abszolút standard sort, ellenkező esetben Relatív standard sort készíthetünk. A hígítási faktor a kétszerestől a tízszeresig változhat, és legkevesebb öt hígítási tagnak kell lennie. Pl.: 10, 100, 1000, 10000, 100000 kópia templát szekvenciát tartalmazó Abszolút hígítási sor; vagy 100x, 200x, 400x, 800x, 1600x hígított Relatív hígítási sor.

Meghatározzuk az egyes hígítási tagokhoz tartozó Ct értékeket (13.3A és B. Ábra), majd ábrázoljuk az ismert koncentráció, vagy hígítás logaritmusának függvényében (13.3C. Ábra). Az így kapott pontokra illesztett egyenes a **Standard görbe**. A Standard görbe minőségi követelménye, hogy az egyenes illesztés pontossága, vagyis a determinációs együttható $R^2 > 0,99$ legyen.

A Standard görbe alapján egy ismeretlen minta Ct értékéből tudunk következtetni annak mennyiségére (lásd: Mennyiségi meghatározás Standard görbe alapján).



13.3. Ábra. Hígítási sor és Standard görbe Egy 100x, 200x, 400x, 800x, 1600x hígított Relatív hígítási sorhoz tartozó amplifikációs görbék lineáris (A) és logaritmikus (B) ábrázolásban. A vízszintes zöld vonal a küszöbérték. C: Az egyes hígítási tagokhoz tartozó Ct értékek a hígítás logaritmusának függvényében ábrázolva. Az így kapott pontokra illesztett egyenes a Standard görbe. A jobb felső sarokban az egyenes meredeksége, Y tengely metszete, és determinációs együtthatója látható. (ABI Prism 7000 szoftver)

Egy sok tagot tartalmazó és nagy koncentráció-intervallumot lefedő standard sor esetében a szélsőségesen tömény vagy túlságosan híg tagok nem illeszkednek az egyenesre, mert kiesnek a reakció **dinamikus tartomány**ából. Pontos mennyiségi meghatározás csak a dinamikus tartományon belül lehetséges. (A dinamikus tartomány felfogható úgy is, mint a legnagyobb koncentráció intervallumot lefedő Standard görbe.) A dinamikus tartomány vizsgált amplikononként különböző, alsó határát a detektálás érzékenysége, vagyis a reakció kémiaja és a Real-Time készülék szabja meg. Felső határa szintén függ a készülék érzékenységétől, bár a tömény mintáknál inkább érvényesül az ún. mátrix hatás, vagyis a reakcióelegy egyéb komponenseinek limitáló hatása. A különböző

készülékek a 10^6 - 10^{12} -szeres különbségek detektálására lehetnek alkalmasak. A nagy dinamikus tartománnyal rendelkező reakciók esetében pontosan megmérhetők a nagyon híg és a nagyon tömény minták is.

Ha egy sok tagot tartalmazó hígítási sor segítségével már meghatároztuk a reakció dinamikus tartományát, a további vizsgálatokban azt nem feltétlenül kell a Standard görbének teljes egészében lefednie. Ekkor a Standard görbe extrapolálása a dinamikus tartományon belül még pontos eredményhez vezet, azon túl azonban kerülendő.

A PCR kinetika alapján feltételezzük, hogy az exponenciális szakaszban az amplikonok mennyisége minden ciklusban megkétszereződik. Ez a tökéletes, 100% hatékonyságú PCR-re igaz. A gyakorlatban azonban ez ritkán valósul meg és a kívánt négyzetes emelkedés helyett, ennél alacsonyabb többszöröződést tapasztalunk. Mivel a mérés alapegyenlete exponenciális, a kezdeti mennyiséget nagy hibával becsüljük meg, ha a hatványalap 2-nél jelentősen kisebb. Minél nagyobb az eltérés a valós és az elméleti hatékonyság között, és minél későbbi ciklusokban (hatványkitevő) történik az összehasonlítás, a hiba annál nagyobb lesz.

Hagyományosan a Standard görbe meredekségéből becsülhető meg a reakció hatékonysága (Efficiency): $E = 10^{(-1/m)} - 1$ vagy $10^{(-1/m)} - 1 \times 100$ (%-ban kifejezve). Ennek megfelelően az alapösszefüggés így módosul: $F_N = C_0 \times (E+1)^N$. 100%-os reakcióhatékonyság esetén $m = -3,322$, $E = 1$. Ha a görbe meredeksége nagyobb ($m < -3,222$) a reakcióhatékonyság $E < 1$, ha kisebb ($m > -3,222$) akkor a hatékonyság 100% felettinek tűnik ($E > 1$).

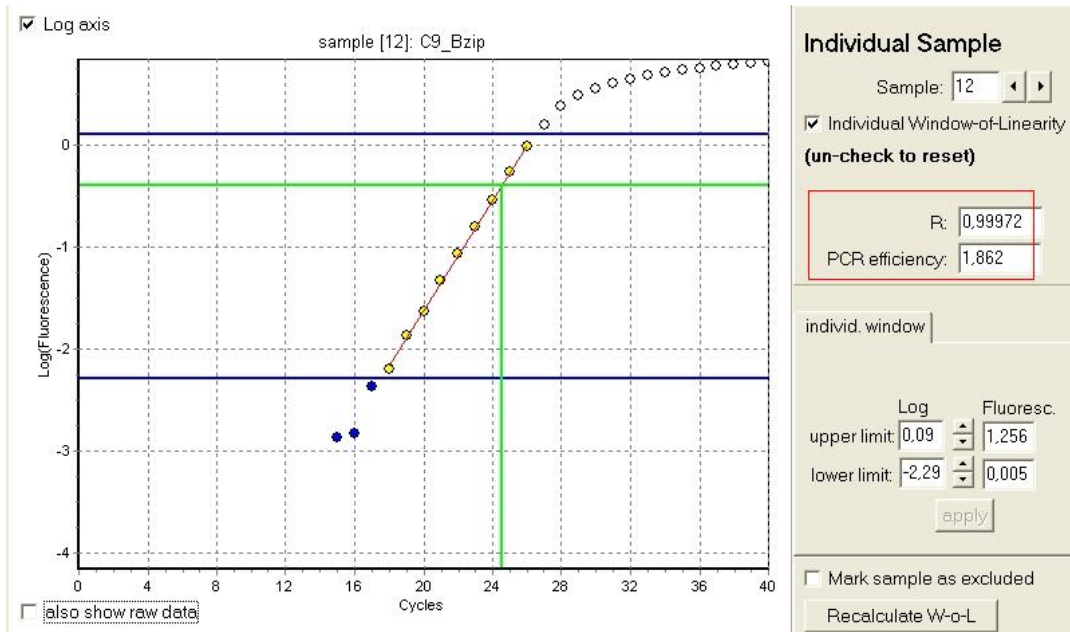
A Standard görbe módszer alkalmazásánál feltételezzük, hogy a reakcióhatékonyság a dinamikus tartományban minden mintára azonos. Ez azonban nem mindig igaz!

Lehetőségünk van megvizsgálni minden minta egyedi hatékonyságát különféle görbeillesztési módszerekkel. Ezen algoritmusok egy része az eredeti exponenciális lefutású görbét vizsgálja, mások pedig a logaritmikus görbe tulajdonságait. Ez utóbbi összefüggéssel például az amplifikációs görbék lineáris szakaszára illesztett egyenes képletéből tudunk egyedi reakcióhatékonyságot és kezdeti templát mennyiséget is számolni:

$$y = a \times x + b \rightarrow \text{Log}(F_N) = \text{Log}(E \times C) + \text{Log}(C_0) \rightarrow E = 10^a \text{ és } C_0 = 10^b.$$

Egy adott vizsgált génre a reakció hatékonyságát az egyedi reakcióhatékonyságok átlagolásával becsüljük, és az átlagtól eltérő hatékonyságú reakciók könnyen azonosíthatóak. Az egyenletből számolt C_0 értékek relatív mennyiségi összehasonlítást tesznek lehetővé.

Az egyedi amplifikációs görbék analízisére használható pl. a **LinReg** szoftver (13.4. Ábra.). A módszer előnye, hogy a reakcióhatékonyság számolása nem igényel külön Standard görbét. Hátránya, hogy jelentősen összetettebb és időigényesebb az eredmények értékelése.



13.4. Ábra. LinReg PCR szoftver Az egyedi amplifikációs görbék analizésére és Standard görbe nélküli reakcióhatékonyság becslésre használható szoftver. A logaritmikus nézetben ábrázolt amplifikációs görbe lineáris szakaszára illesztett egyenes képletéből egyedi reakcióhatékonyságot és kezdeti templát mennyiséget is számol. Egy adott vizsgált génre a reakció hatékonyságát az egyedi reakcióhatékonyságok átlagolásával becsli.

13.1.5. Normalizáció

A normalizáció a mért mennyiségi különbségek korrigálása egy általunk választott viszonyítási alaphoz képest. A normalizáció során a Real-Time reakcióval mért kiindulási templát szekvencia mennyiségét vonatkoztathatjuk a minta tömegére, a sejtszámra vagy a kinyert nukleinsav össz mennyiségére. Választhatunk azonban más normalizációs alapot is, ún. belső Referenciát is, ilyenek lehetnek a riboszomális RNS mennyisége, vagy bizonyos állandóan és stabilan kifejeződő gének (például a housekeeping gének). A génexpresszió meghatározására gyakran ilyen belső Referencia géneket választanak, mivel a legtöbb esetben a kezelések hatására a minták egyéb paraméterei is megváltoznak, vagy, mert pontos mérésük igen nehezen kivitelezhető (pl. sejtszám növényi szövetnél).

Az alkalmazott normalizációs módszer nagymértékben befolyásolhatja eredményeink értelmezését. A kísérletes növénybiológiában leggyakrabban használt és elfogadott viszonyítási alap a kinyert nukleinsav össz mennyisége, vagy belső Referencia gének mennyisége illetve transzkripció szintje.

A nukleinsav össz mennyiségének pontos meghatározása szükséges ahhoz, hogy azt normalizációhoz használhassuk. Például a genomi DNS mennyisége 260 nm-en spektrofotometriával meghatározva nem ad megfelelően pontos eredményt. Azonban elfogadható nukleinsav mennyiségi mérésnek tekinthető, ha speciális fluoreszcens nukleinsav kötő festékkel mérjük a nukleinsav koncentrációt: pl. a RiboGreen használható mRNS és cDNS jelölésre és fluoreszcens mérésre.

A **Referencia gének** alkalmazásakor alapvető elvárás, hogy ezek kifejeződését maga a kísérlet, kezelés ne befolyásolja, vagyis transzkripció szintjük egyforma legyen a minták között. A **housekeeping gének** rendszerint jó referencia jelöltek, azonban minden kísérlet során igazolni kell, hogy az adott körülmények valóban nem befolyásolják az általunk választott housekeeping gének expressziós stabilitását. Vagyis ugyanúgy meg kell mérnünk expressziójukat a kísérleti mintákban, akárcsak a vizsgált géneket, és meg kell becsüljük stabilitásukat. A referencia gének validálásához különféle algoritmusok állnak rendelkezésünkre, amelyek a Real-Time reakció során kapott nyers adatok alapján expressziós stabilitást számolnak (pl. geNorm és BestKeeper szoftverek). Az is elfogadott eljárás, hogy az irodalmi adatokra támaszkodva kiválasztott legalább 3 belső Referencia gén geometriai átlagát használjuk a vizsgált gén mRNS szintjének normalizálásához.

Fontos hangsúlyozni, hogy a normalizált eredményeink sohasem lehetnek pontosabbak, mint a normalizációhoz használt referencia minősége. Bármilyen változás a referenciában hibaként jelentkezik a végeredményben.

Referencia gén helyett elterjedt a kontroll gén kifejezés is. Ezt semmiképp ne keverjük a **Kontroll minta** fogalmával (ami helyett használják a referencia minta kifejezést is).

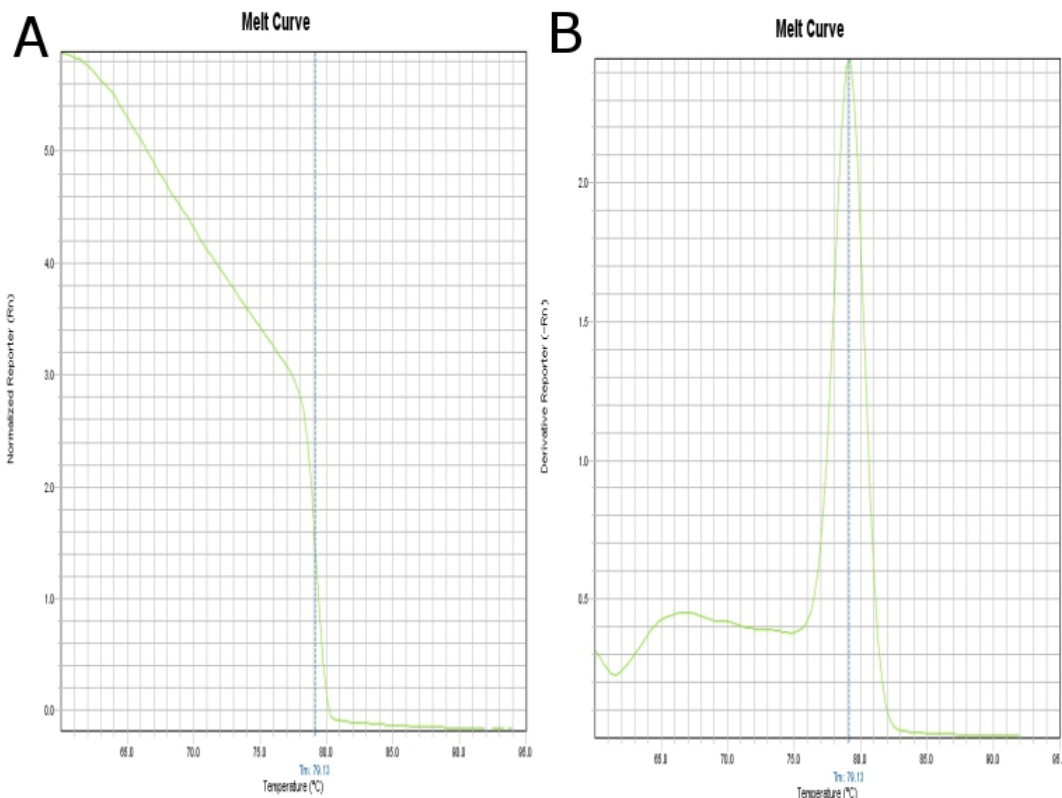
13.1.6. A kísérleti Kontroll és Kalibrátor minta

A kísérlet tervezésénél mindig kell választanunk egy viszonyítási alapot, hogy a kapott gén expressziós eredmények biológiai értelmet nyerjenek. A kérdésfeltevés leggyakoribb módja, hogy a kísérlet során alkalmazott kezelés hatására, milyen eltérést tapasztalunk a normál körülményekhez képest. Vagyis mintáink egy része a „normál” ún. Kontroll körülményeknek felel meg, másik részük pedig a kezelt minták csoportjába tartozik. Azt a mintát, amihez viszonyítunk Kontroll vagy Kalibrátor mintának nevezzük. A Kontroll kifejezés inkább a kísérletben, a Kalibrátor pedig a minta adatelemzésben betöltött szerepére utal.

A normalizációhoz alkalmazott **Referencia** (gén) és a kalibrációhoz használt **Kontroll** (minta) fogalma nem keverendő. Az előbbi a reakcióba bemért összes nukleinsav mennyiségét, utóbbi a kísérleti körülmények hatására jelentkező mennyiségi eltéréshez jelent viszonyítási alapot (lásd még: Kiértékelés $\Delta \Delta Ct$ módszerrel).

13.1.7. Olvadási pont meghatározás

Minden kettős szálú DNS-nek van egy olvadáspontja (T_m), az a hőmérséklet, amin az adott DNS molekulák fele egyszálú formában van jelen a reakcióelegyben. Ez a hőmérséklet függ a DNS szál hosszától, G:C tartalmától, nukleotid sorrendjétől és a helyes Watson-Crick bázispárosodástól. Ha a DNS kettős-szálú DNS-kötő festékkel van jelölve, melegítéskor az olvadáspontot elérve a festék szabadabbá válik, ennek megfelelően a fluoreszcencia hirtelen csökken. A fluoreszcenciát a hőmérséklet függvényében ábrázolva egy csökkenő szigmoid görbét kapunk, aminek az inflexiós pontja adja meg az olvadáspontot. Ezt a görbét negatív derivált alakban szokás ábrázolni, ahol az inflexiós pont egyértelmű csúcsként jelentkezik (lásd: 13.5. Ábra.). Egy adott amplitkonhoz egy csúcs tartozik. Több csúcs több inflexiós pontot, végeredményben több eltérő amplitkont jelez. Precíz detekcióval azonos méretű amplitkonok közötti egyetlen bázispár eltérés is kimutatható a szekvenciában. Az olvadási görbe analízisnek alapvetően fontos szerepe van a SYBR Green kémiaát használó reakciók specifikusságának ellenőrzésében.



13.5. Ábra. Olvadási görbe Lineáris (A) és negatív derivált (B) ábrázolásban.

13.1.8. Relatív mennyiségi meghatározási módszerek

A mérés alapulhat abszolút vagy relatív mennyiségi meghatározáson. Ha pontosan ismerjük a Kalibrátorként szolgáló minta koncentrációját (vagy azt, hogy hány kópia templát szekvenciát tartalmaz) és ehhez hasonlítjuk a vizsgálni kívánt ismeretlen mintákat, akkor abszolút mérést végzünk. Az abszolút mennyiségi meghatározás megbízhatósága teljes mértékben a standard megbízhatóságán múlik. Abszolút meghatározáshoz a standard minta létrehozása, a pontos koncentráció meghatározása és stabilitása hosszabb tárolás alatt problémát jelenthet. Legtöbbször nem fontos, hogy ismerjük a standard minta kiindulási koncentrációját, és elegendő, hogy megtudjuk a többi kísérleti mintában az adott gén kifejeződése milyen mértékben tér el ettől. Ekkor beszélünk relatív mennyiségi meghatározásról.

13.1.8.1. Standard görbe módszer

Ennek az általánosan használható kiértékelési módszernek hátránya, hogy a Standard görbéhez minden mérés (esszé) alkalmával legalább 15 (5 hígítási tag, mindegyik 3 ismétléssel) plusz reakcióval kell számolni és ez sok esetben jelentősen megnöveli a kísérlet költségeit. A pontos kiértékelés megköveteli, hogy a hígítási sor tagjait együtt mérjük meg az ismeretlen, vizsgálni kívánt mintákkal, ugyanabban a Real-Time esszében. Standard görbét kell készíteni egyrészt a vizsgált GOI-re, másrészt és a Referenciaként kiválasztott génekre is. Minden Standard görbe illesztési pontosságának $R^2 > 0,99$ kell lennie és a reakció hatékonyságoknak legalább $80\% < E < 110\%$ közé kell esnie, optimális azonban, ha $90\% < E < 100\%$.

A standard görbék egyenlete alapján [$y = ax + b$] $y = Ct$; $a = (m)$ Standard görbe meredeksége; $x = \log C$; $b = y$ tengely metszet] minden mintára meghatározzuk a GOI és Referencia gén(ek) relatív mennyiségét.

A normalizációhoz a GOI relatív mennyiségét vonatkoztatjuk a Referencia gén(ek) relatív mennyiségére, az adott mintán belül, így kapjuk meg a minta normalizált relatív mennyiségét.

Ha van Kontroll/Kalibrátor mintánk, akkor a kezelt minták normalizált relatív mennyiségét ehhez viszonyítjuk.

13.1.8.2. ΔCt módszer

A legegyszerűbb, a Ct értékek közvetlen összehasonlításán alapuló relatív mennyiségi meghatározási módszer. Abból az alapfeltevéstől indul ki, hogy ha két minta Ct különbsége 1, akkor a kezdeti templát mennyiségének különbsége kétszeres, a kisebb Ct értékű minta javára. A Ct különbség növekedésével a kezdeti templát szekvencia különbség exponenciálisan nő. $A/B = 2^{\Delta Ct}$, ahol $\Delta Ct = (CtB - CtA)$. [Másképp: $A/B = 2^{-\Delta Ct}$, ahol $\Delta Ct = (CtA - CtB)$. A nagyobb Ct kisebb templát szekvencia mennyiséget jelent, mint a kisebb Ct. Vigyázz! Ne keverdj! A/B jelentheti ugyanazon amplitudon arányát két különböző mintában (például transzgen kópia számának meghatározása) vagy lehet ugyanabban a mintában két eltérő amplitudon aránya. Ez utóbbi legtöbbször a GOI és a Referencia gén közötti összehasonlítást jelenti.

