



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS
GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
Általános és Analitikai Kémia Tanszék

ENZIMJELZÉSES IMMUNANALITIKAI (ELISA) RENDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA

Doktori értekezés

Készítette: **Hegedűs Gyöngyvér**
okl. biológusmérnök
Témavezető: **Dr. Székács András**
tud. tanácsadó
Konzulens: **Dr. Horváth Viola**
tud. főmunkatárs

Készült: A Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Kutatóintézetében

Budapest, 2003

TARTALOMJEGYZÉK

<u>1. BEVEZETÉS</u>	6
<u>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u>	9
<u>2.1. Növényvédő szerek</u>	9
<u>2.1.1. A növényvédő szerek általános jellemzése</u>	9
<u>2.1.2. Trifluralin</u>	10
<u>2.2 Növényi hormonok</u>	12
<u>2.2.1. A növényi hormonok általános jellemzése</u>	12
<u>2.2.2. Az auxinok</u>	13
<u>2.2.3. A gibberellinek</u>	14
<u>2.2.4. A citokininek</u>	15
<u>2.2.4.1. A citokininek bioszintézise és biokémiai lebontása</u>	17
<u>2.2.4.2. A citokininek fiziológiai szerepe</u>	18
<u>2.2.5. Az abszcizinsav</u>	19
<u>2.2.6. Az etilén</u>	19
<u>2.3. Az immunanalitika alapjai</u>	20
<u>2.4. Az ELISA technika</u>	23
<u>2.4.1. Az ELISA módszer elve</u>	23
<u>2.4.2. Az ELISA rendszerek felépítése</u>	24
<u>2.4.2.1. A vetélkedés (kompetíció) elvén alapuló ELISA eljárás</u>	25
<u>2.4.2.2. A nem vetélkedő (konszekutív) elven alapuló ELISA eljárás</u>	29
<u>2.5. Molekulaspektroszkópiás módszerek</u>	31
<u>2.5.1. UV-VIS spektrofotometria</u>	31
<u>2.5.2. Repülési idő tömegspektrométer</u>	32
<u>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	33
<u>3.1. Hapténmolekulák és fehérjekonjugátumok szintézise</u>	33
<u>3.1.1. Fehérjék jellemzése</u>	33

3.1.2. Hapténszintézis és -konjugálás a trifluralinszelektív ELISA eljáráshoz.....	34
3.1.3. Hapténszintézis és -konjugálás a citokininszelektív ELISA eljáráshoz.....	37
<u>3.2. A konjugátumok tisztítása, dialízis.....</u>	38
<u>3.3. A beépült hapténkoncentráció mérése a fehérjekonjugátumokban.....</u>	38
<u>3.4. Immunizálás.....</u>	39
<u>3.5. Az ELISA módszer.....</u>	39
3.5.1. Az ELISA teszt elve.....	39
3.5.2. A puffer oldatok elkészítése.....	42
3.5.3. Az ELISA teszt kivitelezése.....	42
<u>3.6. Az ELISA módszer validálása GC-MS módszerrel.....</u>	44
<u>4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....</u>	45
<u>4.1. Trifluralin ELISA rendszer fejlesztése.....</u>	45
4.1.1. A konjugálási reakciók eredményességének vizsgálata.....	45
4.1.1.1. Hapténkoncentráció mérése a trifluralin-fehérje konjugátumokban.....	45
4.1.1.2. A fehérjetartalom mérése.....	48
4.1.1.3. A haptén/fehérje arány meghatározása a konjugátumokban.....	49
4.1.2. Immunanalitikai vizsgálatok trifluralin meghatározására alkalmas ELISA rendszerek kifejlesztéséhez.....	50
4.1.2.1. A szérumok titrálása trifluralinszelektív ELISA eljáráshoz.....	50
4.1.2.2. A szérumok gátlása.....	53
4.1.2.3. pH hatás.....	56
4.1