Kezdeti feltételek:

- A vizsgált Ct értékek a reakció dinamikus tartományában vannak.
- A reakcióhatékonyság közel 100%.
- Ha két külön amplitudont vizsgálunk, mindkettőre feltételezzük a 100% hatékonyságot, vagy a reakciók hatékonyságának különbségét elenyészőnek tekintjük ($< 4\%$, Standard görbék meredekségének különbsége $< 0,1$).

A módszer korrekt használatához a kezdeti feltételek bizonyítása szükséges. A kísérletes biológiában rendkívül nehéz közel 100% hatékonyságú reakciókat tervezni, és az optimalizálás sok plusz munkát vesz igénybe, ami a módszer pontosításához és egyéb paraméterek bevonásához vezetett. A reakcióhatékonyság(ok) figyelembevételével a becslés pontossága javítható.

A ΔCt módszer a gyakorlatban durva becslésre alkalmazható, kis Ct különbségek esetén. A Ct különbségek növekedésével a becslés pontossága rohamosan romlik.

13.1.8.3. $\Delta \Delta$ Ct módszer

Ugyancsak a Ct értékek direkt összehasonlításán alapuló relatív mennyiségi meghatározási módszer. Alkalmazásához ugyanazokat a kezdeti feltételeket kell bizonyítani, mint a Δ CT módszer esetében! Plusz paraméterként vonjuk be a kísérletben Kontrollként vizsgált minta(ák) Δ Ct értékeit. A számolás során kísérleti mintánként összehasonlítjuk a GOI és a Referencia gén(ek) Ct értékét, majd az így kapott relatív mennyiségi adatokat viszonyítjuk egy Kontroll mintáéhoz. Végeredményként azt az információt kapjuk meg, hogy a GOI milyen arányban van jelen a vizsgált mintákban a Kontroll mintához képest.

A következő négy adattal számolunk: **GOI** és *Referencia* gén Ct értékei a Kísérleti mintában (kék), valamint a **GOI** és a *Referencia* gén Ct értékei a Kontroll mintában (piros).

Első lépésben a Δ Ct értékeket számoljuk ki mind a kezelt, mind a Kontroll minta esetében. Ez megfelel a normalizációnak.

$$\Delta Ct(\text{Minta}): Ct(\text{GOI}) - Ct(\text{Referencia})$$

$$\Delta Ct(\text{Kontroll}): Ct(\text{GOI}) - Ct(\text{Referencia})$$

Második lépésben a vizsgált minta Δ Ct értékéből kivonjuk a Kontroll minta Δ Ct értékét.

$$\Delta \Delta Ct(\text{Minta}) = \Delta Ct(\text{Minta}) - \Delta Ct(\text{Kontroll})$$

Kísérleti mintában lévő normalizált **GOI** mennyisége = $2^{-\Delta \Delta Ct}$

Az összefüggés matematikailag sokféleképpen felírható, de figyeljünk mindig oda, hogy más felírásban mi mit jelent, mit mihez viszonyítunk.

Másképp:

Először minden mintára számolunk Δ Ct értéket a **GOI** és *Referencia* reakciók Ct értéke alapján.

$$\text{Minta: } \text{GOI} / \text{Referencia} = 2^{(Ct_{Ref.} - Ct_{GOI})}$$

$$\text{Kontroll: } \text{GOI} / \text{Referencia} = 2^{(Ct_{Ref.} - Ct_{GOI})}$$

Másodszor minden mintára kapott GOI/Referencia relatív mennyiséget elosztjuk a Kontroll mintára kapott relatív GOI/Referencia mennyiséggel

$$2^{(Ct_{Ref.} - Ct_{GOI})} / 2^{(Ct_{Ref.} - Ct_{GOI})}$$

Egyben felírva az összefüggést:

$$\text{Kísérleti mintában lévő GOI mennyisége} / \text{Kontroll mintában lévő GOI mennyisége} =$$

$$2^{[(Ct_{Ref.} - Ct_{GOI}) - (Ct_{Ref.} - Ct_{GOI})]}$$

Fontos megjegyezni, hogy ahhoz, hogy a Kísérleti mintában lévő GOI mennyiségét a Kontroll mintában lévő GOI mennyiségéhez kapjuk meg:

Minta / Kontroll \rightarrow Az osztás a hatványkitevőben ezt jelenti: [Δ Ct Minta $-$ Δ Ct Kontroll]

GOI / *Referencia* \rightarrow Ha a hatványkitevőben: (Ct *Referencia* $-$ Ct **GOI**) $\rightarrow 2^{\Delta \Delta Ct}$ de, ha a hatványkitevőben (Ct **GOI** $-$ Ct *Referencia*) $\rightarrow 2^{-\Delta \Delta Ct}$ VIGYÁZZ! Ne feledd, hogy a nagyobb Ct kisebb templát szekvencia mennyiséget

jelent, mint a kisebb Ct. Nem mindegy, hogy a GOI-et viszonyítod a Referenciához, vagy fordítva, mint ahogy az sem, hogy a Mintát viszonyítod a Kalibrátorhoz vagy fordítva.

13.1.8.4. Pfaffl módszer

A $\Delta \Delta Ct$ módszer tovább finomítható, ha figyelembe vesszük a GOI és a Referencia reakciók hatékonyságát. Pfaffl gyakorlatilag úgy alakította át a $\Delta \Delta Ct$ módszert, hogy a hatványalapban 2 helyett a GOI és a Referencia reakciók hatékonyságával lehessen számolni. (Ha ugyanazokkal a Ct értékekkel dolgozunk és mindkét reakció hatékonyságát 2-nek vesszük, ugyanazt az eredményt adja, mint a $\Delta \Delta Ct$ módszer.) Feltételezi, hogy minden minta Ct értéke a reakciók dinamikus tartományában van és ismerjük a reakcióhatékonyságokat (E).

Először minden minta Ct értékét a Kontroll minta Ct értékéhez hasonlítjuk, külön a GOI és külön a Referencia reakciók esetében.

$$GOI = E_{GOI}^{(Ct_{Kontroll} - Ct_{Minta})}$$

$$Referencia = E_{Referencia}^{(Ct_{Kontroll} - Ct_{Minta})}$$

Másodszor minden minta relatív GOI mennyiségét elosztjuk a relatív Referencia mennyiségével. (Ez felel meg a normalizációnak.):

Kísérleti mintában lévő normalizált GOI mennyisége:

$$E_{GOI}^{(Ct_{Kontroll} - Ct_{Minta})} / E_{Referencia}^{(Ct_{Kontroll} - Ct_{Minta})}$$

13.2. Példafeladatok

Két példát mutatunk be arra, hogyan alkalmazhatjuk a Q-PCR módszert a növényi molekuláris biológiában. Az első példa genomi DNS templát felhasználásával transzgen kópia számának meghatározása, míg a második egy génextpressziós vagyis mRNA mennyiség mérésére szolgáló vizsgálat. A példák mindkét esetben egy-egy nagyobb kísérlet sorozatból kiragadott részletek, amiket megpróbálunk önállóan értelmezni. A Q-PCR korrekt kivitelezéséhez és kiértékeléséhez optimalizációra és előkísérletekre van szükség, melyek itt most csak említés szintjén szerepelnek.

Mindkét példában a (Thermo Scientific) Maxima SYBR Green Master Mix-et és az (Applied Biosystems) StepOnePlus™ és ABI Prism 7000™ Real-Time PCR készülékeket használjuk. A bemutatott ábrák a készülékekhez tartozó szoftverek képanyagának felhasználásával készültek.

13.2.1. Előkísérletek

Ha olyan gének mennyiségét vagy expresszióját akarjuk mérni, amiket előttünk már mások is vizsgáltak, a szakirodalom jó forrása lehet a már beállított reakcióknak. Szerencsés esetben valamely biotechnológiai cég forgalmaz optimalizált, kész reakciókat.

A kísérletes munka során gyakran találkozunk azzal a problémával, hogy az általunk vizsgálandó gén mennyiségét vagy expresszióját mi szeretnénk meghatározni először. Ilyen esetekben nekünk kell kísérleti reakciót tervezni, és azt beállítani.

Primer tervezés: SYBR Green kémiaát alkalmazó reakcióknál az ampikon optimális mérete 50 – 150 bp. Génextpressziós vizsgálatokhoz úgy tervezzük a primereket, hogy csak cDNS-en működjön a reakció, genomi DNS-en ne (pl. az egyik primert exon-exon határra).

A reakciókat optimalizálni kell hagyományos PCR-el: Egyetlen, nagyon erős sávot kell kapnunk agaróz gélen. Főbb optimalizálandó paraméterek: kapcsolási hőmérséklet, primer arányok, Mg²⁺ koncentráció. Ha a Master Mix-

et mi mérjük össze, akkor annak összetételét is optimalizálni kell: Taq polimeráz, puffer, SYBR Green, ROX, PCR adalék (pl. DMSO, Glycerol) stb.

A hagyományos PCR-ben kiválóan működő reakciót Real-Time vizsgálatban ellenőrizzük tovább, rendszerint hígítási sor futtatásával. Főbb vizsgálati szempontok:

Olvadási görbe, dinamikus tartomány és reakcióhatékonyság.

Belső referencia gének validálása a kísérleti beállításhoz, szövethez stb. (lásd: II. példafeladat.)

Kísérleti minták előzetes vizsgálata, és a megfelelő hígítás kiválasztása: A mintákat olyan hígításban kell alkalmazni, hogy azok biztosan a reakció dinamikus tartományába essenek.

13.2.3. I. Példafeladat

Transzgén homo/hemizigóta állapotának meghatározása

Szövetspecifikus genetikai szabályozóelemek vizsgálatához olyan transzgenikus árpa növényeket hoztunk létre, melyek a transzgént, az *uidA* gént csak a szemtermésükben expresszálják. Az *uidA* gén a Gus (β -Glükuronidáz) enzimet kódolja. A Gus enzim a megfelelő szubsztrátot jól látható kék terméké alakítja, ezért azok a szövetek, ahol a Gus enzim aktív kéken festődnek. A Gus enzim mennyiségét nagymértékben befolyásolja, hogy az adott transzgenikus növény hány kópiában tartalmazza a transzgént. A Q-PCR vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a transzgén hemizigóta (olyan heterozigóta, aminél az adott lókusznak nincs megfelelője a homológ kromoszómáron) vagy homozigóta formában van-e jelen.

Mivel kis különbségeket (2X – homozigóta:hemizigóta – 2:1) kell kimutatni nincs szükség nagy **dinamikus tartományra**. A bemutatott példa reakciót úgy állítottuk össze, hogy többféle kiértékelés is lehetséges legyen: **Standardgörbe; Δ Ct, $\Delta \Delta$ Ct módszer, Paffl módszer.**

Mivel az ilyen típusú Real-Time vizsgálat genomi DNS felhasználásával történik, a **normalizációhoz** elég egy genomi Referencia gén. (A génexpressziós kísérletektől eltérően, ebben az esetben nem kell tartanunk a Referencia gén mennyiségbeli változásától.) A vizsgált templát szekvenciák száma így összesen kettő: transzgén (GOI) és Referencia gén. A GOI a Gus enzim génjének 125 bp, míg a Referencia egy Bzip transzkripció faktor génjének 142 bp hosszú szakasza. Összesen 10 különböző növény DNS mintáját vizsgáljuk meg, melyek egy a transzgénre hemizigóta növény utódai (Minta 1-10). (Az előzetes PCR eredmények alapján a transzgént nem tartalmazó utódokat nem vizsgáljuk Q-PCR-el.) A Minta 1 olyan növényről származik, amiről már tudjuk, hogy a transzgént egy példányban, homozigóta állapotban tartalmazza (Kalibrátor minta). A többi minta esetében azt akarjuk megtudni, hogy a transzgén homozigóta vagy hemizigóta formában van-e a genomban.

A minták DNS koncentrációját 260 nm-en UV spektroszkópiával határozzuk meg. Ez a mérés normalizációhoz nem alkalmas, de ahhoz igen, hogy a bemért templát DNS mennyisége ne legyen nagyon eltérő a különböző minták között.

Ahhoz, hogy a reakciók alapparamétereit meghatározzuk és Standard görbe módszerrel értékelhessük eredményeinket, hígítási sort készítünk, melyhez a Minta 1-et használjuk. A legtöményebb hígítási tag 10 ng genomi DNS-t tartalmaz, majd kétszeres hígításonként összesen 6 tagot (10ng; 5 ng; 2,5 ng; 1,25ng; 0,625ng; 0,3125 ng). A 9 vizsgálandó mintából 2-2 mérünk minden reakcióba.

A kezdeti beállításokból következően arra számíthatunk, hogy az amplifikációs görbék közel lesznek egymáshoz és a Ct értékek egy szűk tartományba esnek.

A reakciót összesen 96 mintára kell összeállítani:

6 tagú hígítási sor (Minta 1 hígításaiból)

9 ismeretlen minta (Minta 2 – Minta 10)

1 NTC (DNS minta helyett, vizet tartalmazó Non-Template Control)

Mindent 3× technikai ismétlésben (az alapvető elvárás az eredmények értékeléséhez)

Mindezt kétszer (a GOI és Referencia a szekvenciára)

$$(6+9+1=16) \times 3 \times 2 = 96$$

Így egy teljes 96 zsebet tartalmazó plate-et kihasználunk. (lásd: 13.6. Ábra.)

Reakciókomponensek:

Gyári Master Mix (MM):

- 2× töménységű PCR puffer
- Hot Start Taq DNS polimeráz
- dNTP (0,5 mM)
- Mg²⁺ (0,5 – 4 mM)
- SYBR Green
- ROX (100 nM)

Ehhez kell hozzáadni a

- templát DNS-t
- primereket (0,5 – 4 μM)
- és megfelelően beállítani tisztított, desztillált vízzel

Általános reakciókra optimalizált Master Mixet több cég is forgalmaz. Megfontolandó a készülékhez optimalizált Maser Mix használata, de nem kötelező. Szükség esetén mi is összemérhetjük a reakcióelegyet a felsorolt komponensekből, ilyenkor lehetőségünk van a leginkább megfelelő enzim kiválasztására, és az ahhoz tartozó puffer optimalizálására.

Az előzetes optimalizálás során megállapítottuk, hogy a Bzip (Referencia) génre tervezett reakció 1 μM primer koncentráció, míg az *uidA* gén (GOI) kimutatására szolgáló PCR 2 μM primer koncentráció mellett működött a leghatékonyabban. Az egyszerűség kedvéért a két különböző reakcióhoz tartozó primerpárból olyan hígításokat készítünk, hogy belőlük ugyanakkora térfogatokat kelljen a reakcióelegyekbe bemérni, és az összetartozó Forward és Reverse primereket egy csőben hígítottuk az adott koncentrációra.

13.2.3.1. Az esszé összemérése

Egy reakcióra számolva az összetevők:

12,5 μl MM

2,5 μl Forward és Reverse Primer keverék

7,5 μl H₂O

2,5 μl Templát

Σ 25 μl végtérfogat

A leghatékonyabb pipettázási stratégia és a minták keresztzennyezésének elkerülése végett a következő lépésekben hajtjuk végre az esszé összemérését:

1) A GOI kimutatására tervezett reakcióhoz készítünk egy Super Mix-et (SM), mely tartalmazza a Master Mix-et, a GOI-re specifikus primerpárt és vizet, de a templát DNS-t nem. Összesen 48 reakcióra 10 % ráméréssel számolunk, a pipettázásból eredő túlmérés ellensúlyozására.

SM: $48 \times 1,1 = 52,8$

$12,5 \times 52,8 = 660 \mu\text{l}$ MM

$2,5 \times 52,8 = 132 \mu\text{l}$ Primer

$7,5 \times 52,8 = 396 \mu\text{l}$ H₂O

2) 0,5 ml-es Eppendorf csövekbe szétosztunk a 9 ismeretlen mintából és a hígítási sor 6 tagjából 8-8 μl templát DNS-t, törekedve a maximális precizításra. A negatív Kontrollhoz egy csöbe 8 μl steril desztillált vizet mérünk be. A GOI reakcióhoz így összesen 16 csöben egyenként 8 μl mintával rendelkezünk.

3) A SM-ből 72 μl -t mérünk minden egyes előkészített mintához, így összesen 80 μl reakcióelegyet kapunk. Ez a 80 μl felel meg az egy mintához tartozó három technikai ismétlés összegének, 5 μl ráméréssel számolva.

A Referencia génre tervezett reakcióhoz a fent leírtaknak megfelelően megismételjük az 1-3 lépéseket az arra specifikus primerek bemérésével.

4) Utolsó lépés a Real-Time PCR-hez gyártott speciális plate-re való szétosztás. A plate-et a csomagolásából való kivétel után az erre a célra gyártott plate-tartóban érdemes elhelyezni. A plate minden egyes zsebébe 25 μl -enként bemérjük a 3-3 technikai ismétlésnek megfelelő végtérfogatot. A reakció szétosztása után a plate-t optikai fóliával kell lezárni. Ennél a lépésnél fontos, hogy a záródás tökéletes legyen (különösen a széleknél), valamint a fóliának és a plate zsebeinek kívülről is szennyeződésmentesnek kell maradnia (pl. zsír a kezünkről, púder a kesztyűről ilyen szennyeződésnek számítanak). A lezárt plate-t centrifugáljuk (3000 rpm, 3 min), hogy a reakcióelegyek a zsebek alján összegyűljenek.

Megjegyzés: A reakcióelegy összetevőit, ill. az elegyeket szétosztás előtti alaposan össze kell keverni (vortex). A pipettázás pontosságára különös figyelmet kell fordítani. Ha nem rendelkezünk kizárólagosan csak a Real-Time PCR összemérésre fenntartott laborral és pipetta sorozattal szűrős pipettahegy használata határozottan ajánlott.

13.2.3.2. A Real-Time készülék beállítása

Ez mindig az adott készüléktől és szoftvertől függ. Az I Példafeladatban az Applied Biosystems StepOne™ Plus Real-Time készüléket és a StepOne™ v.2.2.2 szoftvert használjuk.

1) Plate setup:

Rendszerint szükséges a minták pozíciójának és az alkalmazott fluoreszcens festék típusának megadása. Ha használunk hígítási sort, akkor a hígítási sor egyes tagjainak, az ismeretlen és a Kontroll mintáknak a megnevezése, a minták pozícióinak megadása a plate-en szintén szükséges. (lásd: 13.6. Ábra.)

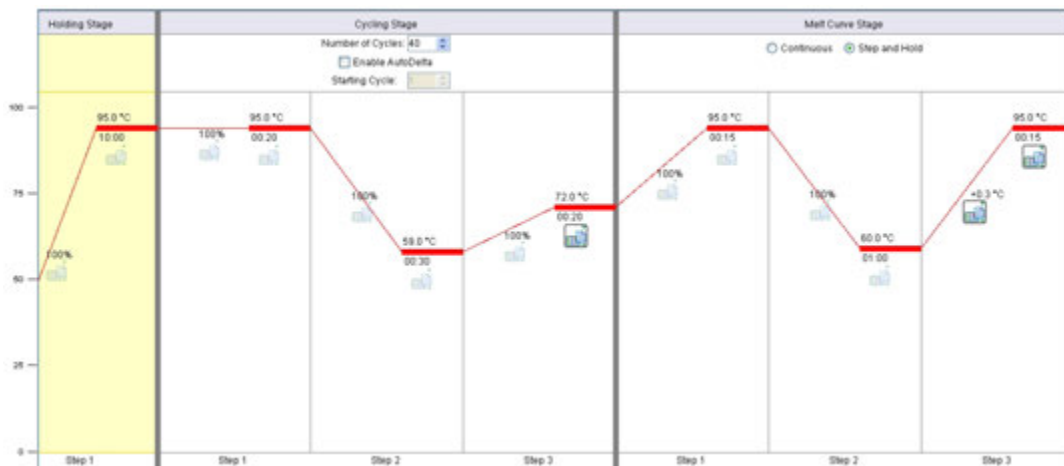


13.6. Ábra: Plate Setup A plate bal felében a GOI-re (Gus), jobb felében a Referenciára (Bzip) összeállított reakciók vannak. Az egy mintához tartozó háromszoros technikai ismétlések egymás mellett helyezkednek el (pl.: A1, A2, A3). Az S a Standard sorozat, az U az ismeretlen, N az NTC reakciókat jelölik.

2) Hőmérséklet és időprofil meghatározása:

A Hot Start Taq polimeráz aktiválásához 5-15 perc kezdeti denaturációt kell beállítani a gyártó által megadottak szerint. A ciklusos denaturáció 95°C 20 másodperc. [A primer kapcsolódását és a lánchosszabbítást gyakran egy lépésként kezelik. Ezt magas primer kapcsolódási hőmérsékletnél $T_m > 60^\circ\text{C}$ és rövid amplitkon méretnél (<150 bp) célravezető. Ilyenkor a kapcsolódási hőmérsékleten tartják a reakciót 40-60 másodpercig.]

A bemutatott példában a reakcióhoz mi külön kapcsolódási (59 °C 30 s) és lánchosszabbítási (72°C 20 s) lépést alkalmazunk. Nagyon fontos, hogy SYBR Green kémiát használva a lánchosszabbítási lépés végére állítsuk a detekciót idejét a készülékben. Ez a készüléktől függően több-kevesebb időbe telik és hozzá kell számolnunk a lánchosszabbítási lépés idejéhez. A rendszerint 40 ciklusos amplifikáció után a keletkezett amplitkonok olvadáspontjának analízise, vagyis a **disszociációs protokoll** használata javasolt. Így tudjuk ellenőrizni a reakció specifikusságát és az esetleges szennyezéseket. (lásd: 13.7. Ábra.)



13.7. Ábra. Hőmérséklet és idő profil, és disszociációs protokoll

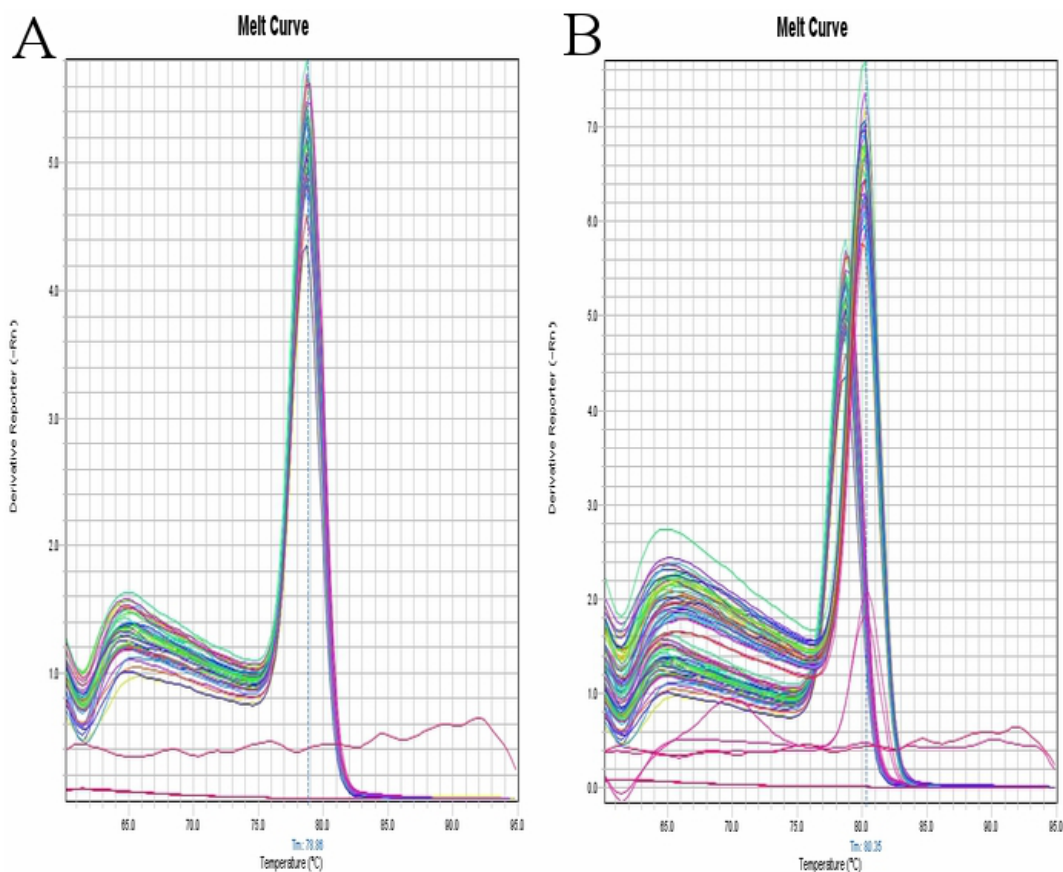
13.2.3.3. Kiértékelés

A mai modern készülékek és szoftverek a reakció futása alatt kirajzolják a plate egyes zsebeihez tartozó amplifikációs görbéket, így lehetővé teszik a reakciók valós idejű követését. A mennyiségi kiértékelés azonban csak a teljesen lezajlott reakció után, a különböző kalibrációs értékek figyelembevételével és kiértékelési beállítások megadása után

végezhető el. A reakció során a készülék minden zsebből megfelelő időközönként begyűjti a fluoreszcens adatokat, ezeket a reakció egyéb megadott paramétereivel együtt egyetlen file-ban tárolja. A kiértékeléshez ezeket az adatokat használjuk.

1) Tekintsük át, hogy minden zsebben volt-e megfelelő amplifikáció, valamint, hogy az amplifikációs görbék megfelelő lefutásúak-e. Ellenőrizzük, hogy a negatív Kontroll mutat-e amplifikációt. Ha nem, akkor rendben van, az NTC-vel nincs további teendők, ha azonban kaptunk amplifikációt akkor valamilyen szennyeződésre kell gyanakodnunk.

Ellenőrizzük a disszociációs protokoll alapján kapott olvadási görbéket. Valóban csak azt az egy terméket kaptuk, amit az *optimalizálás* során már láttunk. Ha több csúcsot kaptunk vagy a görbének válla van, az amplifikáció értelmezhetetlen, nincs további értékelésnek értelme. Ha az NTC-ben volt amplifikáció, nézzük meg, hogy az olvadáspont az amplikonunkra jellemző-e. Ha reakcióspecifikus terméket kaptunk, akkor a plate zsebeinek kereszt szennyeződése valószínűsíthető, ennek elkerülése érdekében a pipettázási technikánkat kell finomítani. Ha a termék nem reakció specifikus, akkor a reakció elegy összetevőinek egyéb külső szennyeződésére kell gyanakodnunk, ezeket ellenőrizni vagy a reakció komponenseket érdemes újakra cserélni. A 13.8B ábrán jól látható, hogy a GOI-nél a 3 NTC-ből 2-nél kaptunk specifikus amplifikációt. Ct értékük megközelítőleg 35, ami 7 ciklussal több, mint a leghígbabb kísérleti minta, vagyis a szennyeződés mértéke elenyésző, nem jelent gondot a kiértékelés során.



13.8. Ábra: Olvadási görbék: A: Referencia reakciók olvadási görbéi; B: a Referencia és GOI olvadási görbéi együtt láthatóak. A GOI-hez tartozó görbénél megfigyelhető két alacsonyabb csúcs a 3 NTC reakcióból 2-ben jelez kis mennyiségű, specifikus amplifikációt.

2) Az alapvonal beállítása

Az alapvonalat kezdeti és végső ciklusszámmal határozzuk meg. Kezdeti ciklusszámot általában 1-6-ig szokás állítani. (A mintákban lehetnek fluoreszcensen aktív fehérjék, amik az első néhány denaturációs lépésben elvesztik a fluoreszcenciájukat. Ha azt tapasztaljuk, hogy az első ciklusokban magasabb a fluoresszencia, mint a későbbiekben, akkor érdemes magasabb kezdeti ciklusszámot választani.) Az alapvonal végső ciklusszáma, mindig legyen kisebb, mint a legkorábbi görbe, legelső már szemmel láthatóan alapvonalból kiugró pontja. Vannak szoftverek melyeknél

az egyes mintákra külön is beállítható az alapvonal, de sokszor elég, ha egy adott esszéhez egy közös alapvonalat választunk. Korrekt alapvonal beállítás után szabályos, szigmoid lefutású görbéket kell kapnunk.

A példa reakcióban 1 és 16 ciklus közé állítottuk az alapvonalat, egységesen az egész plate-re. A nagy koncentrációjú mintákhoz tartozó amplifikációs görbéknél az első alapvonalból kiugró pont a 18. ciklusnál, míg az alacsony koncentrációhoz tartozó amplifikációs görbéknél a 24. ciklusnál vannak. Ezután lineáris és logaritmikus nézetben is ellenőrizzük, hogy a technikai ismétlések görbéi mennyire esnek egybe. Ha a háromszoros technikai ismétlések között találunk nagyon eltérő görbéket, azokat ki kell hagynuk a további elemzésből.

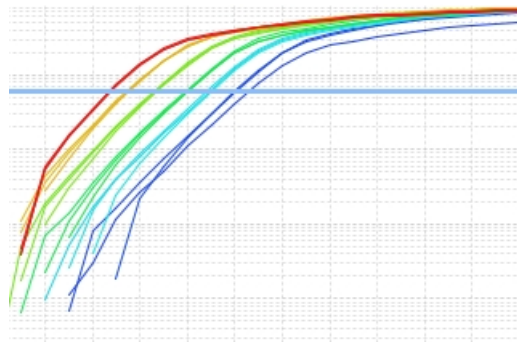
2) Küszöbérték beállítása

A küszöbértéknek minden mintánál az exponenciális fázisba kell esnie, vagyis logaritmikus nézetben a lineáris szakaszok egyértelműen párhuzamos részére illesztjük a küszöböt. A küszöbérték változtatásával megkeressük a technikai ismétlések közötti legkisebb szórás értékeket (> 0.1 Ct, kevesebb mint 10%), ez segít elkerülni, hogy a küszöbértéket az exponenciális fázison kívülre helyezzük. Ha egyes mintáknál a technikai szórás kiugróan magas, akkor valószínűleg van közöttük „hibás reakció”. Ezeket vonjuk ki a további elemzésből. (A hiba eredhet a plate zsebeinek szennyeződéséből, ha nem voltunk elég elővigyázatosak az összemérésnél. Előfordul az is, hogy a készülékbe kerül szennyeződés.)

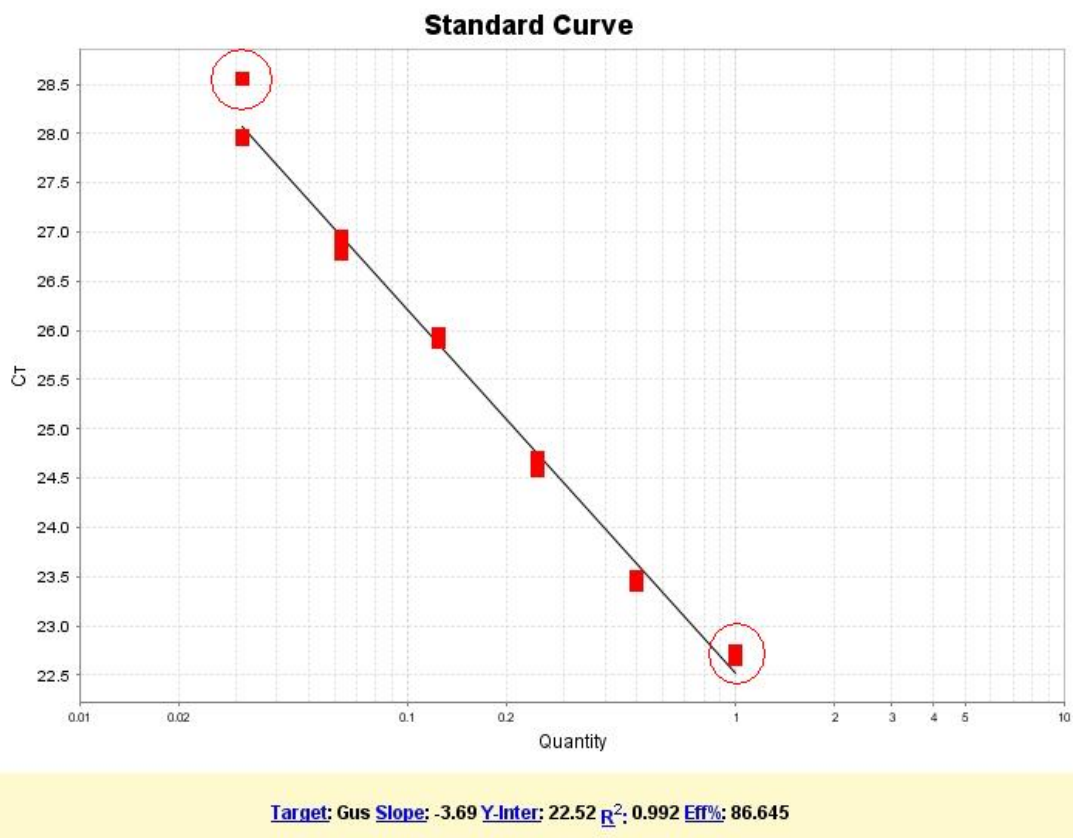
3) Mennyiségi meghatározás Standard görbe alapján

A fenti beállításokkal készítsük el a **Standard görbét**, figyelembe véve az egyenes illesztés pontosságát ($R^2 > 0,99$) és kizárva az esetlegesen kieső pontokat (lásd: 13.11. Ábra). A Standard görbe alapján megkapjuk a reakció hatékonyságát is, ami 80% és 110% között elfogadható. Az aktuális kísérleti reakció hatékonysága kis mértékben ingadozhat az optimalizálás során kapott érték körül (5%), ha attól nagyon eltérő, akkor meg kell ismételni az esszét.

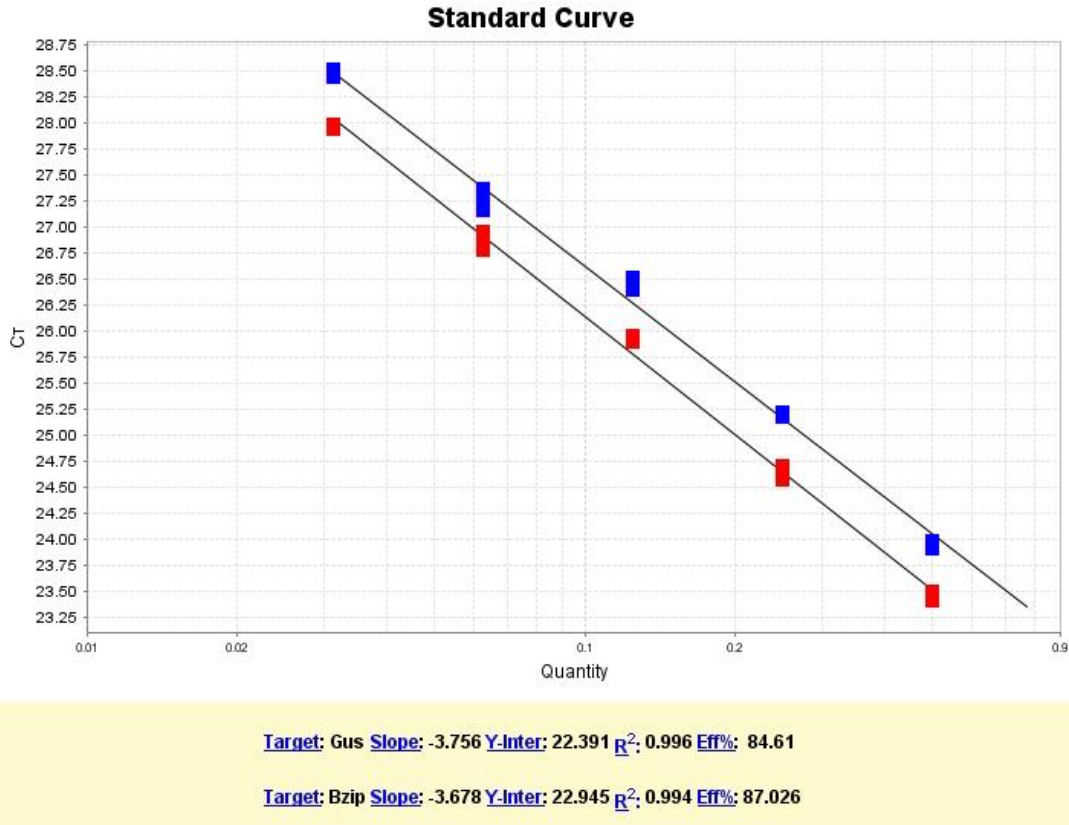
Az I. példafeladatban mind a GOI-re, mind a Referencia génre tervezett reakció esetében ki kell zárunk a legtöményebb hígítási tagot a további számításokból, mert nem illeszkedik jól a többi pont által meghatározott egyenesre. A GOI leghígabb hígítási tagjához tartozó technikai ismétlésből az egyiket szintén ki kell hagynuk, mert Ct értéke jelentősen eltér a két másik ismétléstől.



13.9. Ábra. A GOI-hez tartozó hat eltérő koncentrációjú hígítási tag (különböző színnel) amplifikációs görbéi logaritmikus nézetben. A legtöményebb minta (piros) és a leghígabb (sötétkék) minta egyik technikai ismétlése szemmel láthatóan nem követi egymást szabályosan – a Standard görbét lásd a 13.10. Ábrán.



13.10. Ábra. Standard görbe a hattagú hígítási sor alapján. Pirossal bekarikázva az egyenesre nem illeszkedő pontok láthatóak (lásd még 13.9. Ábra). Bár az egyenes illesztés pontossága ($R^2 > 0,99$) elfogadható, ezen pontok elhagyása után lényegesen javul – lásd: 13.11. Ábra.



13.11. Ábra. Standard görbék a Gus (Piros) és Bzip (Kék) reakciók alapján. A reakció hatékonyság a GOI-re 84,6% és a Referenciára 87%

A fenti beállítások után a Real-Time készülékhez tartozó szoftverek elvégzik az esszé analízisét és megkapjuk az egyes kísérleti minták Ct értékeit és a hígítási sorhoz viszonyított relatív mennyiségüket (13.3. és 13.4. táblázat). A Ct értékeknek a reakció **dinamikus tartományába** kell esnie. Ha egy minta Ct értéke a Standard sor tagjainak Ct értékein kívülre esik, azt fenntartással kell kezelnünk, vagy el kell hagynunk.

A Real-Time szoftverek biztosítják a lehetőségét, hogy adatainkat az elemzés különböző fázisaiban importáljuk MS-Excel táblázatba. Ezek lehetnek a nyers fluoreszcens adatok, az alapvonal és küszöbérték beállítás utáni Ct értékek, vagy akár a standard görbe alapján számolt relatív mennyiségek is. A nyers adatok exportálása lehetőséget ad arra, hogy különböző szoftverekkel kiegészítsük a kiértékelést. A LinReg szoftver pl. képes minden egyes reakcióra külön-külön reakcióhatékonyságot becsülni. Az egyes minták egyedi reakcióhatékonyságát azért érdemes ellenőrizni, mert ennek segítségével megtalálhatóak az esetlegesen rosszul előkészített cDNS minták, és a bemérési és/vagy detektálási hibával terhelt reakciók (lásd LinReg szoftver). Továbbá használható kiértékelésre is, ekkor az összes egyedi reakcióhatékonyságot átlagolva, hígítási sor nélkül tudunk reakcióhatékonyságot becsülni (lásd: 13.4. Ábra.). Továbbá ez alapján és a küszöbérték beállítása után a szoftver képes Ct értékeket és a kiindulási cDNS mennyiséget (N_0) is meghatározni.

13.1. – 13.4. Táblázatokban az alapvonal és küszöbérték, valamint a fentebb említett reakciók kizárása után kapott Ct értékek láthatóak. A színjelzések a további kiértékelésekhez tartozó magyarázatok könnyebb megértését hivatottak segíteni.

13.1. Táblázat. Hígítási sor a Referencia szekvenciára (Bzip)

Poz.	Hígítás	Ct	Átlag Ct	Ct SD	R.Mennyiség
B7	Minta 1 ½ ×	23,91	23,96	0,04	0,5
B8		23,98			
B9		23,99			
C7	Minta 1 ¼ ×	25,18	25,20	0,02	0,25
C8		25,20			
C9		25,22			
D7	Minta 1 1/8 ×	26,44	26,45	0,06	0,125
D8		26,40			
D9		26,52			
E7	Minta 1 1/16 ×	27,16	27,25	0,10	0,0625
E8		27,24			
E9		27,37			
F7	Minta 1 1/32 ×	28,44	28,47	0,04	0,03125
F8		28,45			
F9		28,52			

13.2. Táblázat. Hígítási sor a GOI-re (transzgén – Gus).

Poz.	Hígítás	Ct	Átlag Ct	Ct SD	R.Mennyiség
B1	Minta 1 ½ ×	23,47	23,46	0,04	0,5
B2		23,41			
B3		23,49			
C1	Minta 1 ¼ ×	24,70	24,64	0,06	0,25
C2		24,63			
C3		24,58			
D1	Minta 1 1/8 ×	25,96	25,94	0,04	0,125
D2		25,96			
D3		25,89			
E1	Minta 1 1/16 ×	26,96	26,89	0,10	0,0625
E2		26,78			
E3		26,92			
F1	Minta 1 1/32 ×	27,95	27,96	0,02	0,03125
F2		27,98			

13.3. Táblázat. A 2-10 minták Ct értékei a Referencia szekvenciára (Bzip)

Poz.	Minta	Ct	Átlag Ct	Ct SD	R.Mennyiség
G7	Minta 2	25,99			0,15
G8	Minta 2	25,99	26,08	0,15	0,15
G9	Minta 2	26,25			0,13
H7	Minta 3	23,53			0,69
H8	Minta 3	23,36	23,44	0,09	0,77
H9	Minta 3	23,43			0,74
A10	Minta 4	24,97			0,28
A11	Minta 4	25,02	25,03	0,06	0,27
A12	Minta 4	25,10			0,26
B10	Minta 5	24,24			0,44
B11	Minta 5	24,20	24,35	0,23	0,45
B12	Minta 5	24,62			0,35
C10	Minta 6	24,66			0,34
C11	Minta 6	24,90	24,82	0,14	0,29
C12	Minta 6	24,91			0,29
D10	Minta 7	24,09			0,49
D11	Minta 7	24,19	24,19	0,10	0,46
D12	Minta 7	24,29			0,43
E10	Minta 8	25,16			0,25
E11	Minta 8	25,31	25,26	0,08	0,23
E12	Minta 8	25,31			0,23
F10	Minta 9	24,62			0,35
F11	Minta 9	24,73	24,69	0,07	0,33
F12	Minta 9	24,74			0,33
G10	Minta 10	23,71			0,62
G11	Minta 10	23,77	23,78	0,07	0,60
G12	Minta 10	23,84			0,57

13.4. Táblázat. A 2-10 minták Ct értékei a GOI-re (Gus)

Poz.	Minta	Ct	Átlag Ct	Ct SD	R.Mennyiség
G1	Minta 2	25,97			0,11
G2	Minta 2	25,81	25,89	0,08	0,12
G3	Minta 2	25,88			0,12
H1	Minta 3	24,57			0,26
H2	Minta 3	24,56	24,55	0,04	0,26
H3	Minta 3	24,51			0,27
A4	Minta 4	24,54			0,27
A5	Minta 4	24,49	24,53	0,03	0,28
A6	Minta 4	24,55			0,27
B4	Minta 5	23,88			0,40
B5	Minta 5	23,95	23,93	0,04	0,39
B6	Minta 5	23,96			0,38
C4	Minta 6	25,54			0,15
C5	Minta 6	25,50	25,58	0,10	0,15
C6	Minta 6	25,69			0,13
D4	Minta 7	23,84			0,41
D5	Minta 7	23,80	23,82	0,02	0,42
D6	Minta 7	23,82			0,42
E4	Minta 8	25,88			0,12
E5	Minta 8	25,76	25,83	0,06	0,13
E6	Minta 8	25,84			0,12
F4	Minta 9	25,46			0,15
F5	Minta 9	25,42	25,45	0,03	0,16
F6	Minta 9	25,48			0,15
G4	Minta 10	24,18			0,33
G5	Minta 10	24,20	24,22	0,05	0,33
G6	Minta 10	24,27			0,32

A mintákban lévő GOI és Referencia Relatív Mennyiségét a Standard görbék egyenlete alapján számoljuk ki, és értékeik az 13.1. – 13.4. Táblázatok utolsó oszlopaiban szerepelnek. A **normalizációhoz** egy adott minta esetében a GOI mennyiségi (R.Mennyiség) értékét kell osztani a Referencia értékkel. [Normalizált GOI = GOI/Ref.] Pl: **G1/G7** (lásd **13.3. és 13.4** Táblázat.)

13.5. Táblázat.

Minta	GOI	Ref.	Normalizált GOI	Átlag	Szórás
Minta 2	0,11	0,15	0,75	0,84	0,09
Minta 2	0,12	0,15	0,83		
Minta 2	0,12	0,13	0,93		
Minta 3	0,26	0,69	0,38	0,36	0,02
Minta 3	0,26	0,77	0,34		
Minta 3	0,27	0,74	0,37		
Minta 4	0,27	0,28	0,95	0,99	0,04
Minta 4	0,28	0,27	1,01		
Minta 4	0,27	0,26	1,02		
Minta 5	0,40	0,44	0,90	0,95	0,13
Minta 5	0,39	0,45	0,85		
Minta 5	0,38	0,35	1,09		
Minta 6	0,15	0,34	0,43	0,46	0,04
Minta 6	0,15	0,29	0,51		
Minta 6	0,13	0,29	0,45		
Minta 7	0,41	0,49	0,84	0,91	0,06
Minta 7	0,42	0,46	0,92		
Minta 7	0,42	0,43	0,97		
Minta 8	0,12	0,25	0,47	0,52	0,04
Minta 8	0,13	0,23	0,56		
Minta 8	0,12	0,23	0,53		
Minta 9	0,15	0,35	0,44	0,46	0,02
Minta 9	0,16	0,33	0,48		
Minta 9	0,15	0,33	0,46		
Minta 10	0,33	0,62	0,54	0,55	0,01
Minta 10	0,33	0,60	0,55		
Minta 10	0,32	0,57	0,55		

A végső kiértékeléshez fel kell használnunk a Kalibrátor mintát, amihez a többi ismeretlen mintát viszonyítjuk. Ez esetben a Minta 1 a Kalibrátor minta, amiből a hígítási sort is készítettük. A Minta 1-ről tudjuk, hogy az *uidA* transzgenre nézve homozigóta, így ennek a mintának a relatív mennyiségét 1-nek vesszük. Ekkor a 0,5 érték képviseli a hemizigóta mintákat. Mivel tudjuk, hogy 1-et vagy 0,5-öt kaphatunk, a feladat kiértékeléséhez szükséges becslés így biztonsággal elvégezhetjük.

Az egyes mintákra mért átlageredmények alapján a Minta 2 és 3 esetében a várttól több mint 10%-ban eltérő eredményeket kaptunk, ezért a becslés nem teljesen megbízható esetükben. Az eredmények alapján a mintákról megállapítható, hogy hemizigóták (3-as, 6-os, 8-as, 9-es és 10-es minták), avagy homozigóták a transzgenre nézve (2-es, 4-es, 5-ös, 7-es minták).

4) Mennyiségi meghatározás a ΔCt módszerrel

A GOI és Referencia reakciók paraméterei miatt a módszer nem teljesen korrekten alkalmazható ennek az esszének az elemzéséhez, mert a reakciók hatékonysága viszonylag alacsony. Mivel azonban a hatékonyságok kevéssé térnek el egymástól, a kis Ct különbségek lehetővé teszik, hogy durva becslésre használjuk.

Ha $\Delta Ct = Ct_{\text{Referencia}} - Ct_{\text{GOI}} \rightarrow 2^{\Delta Ct} = \text{GOI/Referencia}$ (vagy: ha $\Delta Ct = Ct_{\text{GOI}} - Ct_{\text{Referencia}} \rightarrow 2^{-\Delta Ct} = \text{GOI/Referencia}$)

13.6. Táblázat.

Minta	Ct Ref.	Ct GOI	ΔCt	Relatív mennyiség: $2^{\Delta Ct}$	Átlag	Szórás
Minta 1	23,91	23,47	0,44	1,36	1,42	0,06
Minta 1	23,98	23,41	0,57	1,48		
Minta 1	23,99	23,49	0,50	1,41		
Minta 2	25,99	25,97	0,02	1,01	1,15	0,14
Minta 2	25,99	25,81	0,18	1,14		
Minta 2	26,25	25,88	0,37	1,29		
Minta 3	23,53	24,57	-1,04	0,49	0,46	0,03
Minta 3	23,36	24,56	-1,21	0,43		
Minta 3	23,43	24,51	-1,08	0,47		
Minta 4	24,97	24,54	0,42	1,34	1,41	0,06
Minta 4	25,02	24,49	0,53	1,44		
Minta 4	25,10	24,55	0,54	1,46		
Minta 5	24,24	23,88	0,36	1,28	1,35	0,20
Minta 5	24,20	23,95	0,26	1,20		
Minta 5	24,62	23,96	0,66	1,58		
Minta 6	24,66	25,54	-0,88	0,54	0,60	0,06
Minta 6	24,90	25,50	-0,60	0,66		
Minta 6	24,91	25,69	-0,78	0,58		
Minta 7	24,09	23,84	0,24	1,18	1,29	0,10
Minta 7	24,19	23,80	0,39	1,31		
Minta 7	24,29	23,82	0,47	1,39		
Minta 8	25,16	25,88	-0,72	0,61	0,68	0,06
Minta 8	25,31	25,76	-0,45	0,73		
Minta 8	25,31	25,84	-0,53	0,69		
Minta 9	24,62	25,46	-0,84	0,56	0,59	0,03
Minta 9	24,73	25,42	-0,70	0,62		
Minta 9	24,74	25,48	-0,74	0,60		
Minta 10	23,71	24,18	-0,47	0,72	0,74	0,01
Minta 10	23,77	24,20	-0,43	0,74		
Minta 10	23,84	24,27	-0,43	0,74		

Ennél a kiértékelésnél azt kapjuk meg, hogy egy mintán belül mennyi a GOI mennyisége a Referencia mennyiségéhez képest. A mi esetünkben a Referencia (Bzip) egy homozigóta gén, vagyis mennyiségét 1-nek véve a homozigóta mintáknál is 1-et kell kapjunk, míg 0,5-öt a hemizigóta minták esetében. A Minta 1 homozigóta a GOI-re, így elméletileg ennél a mintánál közel azonos Ct-t kellett volna kapnunk a GOI-re és a Referenciára. Azonban kb. fél ciklus eltérést tapasztaltunk minden hígításnál a Referencia javára, amely eltérés valószínűleg a két reakció eltérő hatékonyságából ered. A fél ciklus eltérést és azt figyelembe véve, hogy így következetesen túlbecsüljük a relatív mennyiségeket, ebben a kísérletben még így is használható a homo és hemizigóták megkülönböztetésére. Végeredményként az Standard görbe módszerrel megegyező eredményeket kapunk: a 3-as, 6-os, 8-as, 9-es és 10-es minták hemizigóták, a 2-es, 4-es, 5-ös, 7-es minták a homozigóták a transzgenre nézve.

A Referencia és GOI közötti nagyobb Ct eltérések esetén az eredmények torzulása miatt az esszé nem lenne értékelhető. Így ezeknél az amplitudonoknál a kétszeresnél sokkal nagyobb különbségek kimutatására ez a módszer nem lenne alkalmazható.

5) Értékelés $\Delta \Delta Ct$ módszerrel

A GOI és Referencia reakciók paraméterei miatt a módszer nem teljesen korrekten alkalmazható ennek az esszének az elemzéséhez, a reakciók viszonylag alacsony hatékonysága miatt. Mivel azonban a hatékonyságok kevéssé térnek el egymástól, a kis Ct különbségek lehetővé teszik a $\Delta \Delta Ct$ módszer használatát anélkül, hogy az eredmények érzékelhetően torzulanak. (lásd: $\Delta \Delta Ct$ módszer). Az egyszerűség kedvéért induljunk ki az előző ΔCt kiértékelésből (13.6. Táblázat). Emeljük ki a Minta 1-et, mint Kalibrátor mintát: A ΔCt módszerrel átlag 1,42 relatív GOI mennyiséget kaptunk. Minden az adott mintához tartozó relatív GOI mennyiséget, osszunk el ezzel az értékkel pl.: [Minta 2 GOI/Ref = 1,01 (kék)] / [Minta 1 Átlag = 1,42 (piros)] = [Minta 2 $2^{\Delta \Delta Ct}$ = 0,71 (zöld)]. (Ez hasonló a Standard görbe módszer utolsó lépéséhez, ahol a normalizált GOI mennyiségeket viszonyítottuk a Kalibrátor minta mennyiségéhez, [ami ott 1 volt, itt 1,42].)

13.7. Táblázat.

Minta	$2^{\Delta\Delta Ct}$	Átlag	Szórás
Minta 2	0,71	0,81	0,10
Minta 2	0,80		
Minta 2	0,91		
Minta 3	0,34	0,33	0,02
Minta 3	0,31		
Minta 3	0,34		
Minta 4	0,95	1,00	0,05
Minta 4	1,02		
Minta 4	1,03		
Minta 5	0,91	0,95	0,14
Minta 5	0,85		
Minta 5	1,11		
Minta 6	0,38	0,42	0,04
Minta 6	0,47		
Minta 6	0,41		
Minta 7	0,84	0,91	0,07
Minta 7	0,93		
Minta 7	0,98		
Minta 8	0,43	0,48	0,04
Minta 8	0,52		
Minta 8	0,49		
Minta 9	0,40	0,42	0,02
Minta 9	0,44		
Minta 9	0,42		
Minta 10	0,51	0,52	0,01
Minta 10	0,52		
Minta 10	0,53		

Ez a módszer ugyancsak becslésre használható, de az eredményekből is látszik, hogy jóval pontosabb, mint a ΔCt önmagában. A relatív GOI mennyiségekre kapott értékek nem térnek el jelentősen attól, amit a Standard görbe módszerrel kaptunk. Ez alapján a további kísérletekben nem lenne szükség Standard görbére, elég lenne a Kalibrátor minta az egyes újabb esszék kiértékeléséhez. Az egyes esszék közötti esetleges reakció hatékonyságbeli eltéréseket is figyelembe tudnánk venni a Kalibrátor minta segítségével.

Megjegyzendő ennél a kiértékelésnél is, hogy nagyobb Ct különbségek esetén a reakciók viszonylag alacsony hatékonysága miatt az eredmények megbízhatatlanná válnának.

6) Értékelés Paffl módszerrel

A reakcióhatékonyságok ismeretét feltételezi.

A $\Delta \Delta Ct$ logikáját (először normalizáció, majd Kalibrátor mintához viszonyítás) megfordítva, felhasználhatjuk a reakciók hatékonyságát is a számolás során: Először minden mintát a Kalibrátor mintához viszonyítunk, majd az így kapott relatív mennyiségeket normalizáljuk.

$$\Delta Ct_{GOI} : [Ct_{Minta\ 1\ Gus} - Ct_{Minta\ X\ Gus}] \text{ pl. } B1,2,3 - G1$$

$$E_{GOI} : 1,846$$

$$\Delta Ct_{Ref.} : [Ct_{Minta\ 1\ Bzip} - Ct_{Minta\ X\ Bzip}] \text{ pl. } B7,8,9 - G7$$

$$E_{Ref.} : 1,870$$

(Lásd: 13.2. és 13.4. (kék) 13.1. és 13.3. (zöld) majd 13.8. Táblázatok)

13.8. Táblázat.

Minta	ΔCt_{GOI}	$E_{GOI}^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct_{Ref.}$	$E_{Ref.}^{\Delta Ct}$	GOI/Ref.	Átlag	Szórás
Minta 2	2,51	0,21	2,03	0,28	0,76	0,85	0,09
Minta 2	-2,35	0,24	-2,03	0,28	0,85		
Minta 2	-2,42	0,23	-2,28	0,24	0,95		
Minta 3	-1,11	0,51	0,43	1,31	0,39	0,37	0,02
Minta 3	-1,10	0,51	0,61	1,46	0,35		
Minta 3	-1,05	0,53	0,53	1,39	0,38		
Minta 4	-1,08	0,51	-1,01	0,53	0,97	1,01	0,04
Minta 4	-1,03	0,53	-1,06	0,52	1,03		
Minta 4	-1,09	0,51	-1,13	0,49	1,04		
Minta 5	-0,42	0,77	-0,28	0,84	0,92	0,96	0,13
Minta 5	-0,48	0,74	-0,24	0,86	0,87		
Minta 5	-0,50	0,74	-0,65	0,66	1,11		
Minta 6	-2,08	0,28	-0,70	0,65	0,43	0,47	0,04
Minta 6	-2,04	0,29	-0,94	0,55	0,52		
Minta 6	-2,23	0,25	-0,95	0,55	0,46		
Minta 7	-0,38	0,79	-0,12	0,93	0,86	0,93	0,07
Minta 7	-0,34	0,81	-0,23	0,87	0,94		
Minta 7	-0,36	0,80	-0,33	0,81	0,99		
Minta 8	-2,42	0,23	-1,20	0,47	0,48	0,53	0,04
Minta 8	-2,30	0,24	-1,35	0,43	0,57		
Minta 8	-2,38	0,23	-1,34	0,43	0,54		
Minta 9	-2,00	0,29	-0,66	0,66	0,44	0,47	0,02
Minta 9	-1,96	0,30	-0,76	0,62	0,48		
Minta 9	-2,02	0,29	-0,78	0,61	0,47		
Minta 10	-0,72	0,64	0,25	1,17	0,55	0,56	0,01
Minta 10	-0,74	0,63	0,19	1,13	0,56		
Minta 10	-0,81	0,61	0,12	1,08	0,57		

Mivel a hatékonyságok a GOI és Referencia reakciónál minimálisan tértek el, valamint kis Ct különbségekkel kellett számolnunk, az eredmények nem térnek el lényegesen attól, amit a $\Delta \Delta Ct$ módszerrel kapunk.

Bár a különböző kiértékelési módszerekkel nagyon hasonló eredményeket kapunk, a reakciók paraméterei miatt (alacsony hatékonyság) a **Standard görbe** és a **Pfaffl** módszert lehetne fenntartások nélkül használni.

13.2.4. II. Példafeladat

Génexpresszió mérése relatív mennyiségi meghatározással

A génexpressziós vizsgálatok a GOI transzkripciók aktivitásának kimutatására szolgálnak. Tulajdonképpen a GOI-ről átíródó mRNS-ek mennyiségét határozzuk meg Real-Time PCR módszerrel. Ehhez szükség van a minták összes mRNS-ének kinyerésére. A PCR reakcióhoz ezekről ún. kópia vagy cDNS-t készítünk, mivel PCR templéntként csak DNS molekulák alkalmasak.

A II. példában egy a fotoszintetikus apparátus felépítésében részt vevő antennafehérje génjének, az *Lhcb5* génnek transzkripcióját vizsgáltuk Cd-stressz hatása alatt. A fotoszintetikus apparátus antenna fehérjéinek nemcsak a fénygyűjtésben, hanem a változó környezeti körülményekhez való alkalmazkodásban, ebből eredően a stressz alatt kialakuló növényi válaszban is igen fontos szerepük van. Vizsgálati modellnövényünk a nyárfa (*Populus sp*) nemzetségbe tartozik, a nemzetség több fajának genomi és mRNS szekvenciája hozzáférhető különböző adatbázisokban. A Real-Time PCR reakciók tervezését megkönnyíti, hogy az Lhc-család fehérjéinek genetikai kódját a sejtmag és nem a kloroplasztisz tartalmazza. A fotoszisztéma II kapcsoló antennáját alkotó *Lhcb5* transzkripciójának analízise egy a teljes Lhc fehérje család génexpresszió szintjét vizsgáló kísérletsorozatból kiragadott példa.

Összesen 5 kezelt és 5 kezeletlen mintában határozzuk meg az *Lhcb5* (GOI) relatív expresszióját. Eltérő számozás különbözteti meg a kezelés kezdetén már kifejtett, alsó (-2) és a kezelés alatt fejlődő, felső (+2) leveleket. Az alsó (-2) levelek esetében a kezelés kezdetétől számított 2. és 7. napon vettünk mintát mind a Kontroll, mind a Cd-kezelt növényekből. A kezelés megkezdését követően fejlődött, felső (+2) levelekből három időpontban vettünk mintát, a kezelés kezdetétől eltelt 4., 7. és 14. napon. A levélmintákból mRNS-t tisztítottunk, majd átírtuk cDNS-re.

Példa a minták elnevezésére: 7n Ko-2 = hétnapos Kontroll, alsó levél

7n Cd+2 = hétnapos Cd-kezelt, felső levél

A relatív mennyiségi meghatározás alapját Standard görbe segítségével végezzük. Kiválasztottunk a Kontroll minták közül egy Kalibrátort, amely mintából hígítás sorozatot készítettünk: 100×, 200×, 400×, 800×, 1600× és 3200× hígításokkal.

Két eltérő **normalizációt** hasonlítottunk össze a mérés során. Egy elő kísérlet során **validálást** végeztünk 6 különböző, belső Referenciaként használatos **house-keeping génre**. Real-Time reakcióban megmértük transzkripciójukat a kísérleti mintákban, majd a geNorm szoftver segítségével megállapítottuk transzkripciós stabilitásukat a minták között. Ezután kiválasztottunk 3 belső Referencia gént, név szerint az elongációs faktor- α (efl- α), protein-phosphatase-2a (pp2a) és az ubiquitin-conjugating enzime 10 (ubc10) génjét, amelyek kifejeződésének geometriai átlagát, mint normalizációs faktort, használtuk a GOI transzkripciójának mérésére (13.9. táblázat).

Másik normalizációs módszerünk a kísérleti mintákból kinyert összes cDNS mennyiségének meghatározásán alapul. Ehhez a méréshez az egyszálú RNS-hez, valamint cDNS-hez kötődő fluoreszcens **RiboGreen** festéket használtuk. Előzetesen optimalizált körülmények között a festékmolekulák mennyisége egyenesen arányos a nukleinsav mennyiséggel. A minták normalizálásához a RiboGreen fluoreszcencia hozamát használtuk faktorként (13.9. táblázat).

13.9. Táblázat.

Minta	Ef-1 alfa	pp2a	ubc10	Normalizációs Factor	RiboGreen	SD RBG
2n Ko-2	1,72E-05	3,26E-06	6,98E-06	0,8795	5,09E+07	1,04E+06
2n Cd-2	1,24E-05	2,36E-06	5,23E-06	0,6433	3,55E+07	1,71E+06
7n Ko-2	1,47E-05	2,65E-06	6,59E-06	0,7645	4,48E+07	1,04E+06
7n Cd-2	1,50E-05	2,72E-06	7,49E-06	0,8098	4,11E+07	9,68E+05
4n Ko+2	3,92E-05	4,31E-06	1,23E-05	1,5317	7,68E+07	5,51E+06
4n Cd+2	1,37E-05	1,74E-06	6,89E-06	0,6579	5,49E+07	4,97E+05
7n Ko+2	3,60E-05	6,07E-06	1,41E-05	1,7494	8,03E+07	1,80E+06
7n Cd+2	3,52E-05	6,61E-06	2,47E-05	2,1519	6,31E+07	3,94E+06
14n Ko+2	1,05E-05	1,66E-06	5,41E-06	0,5468	3,34E+07	9,03E+05
14n Cd+2	2,23E-05	4,69E-06	1,44E-05	1,3764	5,18E+07	2,97E+06

13.2.4.1. Az esszé összemérése

Egy reakcióra számolva az összetevők:

12,5 μ l MM

2,5 μ l Forward és Reverse Primer keverék

7,5 μ l H₂O

2,5 μ l Templát

Σ 25 μ l végtérfogat

1) Az I. példafeladatban bemutatott vegyszerekkel és módszerrel mérjük össze a reakciót a *Lhcb5* cDNS-re specifikus primerpárral (primer végkoncentrációja a reakcióban 1 μ M primerenként). A Super Mix tartalmazza a Master Mix-et, a GOI-re specifikus primerpárt és vizet, de a templát cDNS-t nem. Összesen 51 reakcióra számolunk,

6 tagú standard sor, 10 minta és az NTC, 3-szoros technikai ismétlésben:

17X3 = 51 (+10% = 56)

10 % ráméréssel számolva, a következő mennyiségeket mérjük össze.

Super Mix: 51 \times 1,1=56

$12,5 \times 56 = 700 \mu\text{l}$ MM

$2,5 \times 56 = 140 \mu\text{l}$ Primer

$7,5 \times 56 = 420 \mu\text{l}$ H₂O

2) 0,5 ml-es Eppendorf csövekbe szétosztunk a 10 ismeretlen mintából és a hígítási sor 6 tagjából 8-8 μl templát cDNS-t. A negatív Kontrollhoz egy csöbe 8 μl steril desztillált vizet mérünk be.

3) A SM-ből 72 μl -t mérünk minden egyes előkészített mintához, így összesen 80 μl reakcióelegyet kapunk. Ez a 80 μl felel meg az egy mintához tartozó három technikai ismétlés összegének, 5 μl ráéréssel számolva.

4) Utolsó lépésünk a Real-Time PCR-hez gyártott speciális plate-re való szétosztás. A plate minden egyes zsebébe 25 μl -enként bemérjük a 3-3 technikai ismétlésnek megfelelő végtérfogatot. A reakció szétosztása után a plate-t optikai fóliával lezárjuk, majd röviden centrifugáljuk (3000 rpm, 3 min).

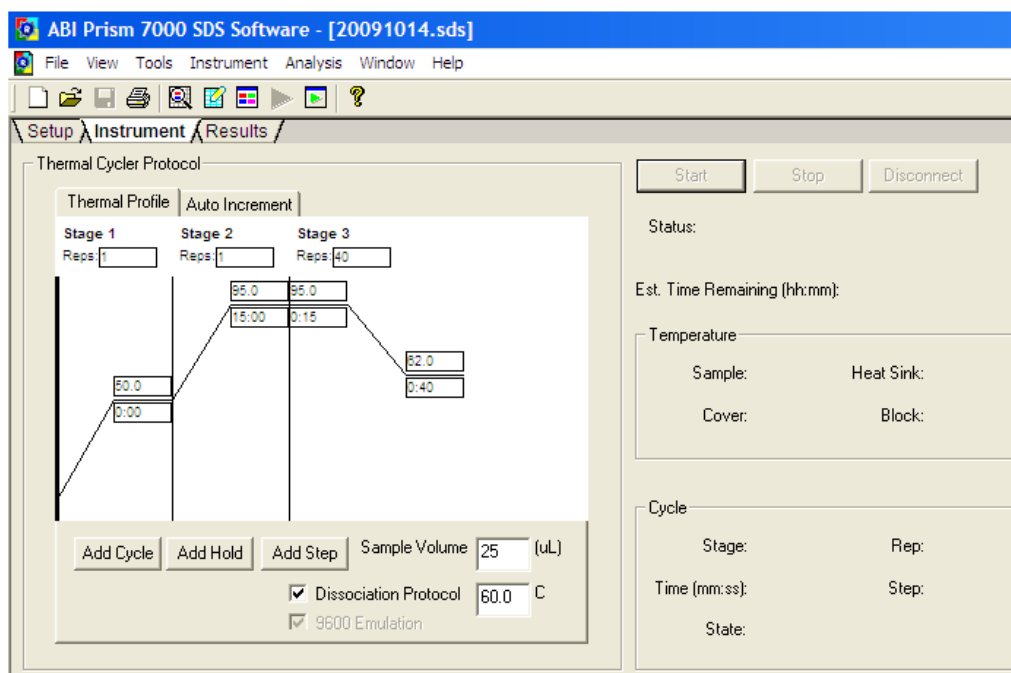
Megjegyzés: A reakcióanyag összetevőit, ill. az elegyeket szétosztás előtti alaposan össze kell keverni (vortex). A pipettázás pontosságára különös figyelmet kell fordítani. Ha nem rendelkezünk kizárólagosan csak a Real-Time PCR összemérésre fenntartott laborral és pipetta sorozattal, a szűrős pipettahegy használat határozottan ajánlott.

13.2.4.2. A Real-Time készülék beállítása

Ehhez a Real-Time reakcióhoz az Applied Biosystem ABI Prism 7000 Real-Time készüléket és az ABI Prism 7000 SDS szoftvert használtuk.

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				2n Ko-2 U	2n Ko-2 U	2n Ko-2 U						
B	7n Ko-2 100x S 1.00e-002	7n Ko-2 100x S 1.00e-002	7n Ko-2 100x S 1.00e-002	2n Cd-2 U	2n Cd-2 U	2n Cd-2 U	7n Cd+2 U	7n Cd+2 U	7n Cd+2 U			
C	7n Ko-2 200x S 5.00e-003	7n Ko-2 200x S 5.00e-003	7n Ko-2 200x S 5.00e-003	7n Ko-2 U	7n Ko-2 U	7n Ko-2 U	14n Ko+2 U	14n Ko+2 U	14n Ko+2 U			
D	7n Ko-2 400x S 2.50e-003	7n Ko-2 400x S 2.50e-003	7n Ko-2 400x S 2.50e-003	7n Cd-2 U	7n Cd-2 U	7n Cd-2 U	14Cd+2 U	14Cd+2 U	14Cd+2 U			
E	7n Ko-2 800x S 1.25e-003	7n Ko-2 800x S 1.25e-003	7n Ko-2 800x S 1.25e-003	4n Ko+2 U	4n Ko+2 U	4n Ko+2 U						
F	7n Ko-2 1600x S 6.25e-004	7n Ko-2 1600x S 6.25e-004	7n Ko-2 1600x S 6.25e-004	4n Cd+2 U	4n Cd+2 U	4n Cd+2 U						
G	7n Ko-2 3200x S 3.12e-004	7n Ko-2 3200x S 3.12e-004	7n Ko-2 3200x S 3.12e-004	7n Ko+2 U	7n Ko+2 U	7n Ko+2 U						
H				viz N	viz N	viz N						

13.12. Ábra. Plate setup Mintánként a háromszoros technikai ismétlések egymás mellett helyezkednek el (pl. B1, B2, B3 a 7n Ko-2 minta 100-szoros hígítását tartalmazza). S jelöli a Standard sorozat tagjait, U (unknown) az ismeretlen mintákat, N pedig a templát nélküli NTC reakciókat.

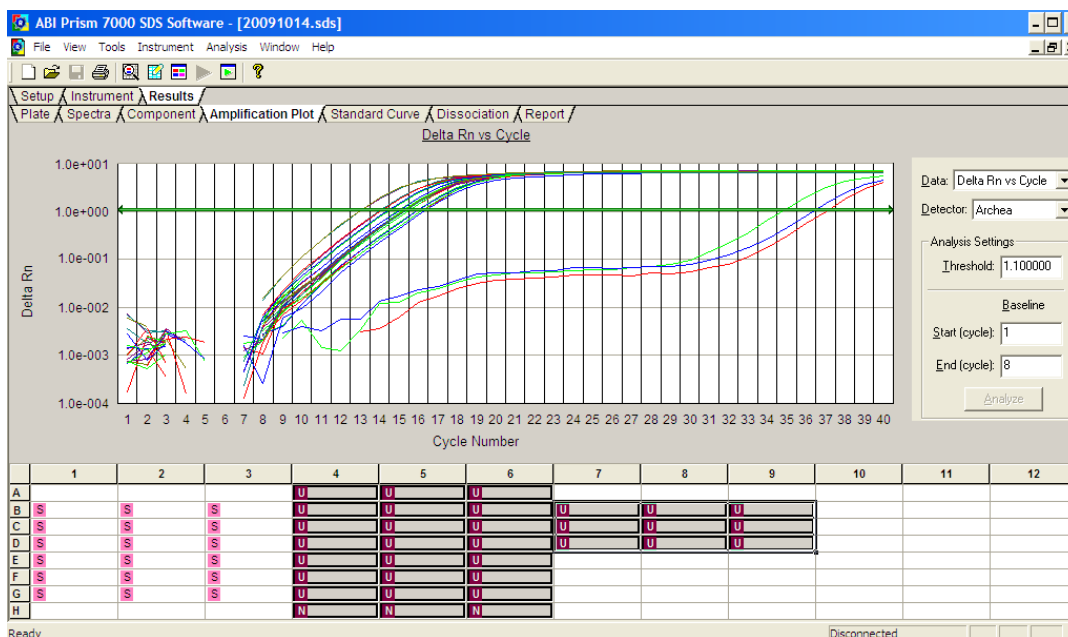


13.13. Ábra. Hőmérséklet és időprofil meghatározása A PCR reakció során a kapcsolási és lánchosszabbítási lépést egybevettük: 62°C 40 másodperc. A program többi része az I példában bemutatott protokollnak felel meg.

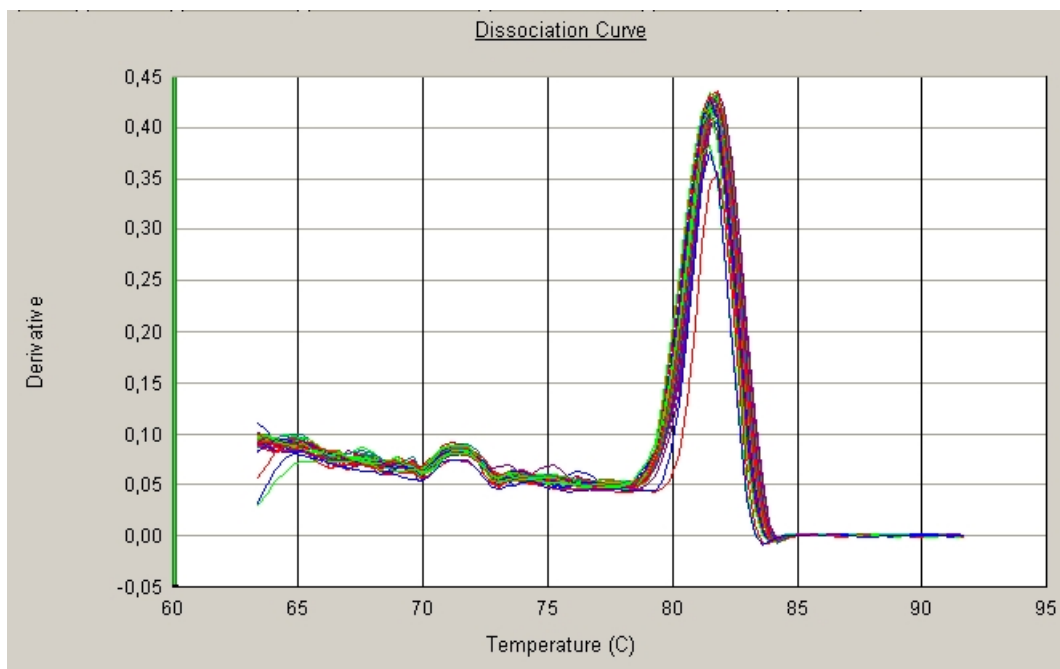
13.2.4.3. Kiértékelés

Az I. példafeladat lépéseit követve végezzük a szoftveres kiértékelést:

- 1) Tekintsük át, hogy minden zsebben volt-e megfelelő amplifikáció, valamint, hogy az amplifikációs görbék megfelelő lefutásúak-e minden mintánál (13.14. ábra). Ellenőrizzük, hogy a negatív Kontroll mintákban kaptunk-e amplifikációt. Ellenőrizzük a disszociációs protokoll alapján kapott olvadási görbéket (13.15. ábra)



13.14. Ábra. A kísérleti és az NTC mintákhoz tartozó amplifikációs görbék logaritmusikus nézetben.



13.15. Ábra. Az összes mintában található amplikonok olvadási görbéi.

- 2) Az alapvonal beállítása
- 3) Küszöbérték beállítása
- 4) Mennyiségi meghatározás Standard görbe alapján

A hígítási sor alapján a Standard görbe és paraméterei az Lhcb5 GOI-re. ($m=-3.597234$, a hatékonyság ez alapján: 89.7%)

13.10. Táblázat. Az ABI Prism 700 SDS szoftterrel kiértékelt reakció. Ct értékek és a Standard görbe alapján számolt relatív *Lhcb5* GOI mennyisége a 10 kísérleti mintában. (Alapvonal:1-8 ciklus. Küszöbérték: 1.1)

Poz.	Minta	Ct	Átlag Ct	Szórás (Ct)	Relatív Mennyiség	R. Átlag Mennyiség	Szórás (R.A.M)
A4	2n Ko-2	15,49	15,46	0,020	4,05E-03	4,12E-03	6,32E-05
A5	2n Ko-2	15,45			4,16E-03		
A6	2n Ko-2	15,45			4,16E-03		
B4	2n Cd-2	15,87	15,88	0,014	3,14E-03	3,11E-03	3,17E-05
B5	2n Cd-2	15,90			3,08E-03		
B6	2n Cd-2	15,88			3,12E-03		
C4	7n Ko-2	15,61	15,57	0,048	3,74E-03	3,85E-03	1,32E-04
C5	7n Ko-2	15,58			3,81E-03		
C6	7n Ko-2	15,51			3,99E-03		
D4	7n Cd-2	15,92	15,88	0,038	3,04E-03	3,13E-03	8,40E-05
D5	7n Cd-2	15,87			3,14E-03		
D6	7n Cd-2	15,84			3,20E-03		
E4	4n Ko+2	14,27	14,27	0,023	9,13E-03	9,13E-03	1,22E-04
E5	4n Ko+2	14,25			9,25E-03		
E6	4n Ko+2	14,29			9,01E-03		
F4	4n Cd+2	15,62	15,58	0,032	3,71E-03	3,80E-03	8,11E-05
F5	4n Cd+2	15,57			3,84E-03		
F6	4n Cd+2	15,56			3,86E-03		
G4	7n Ko+2	13,01	12,97	0,111	2,12E-02	2,17E-02	8,92E-04
G5	7n Ko+2	13,00			2,13E-02		
G6	7n Ko+2	12,90			2,28E-02		
B7	7n Cd+2	17,71	17,65	0,060	9,21E-04	9,62E-04	7,18E-05
B8	7n Cd+2	17,71			9,21E-04		
B9	7n Cd+2	17,52			1,04E-03		
C7	14n Ko+2	15,45	15,47	0,022	4,16E-03	4,12E-03	5,82E-05
C8	14n Ko+2	15,48			4,07E-03		
D7	14Cd+2	17,78	17,74	0,064	8,79E-04	9,05E-04	4,07E-05
D8	14Cd+2	17,66			9,52E-04		
D9	14Cd+2	17,77			8,84E-04		

Normalizáció belső Referencia génekkel

Az egyes mintákban lévő cDNS-ek mennyiségét a Kalibrátorként szolgáló mintához képest meghatároztuk. Tehát a kísérletes mintáink egymás között összehasonlíthatóvá váltak. Szükség van viszont a bemért cDNS mennyiségének korrigálására, vagyis a normalizációra. Ehhez a kísérleti mintákban stabilan kifejeződő 3 belső Referencia gén transzkripció szintjéből számolt normalizációs faktort használjuk. Az egyes mintákban mért *Lhcb5* mRNS mennyiséget osztjuk a normalizációs faktoral, ezzel egyforma mennyiségű bemért mRNS-re (cDNS-re) normalizáljuk a reakciót.

13.11. Táblázat. Az *Lhcb5* belső Referencia génekre normalizált relatív mennyisége

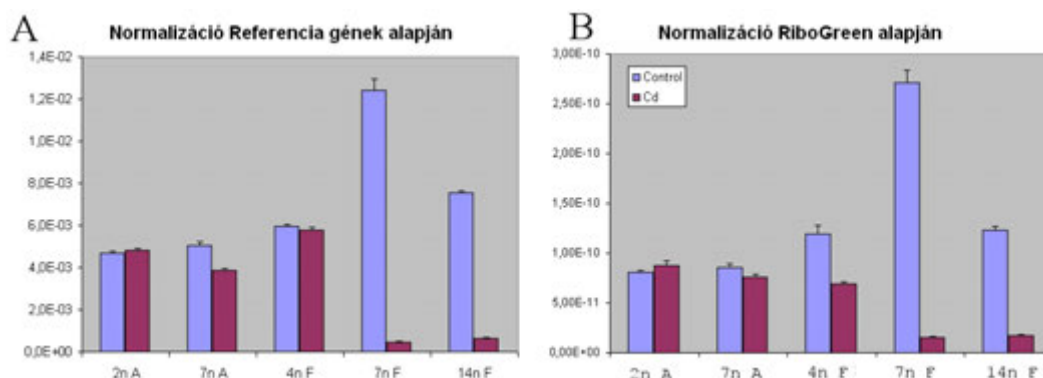
Minta	Normalizációs Factor	<i>Lhcb5</i> Relatív Átlag Mennyiség	Szórás (R.A.M)	Normalizált <i>Lhcb5</i> mRNS	Szórás (Norm. <i>Lhcb5</i>)
2n Ko-2	0,8795	4,12E-03	6,32E-05	4,68E-03	7,18E-05
2n Cd-2	0,6433	3,11E-03	3,17E-05	4,84E-03	4,92E-05
7n Ko-2	0,7645	3,85E-03	1,32E-04	5,03E-03	1,73E-04
7n Cd-2	0,8098	3,13E-03	8,40E-05	3,86E-03	1,04E-04
4n Ko+2	1,5317	9,13E-03	1,22E-04	5,96E-03	7,95E-05
4n Cd+2	0,6579	3,80E-03	8,11E-05	5,78E-03	1,23E-04
7n Ko+2	1,7494	2,17E-02	8,92E-04	1,24E-02	5,10E-04
7n Cd+2	2,1519	9,62E-04	7,18E-05	4,47E-04	3,34E-05
14n Ko+2	0,5468	4,12E-03	5,82E-05	7,53E-03	1,06E-04
14n Cd+2	1,3764	9,05E-04	4,07E-05	6,57E-04	2,96E-05

Normalizáció RiboGreen módszerrel

Az előző módszerhez hasonlóan járunk el a relatív mennyiségek meghatározásában. Ebben az esetben azonban normalizációs faktorként a RiboGreen fluoreszcenciáját használjuk az egyes mintákban és ezzel osztjuk a korábban a standard görbe alapján kapott relatív mRNS mennyiségeket.

13.12. Táblázat. Az *Lhcb5* mRNS szintjének RiboGreen módszerrel normalizált relatív mennyiségei a 10 kísérleti mintában.

Minta	Ribo-Green	Szórás (RBG)	Relatív Átlag Mennyiség	Szórás (R.Á.M)	Normalizált <i>Lhcb5</i> mRNS	Szórás (Norm. <i>Lhcb5</i>)
2n Ko-2	5,09E+07	1,04E+06	4,12E-03	6,32E-05	8,10E-11	2,07E-12
2n Cd-2	3,55E+07	1,71E+06	3,11E-03	3,17E-05	8,78E-11	4,34E-12
7n Ko-2	4,48E+07	1,04E+06	3,85E-03	1,32E-04	8,59E-11	3,57E-12
7n Cd-2	4,11E+07	9,68E+05	3,13E-03	8,40E-05	7,61E-11	2,72E-12
4n Ko+2	7,68E+07	5,51E+06	9,13E-03	1,22E-04	1,19E-10	8,69E-12
4n Cd+2	5,49E+07	4,97E+05	3,80E-03	8,11E-05	6,93E-11	1,60E-12
7n Ko+2	8,03E+07	1,80E+06	2,17E-02	8,92E-04	2,71E-10	1,27E-11
7n Cd+2	6,31E+07	3,94E+06	9,62E-04	7,18E-05	1,52E-11	1,48E-12
14n Ko+2	3,34E+07	9,03E+05	4,12E-03	5,82E-05	1,23E-10	3,76E-12
14n Cd+2	5,18E+07	2,97E+06	9,05E-04	4,07E-05	1,75E-11	1,27E-12



13.16. Ábra. Az *Lhcb5* normalizált relatív mennyiségei a belső Referencia génekhez (A), valamint az összes bemért cDNS-hez viszonyítva (B).

Láthatjuk, hogy az *Lhcb5* gén kifejeződése a különböző fejlettségű Kontroll levelekben is eltérő volt. A Cd-stressz hatására lényegesen lecsökkent az mRNS mennyisége a 7 és 14 napos felső levelekben. A kétféle normalizáció kissé eltérő transzkripció mintázatot mutat. A 4 napos fejlődő levelekben ugyanis a Referencia génekhez viszonyítva nem változik a transzkripció Cd hatására, ha viszont az összes mRNS mennyiségéhez viszonyítjuk, csökkenést tapasztalunk. Az eltérés oka a belső Referencia gének kifejeződésének ingadozásában keresendő.

Fontos következtetésként vonhatjuk le, hogy eredményeink értelmezése szempontjából alapvető jelentőségű az értékeléshez választott normalizációs módszer.

14. fejezet - Detergensek

szerző: Dr. Nyitrai Péter

A detergensek (tenzidek, felületaktív vegyületek) szolubilis, amfipatikus vegyületek. Kettős karakterük abból adódik, hogy a molekuláik egyik része hidrofób (apoláros), másik része hidrofil (poláros) karakterű.

14.1 A detergensek osztályozása

A detergenseket általában az alábbi tulajdonságaik szerint osztályozzák:

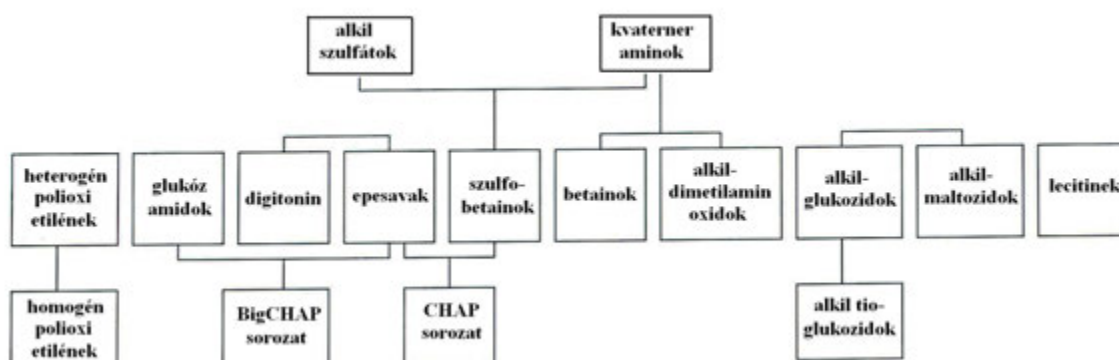
a hidrofil rész (fejcsoport) töltése és/vagy kémiai természete

a hidrofób rész kémiai természete

A fejcsoport lehet anionos, ikerionos, kationos és töltés nélküli. Az anionos detergensek negatív fejcsoportjai általában karboxil-, szulfát- vagy szulfonát-csoportot tartalmaznak és rendszerint alkáli fémek ionjai kísérik (Na^+ , K^+), mint pl. az alkilszulfátok (SDS – sodium dodecyl sulfáta). Az ikerionos detergensek fejcsoportjaiban mind a két töltés megtalálható. Ilyen vegyületek a betainok, és a szulfobetainok. Jóllehet kifelé semlegesek, bizonyos körülmények között polarizáló hatásuk erőteljes lehet. A kationos detergensek általában kvaterner ammónium-csoportot tartalmaznak és halogenidjeik formájában fordulnak elő, mint pl. a cetyl trimethylammonium bromide (CTAB). A nem-ionos detergenseknek nincsenek töltéssel bíró csoportjaik és a hidrofil karakterüket a hidroxil-csoportjaiknak köszönhetik. Ilyenek a polioxietilének és a szaharidok.

A detergensek apoláros molekularészletét jórészt egyenes-, illetve elágazó láncú szénhidrogének vagy szteroidális struktúrák alkotják.

A detergensek hatásának változtatása, szolubilizáló tulajdonságaiknak módosítása érdekében különböző kevert, hibrid molekulákat is szintetizálnak. Ilyen például a CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), amit egy hidrofób epesav-váz és egy szulfobetain fejcsoport összekapcsolásával hoztak létre. Az egyes detergens csoportokat és a közöttük lévő kapcsolatokat a **14.1. ábra** mutatja.



14.1. ábra Az egyes detergens osztályok és a közöttük lévő szerkezeti kapcsolatok

14.2. A detergensek fizikai-kémiai tulajdonságai

A detergensek amfipatikus karakterükből adódóan víz/levegő fázishatáron az apoláros molekularészlet a levegő, míg a poláros rész a vizes oldat felé helyezkedik el és monomolekuláris filmet alkot, csökkentve az oldat felületi feszültségét. Ugyanakkor a detergensek vizes oldatban hajlamosak aggregációra és meghatározott térbeli rendezettséget vesznek fel. Míg kis koncentrációban monomerként oldódnak, adott hőmérsékleten, egy adott koncentráció felett micellákat képeznek. Ez a koncentráció, a kritikus micelláris koncentráció (CMC – Critical

Micellization Concentration) jellemző az adott detergens molekulára. A micellákban a molekulák apoláris részei egymás felé és a vizes közegtől ellenkező irányba fordulva, apoláros belső teret, magot (core) alkotnak, míg a poláros részük a vizes fázis felé néz. A micellákat felépítő molekulák száma, az aggregációs szám (**N**), az adott detergensre nézve jellemző. Apoláros oldószerekben kifordított, inverz micellák jöhetnek létre

14.2.1. Kritikus micelláris hőmérséklet (CMT – Critical Micellar Temperature)

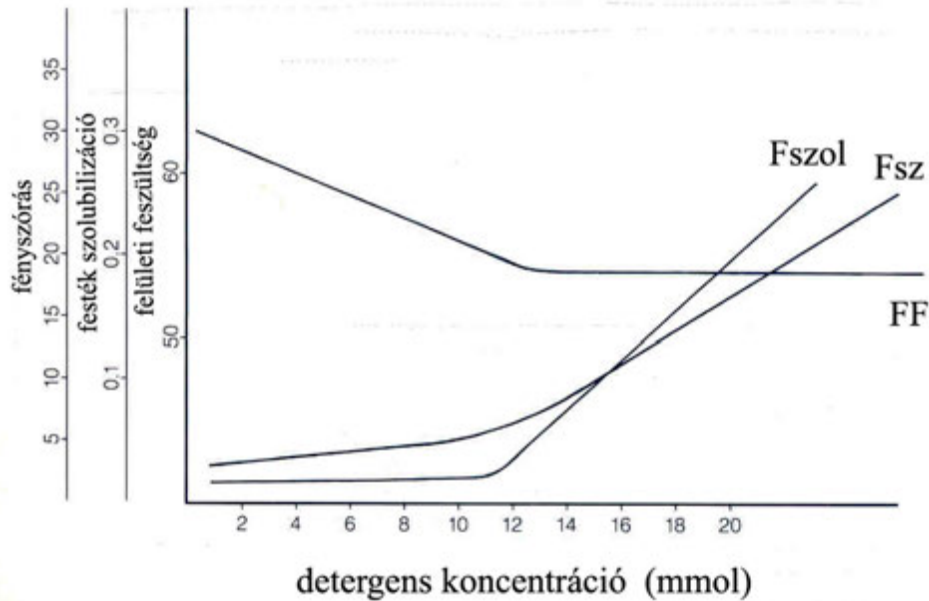
A CMT az a minimális hőmérsékleti érték, amelynél a detergens micellákat képes létrehozni vizes oldatban feltéve, ha eléri a kritikus micelláris koncentrációt (CMC). A CMT alatti hőmérsékleteken a detergens általában kristályos állapotban van. A legtöbb detergens CMT értéke jóval a 0°C alatt van.

14.2.2 Kritikus micelláris koncentráció (CMC – Critical Micellization Concentration)

A CMC az a minimális detergens koncentráció az oldatban, amikor megindul a micellák képződése, azaz a CMC érték felett a detergens molekulák már jórészt micellákba épülnek feltéve, ha a hőmérséklet a CMT felett van. Így a micellaképződés egy „hirtelen” bekövetkező változás, egy szűk detergens koncentráció tartományban. Léteznek olyan detergensek is, amelyek micellaképződés egy elég széles koncentráció skála mentén alakul ki. Ilyenkor a CMC nem értelmezhető. Több módszer is ismeretes a CMC meghatározására, amelyek a micellizáció látható, mérhető tulajdonságait, illetve azok változását követik nyomon. Ezek a felületi feszültség, a fényszórás, illetve a festék szolubilizáció mérése (**14.2. ábra**). A mért paraméternek a detergens koncentráció függvényében mutatott inflexiós pontja jelzi a CMC értékét. Ezek a módszerek különböző érzékenységek és az általuk mért CMC értékek kissé különbözhetnek. A mérési eredmények általában több paramétertől is függenek. Ilyenek a hőmérséklet, a pH, az ionerő, más molekulák, illetve szennyezések jelenléte.

14.2.3. Az aggregációs szám (N)

Az oldatban kialakuló micellák nem statikus képződmények. Dinamikus egyensúly alakul ki a monomerek és a micellák között, de maguk a micellák stabilak és jól definiálható számú detergens molekula építi fel őket. Az micellák aggregációs száma a molekulatömegük mérésen keresztül állapítható meg. A micella méret ugyanúgy érzékeny számos kísérleti paraméterre, ahogy a CMC is. Több detergens esetén megfigyelhető, hogy a micella mérete, és így az N is változik a detergens koncentrációjának növelésével. Ezért egy időben különböző méretű micellák jelenléte is lehetséges.



14.2. ábra Egy detergens kritikus micelláris koncentrációjának (CMC) meghatározása különböző módszerekkel. Fszol – festék szolubilizáció, Fsz – fényszórás, FF – felületi feszültség

14.2.4. Micelláris molekulatömeg (micellar M_r)

A tiszta detergens egy micellájának átlagos mérete [micellar $M_r = \text{monomer } M_r \times (N)$]. Általában az alacsony CMC-jú detergenseknek magas a micelláris M_r -je, a magas CMC-juaknak alacsony.

14.2.5. Felhő-pont (cloud-point)

A felhő-pont a polietoxilált nem-ionos detergensek jellegzetes tulajdonsága. Az a hőmérsékleti érték, amikor a detergens micellák szuperaggregátumokat képeznek. A felhő-pont feletti hőmérsékleten az oldat zavarossá válik, ami azért következik be, mert csökken a fejsoportok hidratáltsága. Az ilyen oldatban egy detergens-gazdag fázis különül el. Pl. a TRITON X-144 felhőpontja 22°C. A normál szolubilizálás 0°C-on történik, majd az oldatot lassan 30°C-ra melegítve, elválik a fehérjéket tartalmazó detergens-gazdag fázis, amit az oldat többi részétől centrifugálással el lehet választani.

14.2.6. Hidrofil-hidrofób egyensúlyi szám (HLB – hydrophile-lipophile balance number)

A detergensek hidrofil/hidrofób jellegének meghatározására használják a HLB értéket, ami a következő egyenlet alapján számítható:

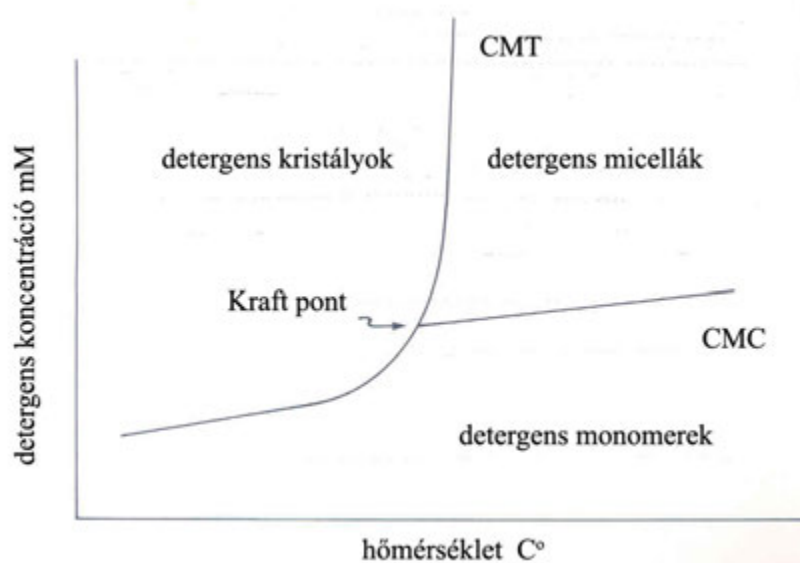
$$\text{HLB} = M_{\text{hidrofil}} / M_{\text{molekula}} \times 100 / 5$$

Ahol M_{hidrofil} a molekula hidrofil részének tömege, M_{molekula} a teljes molekulatömeg. A HLB tehát közvetlenül jellemzi az adott detergens hidrofil karakterét. Minél nagyobb ez az érték annál hidrofílebb a molekula. A HLB értéket az irodalmi leírások, illetve a gyártási ismertető is megadják. Egy detergens keverék a különböző komponensek HLB értékeinek súlyozott számtani átlagával jellemezhető. A HLB felvilágosítást ad az adott detergens biokémiai felhasználhatóságáról. Egyes membrán komponensek szolubilizálhatósága jól korrelál az adott detergens HLB értékével. Általában a 10-20 közötti HLB értékű detergensek alkalmasak membrán proteinek nem-denaturáló szolubilizálásához. E tartomány alsó értékeivel bíró detergensek (12-14.5) megfelelőek az integrális fehérjéknek a membránból való eltávolításához, illetve szolubilizálásához, míg a tartomány felső értékeivel rendelkezők

jók a membránhoz lazán kapcsolódó proteinek szolubilizálásához. Ugyanakkor a HLB érték felvilágosítást adhat arra is, hogy a detergens eltávolítható-e az oldatból, például hidrofób adszorpciós módszerrel. Ha a HLB túl magas, a detergens nem oszlik meg jól a hidrofób fázis és a vizes oldat között.

14.3. A detergensek viselkedését befolyásoló tényezők

14.3.1 Hőmérséklet – Minden detergens hőmérséklet-függő viselkedése egy fázis diagrammal írható le, amely megjeleníti a kristályos, a monomer és a micelláris állapotot. A kristályos és a micelláris fázis közötti vonalat a CMT határozza meg. A detergens hatás, azaz a micellaképződés a CMT felett érvényesül. A közel horizontális vonal kijelöli a monomer és micelláris állapot közötti határt. A hármas pont, a Kraft-pont, az a hőmérséklet, ahol a három fázis, a kristályos, a monomer és a micella egyensúlyban van (**14.3. ábra**). Számos detergensnél a Kraft-pont egyenlő a CMC-val.



14.3. ábra Egy detergens oldat hőmérséklet-összetétel fázis diagramja

14.3.2 Kémhatás – A pH szerepe különösen az ionos detergensek esetében jelentős. Az anionos detergensek csak akkor maradnak szolubilisak, ha az oldat pH-ja magasabb, mint az ionos csoport pKa értéke (disszociációs állandója). A kationos detergensek (pl. a szekunder és a tercier aminok) csak a pKa értéküknél alacsonyabb pH-nál oldhatóak. A kvaterner aminok nem pH érzékenyek. Néhány epesav, különösen a dezoxikolat (DOC) és származékai, a pKa értékeiknél magasabb pH-án már gélesednek. A nem-ionos alkildimetilamin oxidok kationos komponensekké válnak savas pH-án, és ezért változik a CMC értékük és az N-uk is.

14.3.3 Ionerő – Az oldat ionereje is befolyásolja a detergensek viselkedését. Pl. az ellenion koncentrációjának növelése (a Na^+ a Na-dodecilszulfát esetében) csökkenti a CMC értéket és nő az N, mivel az elektrosztatikus taszítás a monomerek között csökken, vagy megszűnik.

14.3.4 Detergens koncentráció – A detergensek hatását befolyásolja a CMC értékük feletti koncentrációjuk emelkedése. Több detergensnél megfigyelhető a micella méretének növekedése, ha a koncentrációjuk jóval a CMC felett van.

14.3.5 Ionok – A többértékű ionok jelenléte ellentétes hatást gyakorolnak az egyértékű ellen-ionoktól eltérően. Számos karboxilát-típusú detergens kicsapódik Ca^{2+} , vagy Mg^{2+} ionok jelenlétében, de előídezhetsi egyes detergensek kicsapódását a foszfát-puffer, foszfát komponense is. Egyes nyomokban jelenlévő, szennyező nehézfémek katalizálják a polioxietylén-típusú detergensek autooxidációját.

14.3.6 Szennyezések – Nem elhanyagolható az alkalmazott detergensek tisztasága sem. Az ipari tisztaságú detergensek számos szennyező anyagot tartalmazhatnak, mint pl. a szintézis melléktermékeit, degradációs termékeket, fém ionokat, pigmenteket, maradék reagenseket és oldószert. A biológiai kísérletekhez nagy tisztaságú készítmények használata ajánlatos. Különösen a polioxietilén-bázisú, anionos, ipari tisztaságú detergensek (TRITON, TWEEN, BRIJ, GENAPOL, THESIT) tartalmaznak peroxidot és aldehideket, amelyek káros hatással vannak a fehérjékre. Ezeknél különösen ajánlott a nagytisztaságú termékek használata (Calbiochem Protein grade). A különböző fehérje izolálási protokollok tartalmazhatnak olyan egyéb szerves anyagokat is, amelyek befolyásolják a detergensek hatását. Ilyenek például az alkoholok, amelyek a detergensek kicsapódásához vezethetnek.

14.4. A detergensek alkalmazásai

A biológiai kutatásokban a detergensek legelterjedtebben a membránkötött fehérjék izolálásában és oldhatóvá tételében használatosak. A detergensek hatása ebben a folyamatban több lépésben érvényesülhet:

alacsony detergens/lipid aránynál (0.1-1.0 g/1g) a detergens monomerek belépnek a membránba, permeábilissá, fluidabbá teszik azt, de még nem roncsolják szét (I. fázis). Ha ez az arány növekszik, megindul a detergensek micellaképződése (kb. 2-3 g/g) és közreműködnek a membrán szétesésében. A membrán szolubilizálása során detergens-lipid-protein micella komplexek alakulnak ki (II. fázis), majd a további szolubilizálás során kb. 4-10 g/g aránynál válik teljessé a membrán szolubilizációja és detergens-protein micella komplexek képződnek, amelyek már különböző fehérjeelválasztási technikákkal vizsgálhatók (III. fázis).

A membránproteinek szolubilizációja minden egyes fázisban folyik, ami a detergens és a fehérjék milyenségétől függ. Pl. a periférikus (extrinsic) fehérjék már az I. fázisban szolubilizálódnak, még mielőtt a membrán szétesne. A legtöbb fehérje a II. fázisban, mint detergens-lipid-fehérje micella-komplex jelenik meg és csak a magasabb detergens koncentrációjú, III. fázisban lesznek tiszta detergens-fehérje micellák.

A detergensek felhasználhatók membránproteinek beépítésére is meghatározott összetételű liposzóma rendszerekbe, ahol viselkedésük *in vitro* körülmények között vizsgálható.

A detergensek egy részét (SDS, CHAPS, NP-40, Na-dezoxikolat) főként elektroforetikus fehérjeelválasztásra használják. A Na-kolat, a Na-dezoxikolat és az oktilglukozid elterjedten alkalmazott detergensek liposzóma rendszerek előállítására.

14.5. A detergensek kiválasztása

A membránfehérjékkel való munka első fontos lépése kiválasztani azt a detergenst, ami a fehérjéket oldhatóvá, szolubilissá teszi és így azok könnyen eltávolíthatók a mintából. Egy adott feladathoz a megfelelő detergens kiválasztásához a legegyszerűbb út az irodalmi adatok felhasználása, akár konkrét egyezések, akár közeli hasonlóságok alapján. Új módszer, technika kipróbálásánál azonban számos körülményt kell figyelembe venni.

A detergens kiválasztásánál fontos szempont, hogy milyenek a kísérleti feltételek (hőmérséklet, pH, ionerősség, ionösszetétel, egyéb vegyületek jelenléte). Oldható-e az adott detergens a kísérlet hőmérsékletén? Pl. a Zwittergent család tagjai nem oldhatók 4°C-on, ezért hidegszobai munkához nem használhatók.

Elég nagyméretű micellák képződnek-e, amelyek alkalmasak a fehérjék szolubilizálásához? Pl. a Na-glikodezoxikolat aggregációs száma vízben 2, de 0.15 M-os NaCl oldatban már 20.

Milyen további lépések lesznek a szolubilizálást követően? Milyen lehetséges eljárások alkalmazhatók, ha az alkalmazott detergenst el kell távolítani a rendszerből?

Milyen, esetleg zavaró hatás várható a detergens jelenléte miatt, pl. spektroszkópiai vizsgálatok során (UV-VIS abszorpció, fluoreszcencia spektroszkópia), vagy fehérje meghatározási módszerek alkalmazásánál. Pl. a TRITON család tagjai elnyelnek UV-ben, ugyanakkor léteznek nem-abszorbeáló, hidrogenált származékaik is.

Zavarja-e a kiválasztott detergens az alkalmazni kívánt, töltés-alapú elválasztási módszereket, pl. az izoelektromos fókuszálást? Az ionos detergensek, kötődve a fehérjékhez, megváltoztatják azok natív töltését, míg a nem-ionosak nem. Egyes detergensek komplexet képeznek az amfolitokkal.

Befolyásolja-e az adott detergens az elválasztást követő festési eljárást? Egyes detergensek reakcióba lépnek festékekkel, illetve a fixálásnál alkalmazott vegyületekkel, míg mások olyan műterméket képezhetnek, amelyek zavarják az elektronmikroszkópos felvételeket.

A méret szerinti elválasztási technikáknál (gélszűrés, gélelektroforézis) jelentősége van a micellák méretének, illetve a fehérje-micella és szabad micella mérete közötti különbségnek.

Fontos szempont, hogy a kiválasztott detergens milyen hatással van a fehérjékre, különös tekintettel arra, hogy a fehérjét majd natív szerkezettel, aktív állapotban vagy denaturált állapotban kell vizsgálni. Figyelembe kell venni a membránkötött fehérje helyzetét is (extrinsic vagy intrinsic fehérjék). A fehérjék teljes szolubilizálása, aegységekre történő bontása esetén általában erőteljes, ionos detergenseket használnak (SDS). Érdemes figyelembe venni, hogy a hosszú szénláncot tartalmazó detergensek denaturáló hatásúak, mivel megbontják a fehérjék hidrofób régióit. A kiválasztott detergens denaturáló hatásának megállapításához szükség lehet a detergens-kezelt és a kezeletlen minta összehasonlítására. Enyhébb szolubilizáló hatású ionos, iker-ionos, illetve nem-ionos detergensek használatával megőrizhető a fehérje aegységszerkezete, enzimatis aktivitása, illetve a hozzájuk nem-kovalensen kötődő, nem-fehérje természetű kofaktorok jelenléte is (dodecylglukozid, dodecilmaltozid, N-gluko-N-metilalkánamidok, dezoxikolat, CHAPS, TRITON). Ezek a detergensek általában könnyen eltávolíthatók a szolubilizálás után a mintából dialízissel. További kérdés, hogy a szolubilizált mintában, a detergens eltávolítása után megmarad, illetve helyreáll-e az eredeti struktúra?

A detergens/fehérje arány megállapítása kritikus pontja a szolubilizálásnak. Ezért ehhez ismerni kell a minta fehérjetartalmát. A jó arány eldöntéséhez koncentráció sort kell kipróbálni mind fehérjetartalomra (pl. 5, 7.5, 10 mg fehérje/ml), mind detergensre (5, 7.5, 10 mg detergens/g fehérje), figyelembe véve a detergens CMC-át, illetve az irodalmi adatokat. Általában érvényes, hogy a detergensek a CMC-juk körüli értéknél a leghatékonyabbak és inkább alacsonyabb fehérje koncentrációknál.

Fontos tényező az oldat ionereje, ami befolyásolja a membránkötött molekulák közötti kölcsönhatásokat. Az ionos kölcsönhatások csökkenthetők növekvő sókoncentrációval, ami a membránfehérjék a membránból, és/vagy más molekuláktól való hatékony disszociációjához vezet. A kezdeti kísérleteknél pl. 0.1 és 0.5 M közötti KCl vagy NaCl javasolt. Ha a detergensekhez csak korlátozott hozzáférési van, ajánlott az oktilglukozid, a CHAPS vagy a kolát. Különösen a kolát lehet hatékony magasabb sókoncentráció mellett. A magasabb ionerő maszkírozza a fehérjék töltését és egyúttal csökkenti a detergens CMC-ját.

Nem elhanyagolható az oldat pH-ja, illetve pufferkapacitása. Tekintettel kell lenni az oldat összeállításánál a későbbi lépéseknél alkalmazott fehérjeelválasztási módszerekre (ioncserélő kromatográfia, izoelektromos fókuszálás), valamint arra, hogy a pufferrendszer komponensei ne lépjenek reakcióba a minta molekuláival.

Számításba veendő körülmény az alkalmazott hőmérséklet és a szolubilizálás időtartama. A kezdeti kísérleteknél ajánlott a 4°C és 1 h, enyhe keverés mellett. Más esetekben hatékony lehet a szolubilizálás 37°C-on, de rövidebb ideig (1-5 perc). A nem megfelelő hőmérséklet választásánál vagy a szolubilizálás hatékonysága alacsony, vagy a minta molekulái sérülhetnek.

Felmerülhet a kérdés, hogy vajon az adott detergens mennyire toxikus. Pl. a digitonin a szív működésre ható glikozid, ezért fokozott óvatossággal kell kezelni.

Kérdés lehet, hogy vajon a detergenssel nem lép-e reakcióba a mintaoldat valamely komponense? Pl. alkilglukozidokat, maltozidokat nem célszerű alkalmazni, ha a mintában glukozidáz enzim van jelen.

Végül nem teljesen mellékes körülmény, hogy a kiválasztott detergens milyen tisztaságú és mennyibe kerül.

14.6. A detergensek eltávolítása

Számos esetben szükségessé válhat a szolubilizált mintából a felesleges detergens, vagy az összes detergens eltávolítása, mert másik detergensre kell váltani, vagy mert a jelenlétük zavarná a további vizsgálatokat. Ilyenkor a következő módszerek alkalmazhatók a detergensek eltávolítására.

14.6.1 Hidrofób adszorpció – erőteljesen hidrofób karakterű detergensek, az oldatba kevert hidrofób, oldhatatlan gyanta adszorbensen kötődnek, amelyet centrifugálással, vagy szűréssel el lehet távolítani.

14.6.2 Gélzürés – méret alapján lehet elválasztani a detergens-fehérje, detergens-lipid, illetve homogén micellákat. Ilyenkor az eluáló oldat is tartalmaz detergenst, hogy a koncentrációja ne essen a CMC értéke alá.

14.6.3 Dialízis – alkalmas módszer a monomer detergens molekulák eltávolítására, amelyek egy idő után az elbomló micellákból származnak. Különösen hatékony magas CMC-jú detergensek esetében.

14.6.4 Ioncserélő kromatográfia – a detergens-fehérje és az üres micellák töltéskülönbsége alapján választ el.

14.7. Megjegyzések

Sokszor nehéz olyan detergenst találni, ami egyaránt ideális a teljes szolubilizálásához és az azt követő vizsgálati módszerekhez. Gyakori, hogy a szolubilizálás után az elsőként alkalmazott detergenst helyettesíteni kell egy megfelelőbb másikkal, ami kevésbé zavarja a további vizsgálatokat. Az A micellából a B micellába átvitt fehérjét el kell tudni választani egymástól akár méret (gélzürés, dialízis), töltés (ioncserélő kromatográfia) vagy denzitás alapján (sűrűséggradiens centrifugálás). Előfordulhat, hogy a detergens-csere lassú folyamat és nyomon követésére megfelelő módszert kell találni. Ellenőrizni kell, hogy a detergens váltás végére a fehérjék megőrizték-e az eredeti állapotukat, nem történt-e denaturáció, aktivitásvesztés.

Az ionos detergensek CMC-ja növekvő ionerővel csökkenthető és ezek viszonylag érzéketlenek a hőmérsékletváltozásra. Míg a nem-ionos detergenseknél ez fordítva van.

Homológ detergens sorozatokban az alkilánc hosszával fordítottan arányos a CMC. Pl. az alkilglukozidoknál a CMC értéke: oktilglukozid 23.2 mM, decilglukozid 2.19 mM, dodecilglukozid 0.017 mM, hexadecilglukozid 0.0015 mM.

A nem-ionos detergenseknél a CMC értékük hatással van a dializálhatóságukra. Magas CMC-jú detergens gyorsan eltávolítható a detergens-fehérje micella komplexből. A kis CMC-jú detergensek esetén kicsi a monomerek koncentráció grádiense a mintaoldat és a dializáló oldat között.

A két vagy több detergenst tartalmazó oldatokban az alacsonyabb CMC-jú detergens hatása elsődleges.

Bizonyos esetekben a fehérje aktivitása változtatható egy detergens cserével, pl. a kedvezőtlen hidrofób környezet csökkentésével.

Számos nem-ionos detergens autoklávozható, de a művelet után az oldatot lassan kell visszahűteni, lassú keverés mellett, a felhőpont alá.

Ismert olyan fluoreszcenciás módszer, aminek a segítségével meg lehet határozni az adott detergens CMC értékét, legyen az töltéssel bíró vagy töltés nélküli. Az 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién egy olyan töltés nélküli molekula, amely erőteljes, 358 nm-nél mérhető abszorpciót, illetve 430 nm-nél mérhető fluoreszcenciát mutat, amikor az adott detergens a CMC értékénél micellába zárja.

14.8. Függelék

14.1. táblázat Detergens osztályok és néhány detergens jellemző adata

detergens típusa	detergens	töltése	CMC (mM) (0.1-0.2 M Na ⁺)	aggregációs szám (N)	alkalmazott koncentráció
alkil-dimetilamin oxidok	dodecil-dimetilamin oxid (LDAO)		0.14	76	
alkil glukozidok	oktil-β-D-glukozid	nem-ionos	19-25	84	46 mM
alkil maltozidok	dodecil-β-D-maltozid	nem-ionos	0.12-0.15	98	10-20 mM
	N-dodecil-szulfobetain	ikerionos	3.3	55	15-30 mM
alkil szulfátok	Na-dodecil szulfát (SDS)	anionos	1-2	62	≥ 10 mg
alkil-tioglukozidok	oktil-β-D-tioglukozid		4	-	
betainok	Zwittergent 3-16	iker-ionos	0.014	155	
Big CHAP sorozat	Big-CHAP	nem-ionos	3.4	10	10-15 mM
epesavak	Na-dezoxikolát	anionos	1-4	3-12	0.1-10 mg/mg lipid
CHAP sorozat	CHAPS	iker-ionos	3-5	4-14	6.5-13 mM
digitonin	digitonin	nem-ionos	6.7-7.3	60	
glukózamidok	MEGA-10	nem-ionos	5.2	-	14-20 mM
polioxietilének	TRITON X-100	nem-ionos	0.29-0.31	100-155	1-5 mM
	BRIJ 35	nem-ionos	0.05-0.1	40	0.1-10 mg/mg lipid
	Nonidet P-40	nem ionos	0.11	-	1-10 mmol/l
	TWEEN 20	nem-ionos	0.059	-	10 mg/mg lipid
kvaterner ammónium vegyületek	cetiltrimetil-ammónium bromide (CTAB)	kationos	0.9-1.0	61-170	

14.9. Irodalom

Arnold, T., Linke, D. (2008) The use of detergents to purify membrane proteins. *Current Protocols of Protein Science* 4, 4.8.1.-4.8.30.

Bhairi, S.M., Mohan C. (2001) Detergents – a guide to the properties and uses of detergents in biological systems. EMB Biosciences, San Diego

Jones, O.T., Earnest, J.P., McNamee, M.G. (1987) Solubilization and reconstitution of membrane proteins. In: Findlay, J.B.C., Evans, W.H. (eds.). *Biological membranes – a practical approach*. Oxford: IRL Press, p. 139-177.

Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E., Tanford, C. (1979) Properties of detergents. *Methods in Enzimology* LVI, 734-749.

Hjelmeland, L.M. (1986) The design and synthesis of detergents for membrane biochemistry. *Methods in Enzimology* 124,135-164.

Neugebauer, J.M. (1990) Detergents: an overview. *Methods in Enzimology* 182, 239-253.

15. fejezet - Centrifugálás

szerző: Dr. Nyitrai Péter

A centrifugálás az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer biológiai minták részecskéinek elválasztására. Kezdeti az 1850-es évekre nyúlnak vissza, amikor elsősorban a tej komponenseinek szeparálására használták. Először 1930 körül ülepítettek ki vele sejtmagokat.

15.1. Elve

Az általában vizes közegben felfuszpendált részecskék mozgása (kiülepedése) centrifugálás közben számos tényezőtől függ: a részecske tulajdonságaitól (méret, alak, sűrűség), a közeg természetétől (pl. sűrűség, viszkozitás) és a kiülepitésre alkalmazott erő nagyságától. Mervev, gömbszerű részecskék és a viszkózus közeg között súrlódási erő (F) hat (G.Stokes, 1856):

$$F = 6 \pi \eta R_p v, \quad (v = dr/dt)$$

ahol η a viszkozitás, R_p a részecske sugara és v (dr/dt) a részecske sebessége.

Ha a részecske nem gömb alakú, akkor a súrlódási koefficiens változása (f/f_0 , ahol az f_0 a gömb súrlódási koefficiense) következtében az F változik:

$$F = (f/f_0) 6 \pi \eta R_p v$$

A részecskét a centrifugális erő (C) mozgatja a közegben, amit a közeg (ρ_m) és a részecske sűrűsége (ρ_p , gcm^{-3}) is befolyásol:

$$C = ma = (\rho_p - \rho_m) V \omega^2 r$$

ahol V a részecske térfogata, - gömb alakú részecske esetében: $V = 4/3 \pi R_p^3 (\text{cm}^3)$ és $\rho_m V \omega^2 r$ a részecskére ható felhajtó erő – a részecske mozgása közben folyadékot helyettesít a közegben.

A centrifugálás során a centrifugális gyorsulás többszöröse a gravitációs gyorsulásnak ($g = 9.81 \text{ ms}^{-2}$), tehát megadhatjuk g egységekben is:

$$\text{RCF} = a(g) = \omega^2 r g^{-1} = 4 \pi^2 N^2 60^{-2} r g^{-1} = 1.118 \cdot 10^{-5} N^2 r$$

Ahol ω a szögsebesség $= 2\pi N/60$, N a fordulatszám (**rpm** – repetition per minute), **RCF** (relative centrifugal force), (g és **rpm** közti átszámolás! A fordulatszám négyzetével arányos).

A folyékony közegben mozgó részecske pillanatszerűen eléri a végső sebességét és nem gyorsul, vagyis a centrifugális erő és a súrlódási erő egyenlő:

$$(\rho_p - \rho_m) V \omega^2 r = (f/f_0) 6 \pi \eta R_p v$$

így a részecske sebessége:

$$v = dr/dt = (\rho_p - \rho_m) V / (f/f_0) 6 \pi \eta R_p \omega^2 r = s \omega^2 r$$

ahol s a szedimentációs koefficiens, amit a részecske mérete, alakja és sűrűsége is befolyásol, egysége a Svedberg (**S**), 10^{-13} s). A biológiai molekuláknál az s nagysága általában 10^{-3} nagyságú.

Gradiens jelenlétében a közeg viszkozitása és sűrűsége változik a forgástengelytől mért távolsággal, azaz az s változó. Így a szedimentáció sebességét a részecske szedimentációs koefficiense (a részecske sűrűsége, a közeg sűrűsége és viszkozitása, a részecske alakja), valamint a centrifugális gyorsulás szabja meg. A sűrűséggradiens alkalmazásakor a víznél nagyobb sűrűségű közeg jelenléte csökkenti ugyan a szedimentáció sebességét, de a gradiens megakadályozza a részecskék kiülepedését és stabilizálja a sávokat.

15.2. A centrifugális elválasztás típusai:

15.2.1 Differenciál centrifugálás

Szedimentációs sebességbeli különbségek alapján választ el. A jó elválasztáshoz 10-es faktorial különböző s értékek szükségesek. Például kloroplasztiszok, mitokondriumok, riboszómák elválaszthatók, de intakt és tört kloroplasztiszok nem. Mivel a kiülepedés a centrifugácóban igen eltérő úthossz mentén lehetséges, hiszen azonos partikulumok indulnak a centrifugacső alsó és felső részéből, tökéletes elválasztásra nincs lehetőség, ezért a differenciál centrifugálás általában többlépcsés eljárás. Előnye, hogy nagyobb mennyiségű anyag feldolgozására alkalmas, ugyanakkor a kiülepített csapadék mindig tartalmaz más részecskéket is (keresztzennyezés, cross-contamination). Ennek csökkentésére többszöri felszuszpendálás és újbóli centrifugálás végezhető, miközben anyagvesztéssel kell számolni. Differenciál centrifugáláshoz általában szögrotorokat és kilendülő rotorokat használnak.

15.2.2. Sűrűség-gradiens centrifugálás

15.2.2.1. „Rate-zonal” centrifugálás (1950)

Hasonló sűrűségű, méretben különböző részecskék elválasztására alkalmas szeparálási módszer, Olyan részecskék is elválaszthatók, amelyeknek a szedimentációs sebessége csak 20%-ban különbözik. Az alkalmazott közeg valamilyen sűrűség gradiens. A gradiens tetejére rétegzett mintában lévő különböző partikulumok önálló sávot alkotva különülnek el a centrifugálás során, tömegkülönbségeik alapján. Gyors, egyensúlyra vezető eljárás, a keresztzennyezés elhanyagolható. Célszerű a gradiens aljára egy nagy sűrűségű réteget tenni a nehéz részecskék kiülepedésének megakadályozására. Meghatározott méretű részecskék elválasztására is alkalmas, mint pl. fehérjék, nukleinsavak, riboszómák. Ha a részecskék egy osztályon belül heterogének, akkor ez a módszer nem jó. Kilendülő, zonális és vertikális rotorok használhatók.

Problémák: szögrotorok nem használhatók, mert gyorsuláskor a minta keveredhet a gradienssel. Kicsi a kapacitás. A felvitt anyag nem lehet túl koncentrált, mert akkor keveredik a gradiens felső részével.

15.2.2.2. Izopiknikus centrifugálás (1960)

Ezzel a módszerrel alapvetően a sűrűségükben különböző részecskék választhatók el. Az azonos denzitású partikulumok a lineáris gradiens azonos sűrűségű térrészeiben helyezkednek el. A méretbeli különbségek csupán a megfelelő sáv elérésének idejét befolyásolják. Az izopiknikus centrifugálás egyensúlyi rendszer kialakulására vezet. A minta rárétegzhető az előre elkészített gradiens tetejére, ill. egyenletesen elkeverhető a gradienstépező anyaggal. Ilyenkor a lineáris gradiens és az elválás egy lépésben, a centrifugális erő hatására alakul ki. A méretbeli különbségek csupán a megfelelő sáv elérésének idejét befolyásolják. A vertikális rotorok a legalkalmasabbak, mert a legrövidebb centrifugálási időt igénylik. Hátránya, hogy a részecskék mindenképpen érintkeznek a nagy koncentrációjú gradiens anyaggal a reorientáció során, ami a részecskéket károsíthatja.

15.3. A centrifugák típusai

15.3.1. Preparatív centrifugák

15.3.1.1 Low-speed centrifugák: 2-6 ezer rpm., max. 6000g, általában hűthetők, vákuum rendszer nincs, fékezés általában van. A biológiai minták kezdeti feldolgozásához használatosak. Sejtek, gyorsan kiülepedő sejtalkotók, sejtmagok, kloroplasztiszok izolálására alkalmasak.

15.3.1.2 High-speed centrifugák: 18-25 ezer rpm., max. 60000g. Hűthetők, némelyik típus vákuumban működik. Szubcelluláris frakciók elkülönítésére alkalmasak.

15.3.1.3 Ultracentrifugák: 40-80 ezer rpm., kb. 600000g. A preparatív ultracentrifugák segítségével riboszómák, membránpartikulumok, makromolekulák választhatók el.

15.3.2. Analitikai ultracentrifugák

Ezeket elsősorban molekulásúly, szedimentációs állandó, diffúziós állandó meghatározására alkalmazzák, de felhasználják molekuláris kölcsönhatások, alegység szerkezet, konformáció vizsgálatára is. A modern analitikai ultracentrifugákat bonyolult optikai és számítógépes rendszerekkel szerelik fel.

15.3.3. Egyéb centrifugák

mikrocentrifugák, folyamatos áramlású centrifugák, stb.

15.4. Centrifuga rotorok

A kisebb centrifugák rotorjai réz-és acél ötvözetekből, ritkábban műanyagból. Az ultracentrifugák rotorjai alumínium, vagy titán ötvözetekből készülnek, hogy a nagy terhelést elviseljék és a korrózió a minimálisra csökkenjen. A tiszta alumínium rotorok fokozott korrózió elleni védelmet igényelnek (stressz korrózió, rétegleválás). A titán ötvözetek ellenállnak a korrózióknak, élettartamuk igen hosszú és nem lép fel kifáradás, de igen drágák. Ezeket fekete epoxiréteggel vonják be.

15.4.1 A preparatív centrifuga rotorok főbb típusai: a kilendülő (swing-out), a vertikális, a szög (fixed-angle) és a zonális rotorok.

Kilendülő rotorokban a felfüggesztés különböző lehet (oda kell figyelni a csövek megfelelő helyre való berakására, amiben segít a számozás). Az elválasztás és leállítás során a sávok reorientálódnak. A **szögrotorok**ban a csövek más-más szögben helyezkedhetnek el. (20-40°). A csekély reorientáció előnyös az izopiknikus elválasztásnál, növeli a felvihető anyagmennyiséget. A **vertikális rotorok**, (a szögrotorok egy speciális fajtája), előnye a gyors elválasztás – a rövid szedimentációs úthossz, de nagy a reorientáció. **Zonális rotorok** esetében az elválasztandó anyag magában a rotorban van (rate-zonal, izopiknikus elválasztásra jó).

Elutriktor rotoroknál a centrifugacsőben a centrifugális erővel szemben mozgó, növelhető folyadékáramlás van. Az elválasztott részecskék eltávolíthatók. Elsősorban sejtek elválasztására alkalmazzák.

15.4.2 A rotorok típusai és felhasználási területeik

rotor típusa	Az elválasztás módja		
	differenciál	rate-zonal	izopiknikus
szögrotor	kiváló	gyenge	jó
vertikális rotor	gyenge	jó	kiváló
kilendülő rotor	gyenge	Jó	megfelelő
zonális rotor	gyenge	kiváló	megfelelő

A gyártók általában megadják a rotorok jellemzőit: maximális rpm (N_{max}), r_{max} és r_{min} , a rotor maximális, illetve minimális sugara a forgástengelytől mérve, valamint egy rotorjellemző (k) faktort:

$$k = 2.53 \times 1011 [\ln(r_{max}/r_{min})] \cdot N_{max}^2$$

Minél kisebb a rotor k faktora, annál nagyobb a kiülepítés hatékonysága. A k faktort teli centrifugacsőre adják meg. Értéke részben töltött cső esetében kisebb. A faktor értékét növeli, ha a közeg viszkozitása és sűrűsége jelentősebben eltér a víztől. Ezért pl. a gyári k faktor cukorgradiens esetén nem használható. Helyette k^* , aminél feltételezik, hogy a molekula sűrűsége a cukoroldatban 1.3 g cm^{-3} , ami fehérjékre, DNS-re igaz, de az RNS-é $1,7 \text{ g cm}^{-3}$. A k faktor a rotor maximális sebességére adott, ezért alacsonyabb fordulaton a k faktort korrigálni kell:

$$k_{\text{aktuális}} = k [N_{\text{max}} / N_{\text{aktuális}}]^2$$

Ha a centrifugáláshoz használt közeg sűrűsége nagyobb, mint $1,2 \text{ g cm}^{-3}$, akkor a megadott maximális fordulatszám nem használható. Helyette az új maximális fordulatszám kiszámolható:

$$N'_{\text{max}} = N_{\text{max}} (1.2/\rho)^{1/2}$$

Ha az adott részecske szedimentációs koefficiense ismert, az alábbi összefüggés segítségével számolható a részecske kiülepítésének ideje:

$$t = k/s., \text{ illetve cukorgradiensén. } t = k^*/s$$

A rotorok tervezésénél és használatánál központi probléma a rotor stabilitása. A rotor súlypontja forgás közben, főként alacsonyabb fordulatszámánál, nem stacionárius, hanem cirkuláris mozgást ír le. Ez az úgynevezett precesszió (szinkronforgás) minden rotorra jellemző. A tervezés és a meghajtás precizitása csökkentheti. Sokkal komolyabb probléma a rotor aszinkron forgása, amely elsősorban magasabb fordulatszámokon jelentkezik. Okozhatja tervezési, meghajtási hiba, ill. a rotor és főképpen a centrifugacsövek kiegyensúlyozatlansága. További hibaforrás a vákuumban működő ultracentrifugáknál, ha a csövek gondatlan lezárása miatt a minta egy része eltávozik a csőből. Már kisebb kiegyensúlyozatlanság is zavarhatja az elválasztást, különösen gradiens centrifugálásnál. Komolyabb kiegyensúlyozatlanság mechanikai sérülésekhez is vezethet, jóllehet a korszerű ultracentrifugákat ilyen jellegű hibák elleni védelemmel ellátják.

A rotorokat adott sűrűségű közegre tervezik. Ha az alkalmazott közeg sűrűbb, a rotor sebességét csökkenteni kell:

$$N'_{\text{max}} = DD/SD. (\text{ahol } DD \text{ a tervezett sűrűség, } SD \text{ az új sűrűség})$$

15.4.3 A rotorok védelme

15.4.3.1 Fizikai sérülés: ügyelni kell arra, hogy a rotor ne essen le, vagy más fizikai sérülés ne érje (pl. karcolás)

15.4.3.2 Tisztítás: általában semleges detergenssekkel tisztítandók a rotorok, majd desztillált vízzel lehet lemosni és szárazra törölni. Az alumínium rotoroknál nem szabad lúgos, vagy savas mosószerekkel tisztítani és ajánlott víztaszító spray használata (pl. WD40)

15.4.3.3 Életidő: az ultracentrifuga rotoroknál a használhatóságot az életidő korlátozza. Az életidőt a futás időtartama, az alkalmazott g, és a minták száma határozza meg. Az életidőt a gyártó által megadott módon kell kiszámítani. Lejárta után, csak az illetékes szerviz vizsgálata után lehet tovább használni.

15.5. Centrifuga csövek

15.5.1 Üvegcsövek - 3000g felett nem használhatók, de igen inertek. Az erős Corex csövekkel 25000g is elérhető. A minta feltapadását szilikon bevonattal lehet kivédeni.

15.5.2 Polikarbonát csövek - átlátszóak, autoklávozhatóak és erősek, bár bizonyos oldószerekre érzékenyek (szerves oldószerek, alkoholok, fenol, alkalikus közeg, detergens). A vékonyfalúak eltörhetnek, pl. intenzív fékezés közben.

15.5.3 Poliszulfonát csövek - olyanok, mint az előbbieket, de nem érzékenyek alkalikus közegre, és pl. etanolra, de pl. fenolra igen.

15.5.4 Polipropilén csövek - hasonló a fentiekhez, jobb kémiai rezisztencia jellemzi őket, autoklávozhatóak.

15.5.5 Cellulózitrát, cellulózacetát csövek - átlátszóak, de tűzveszélyesek, könnyen öregsznek.

15.5.6 Cellulóz észter csövek - autoklávozhatóak, CsF₃-acetát, valamint sav- és lúgérzékenyek.

15.5.7 Zárókupakok ld. Ultracentrifugálásnál (illékony, fertőző, radioaktív, mérgező anyagok esetén szintén zárható csövek használata kötelező).

15.6. A centrifugálás közege

A centrifugálás során, az esetek többségében, különböző tulajdonságú részecskék szétválasztása történik, amelyet általában egy dezintegráló homogenizálás előz meg. A homogenizáláshoz és a centrifugáláshoz is megfelelő közeget kell választani, amely biztosítja, hogy a biológiai minta a kívánt mértékben megőrizze natív szerkezetét és funkcióit. Optimalizálni kell a közeg pH-ját, ozmotikus koncentrációját, ionerejét. Ugyanakkor különböző antioxidánsok, kelátképzők, membránvédő faktorok és antitoxikus anyagok is alkalmazhatók. Míg a differenciál centrifugálás során a minta végig egy, vagy több homogenizáló médiumban van, a gradiens centrifugálás során különböző gradiensképző anyagokat is fel kell használni, amelyeknek számos követelménynek kell megfelelniük: a gradiens anyag legyen inert, de legalábbis ne legyen toxikus, ismertek legyenek a fiziko-kémiai tulajdonságai, legyen vízzel oldható, ozmotikusan és optikailag inaktív, kellőképpen, de ne túlzottan viszkózus, könnyen elválasztható legyen a minta részecskéitől és legyen olcsón hozzáférhető, esetleg visszanyerhető. Mivel az alkalmazott gradiens anyagok egyike sem elégíti ki az összes kívánalmat, ezért egy adott biológiai minta elválasztásához a legmegfelelőbbet kell kiválasztani (ld. irodalom).

15.6.1 Az ismertebb gradiensanyagok tulajdonságai és felhasználási területeik:

15.6.1.1 Nem-ionos médiumok

Cukor (szacharóz): ideális gradiens anyag, de erős ozmotikum, csak magasabb koncentrációban viszkózus, pH=3 alatt a glikolitikus kötés instabil. Autoklavozásnál karamellizálódhat. Felhasználják az izopiknikus elválasztásnál, sejtorganellumok, vírusok, makromolekuláris komplexek elválasztására.

Glicerín: analitikailag igen tiszta, benne számos enzim megőrzi aktivitását, de erősen viszkózus. Elsősorban enzimek elválasztására használják.

Poliszacharidok (glikogén, dextrans, Ficoll): ozmotikusan inerte, de magas a viszkozitásuk. Stabil gradiens készíthető belőlük. Sejteket, sejtorganellumokat és membránokat izolálnak bennük.

Jodinált gradiens anyagok (iothalamát, metrizamid, Nycodenz): kis ozmolalitású, kevésbé viszkózus anyagok, széles körben használhatók, de az UV-ban elnyelnek. Felhasználják nukleinsavak, fehérjék, nukleoproteidok, sejtek, sejtorganellumok, vírusok izolálására.

Szilika kolloidok (Ludox, Percoll): 3-20 nm átmérőjű részecskéket tartalmaz, nem toxikus, ozmolalitása alacsony, igen stabil, de az alacsony pH-ra és a nagy ionerőre érzékeny. Önbeálló (self-forming) gradiensanyag. A szilika kolloidok felületét polivinilpirrolidinnel vonják be. Ez csökkenti a kölcsönhatást és növeli az inertséget, de erősen nyelnek el az UV-ben. Sejtorganellumok, sejtek, membránkomplexek, baktériumok, vírusok elválasztására alkalmasak.

Proteinek (bovine serum albumin, BSA): ozmotikusan inerte, viszkózusak, de az UV-ban elnyelnek. Sejtek, intakt sejtalkotók izolálására alkalmasak.

15.6.1.2 Ionos médiumok

Cézium sók: főként izopiknikus elválasztáshoz alkalmazzák. Nagy ionerejű és ozmotikusan aktív, elég viszkózus vegyületek. Self-forming gradiensképzők. Nukleinsavak, plazmidok, DNS és RNS fragmentek izolálására alkalmazzák.

K, Na-és Rb sók: kis sűrűségű és viszkozitású anyagok. Főképp lipoproteineket, RNS és DNS fragmenteket izolálnak bennük.

15.6.2 Centrifugálási közeg kiválasztása (alapvetően támaszkodva az irodalmi adatokra)

15.6.3 Gradiensek előállítása

Alapvetően kétféle gradiens állítható elő, lineáris és szakaszos gradiens. A lineáris gradiens készítése (öntése) a centrifugáláshoz használt csőben történik, egy alul összekötött, csappal elzárható, két hengert tartalmazó öntőedény segítségével. A két hengerbe a gradiens anyag hígabb, ill. töményebb koncentrációjú oldata kerül. A kifolyás a hígabb oldatot tartalmazó edényből indul a centrifugacsőbe, amely a töményebb oldat felől folyamatosan töményedik. A koncentráció határok kiválasztását az elválasztandó részecskék tulajdonságai szabják meg. A kifolyás a hígabb

oldatot tartalmazó edényből történik, amelyet a töményebb oldat állandóan pótol. Így a centrifugacsőben emelkedő folyadék koncentrációja folyamatosan változik, fentről lefelé töményedik. Az ún. self-forming gradiens anyagokból előzetes centrifugálás segítségével állítható elő stabil, lineáris gradiens. A szakaszos gradiensek készítése több lépcsőben történik, ahol az egyes eltérő koncentrációjú (sűrűségű) oldatokat rétegezik egymásra. Az elválasztandó biológiai mintát általában a gradiens tetejére rétegezik, ritkábban, egyenletesen eloszlata, a gradiens tartalmazza (izopiknikus elválasztás egy esete).

A centrifugálás, mint elválasztási módszer rendkívül változatos lehetőséget nyújt különböző biológiai anyagok izolálására. A hatékony és eredményes munkához azonban a körülmények (centrifugálás típusa, közeg) és a berendezés (centrifuga, rotor, cső) helyes megválasztása szükséges.

15.7. Gyakorlat

Gradiens centrifugálás (Caffarri et al., JBC 276: 35924-33, 2001)

Szolubilizálás:

Sz: 20 mM HEPES (pH 7.5)

500 mM HEPES (pH 7.5) 0.2 ml → 5.0 ml-re bidv-zel

Körülmények: 500 ug ml⁻¹ Chl, 0.6% DDM, 1 min Vortex, 10 min 15000xg cf.

Gradiens: (glicerinnel lassabban válik szét, de szebb a szétválás)

0.1M: 10 mM HEPES (pH 7.5), 0.1 M szaharóz, 0.05% DDM (5% glicerín)

500 mM HEPES (pH 7.5)	1.0 ml
szaharóz:	1.712 g
DDM	25 mg
(glicerín	2.5 g)
	→ 50 ml-re bidv-zel

1.0M: 10 mM HEPES (pH 7.5), 1.0 M szaharóz, 0.05% DDM (5% glicerín)

500 mM HEPES (pH 7.5)	1.0 ml
Szaharóz:	17.115 g
DDM	25 mg
(glicerín	2.5 g)
	→ 50 ml-re bidv-zel

2.0M: 10 mM HEPES (pH 7.5) 2.0 M szaharóz, 0.05% DDM (5% (v/v) glicerín)

500 mM HEPES (pH 7.5)	0.5 ml
Szaharóz:	17.115 g
(glicerín	2.5 g)
	→ 25 ml-re bidv-zel

Minta: szolubilizált tilakoid

Vak gradiens:

0.1MV: 0.1 M szaharóz 2.115 g → 75 ml-re bidv-zel

1.0MV: 1.0 M szaharóz 25.673 g → 75 ml-re bidv-zel

2.0MV: 2.0 M szaharóz 17.115 g → 25 ml-re bidv-zel

Vak minta: DCPIP oldat a gyakorlatról

Kivitelezés: 6 ml **0.1M/0.1MV** és 6 ml **1.0M/1.0MV** oldatból gradienskeverővel gradienst öntünk a centrifugacsövekbe. Fecskendővel alárétegezzük 1 ml **2.0M/2.0MV**-t. A gradiensre 0.5 ml mintát, ill. vak mintát rétegezzük. 22 h ultracentrifugálás 28000xg-vel. Ezután a gradiensen megjelenő sávokat leszívjuk/a gradienst frakcionáljuk. Az elválasztott sávok azonosításához felvesszük az abszorpciós spektrumukat/meghatározzuk Chl *a/b* arányukat/fehérjeösszetételüket. Az utóbbihoz a mintát szolubilizáljuk: 100 µl mintához 50 µl 3x tömény Laemmlli szolubilizáló oldatot (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 2% merkaptóethanol, 10% glicerin, 0.001% brómfenolkék) adunk, és 30 percig szobahőmérsékleten néha vortexelve szolubilizáljuk. A mintákat Laemmlli gélelforetikus rendszerrel elválasztjuk.

15.8. Irodalom

Centrifugation, a practical approach. (D. Rickwood ed.), IRL Press, Oxford, Washington DC, 1984.

Rickwood, D., Ford, T.C., Steensgaard, J.: Centrifugation, essential data. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1994.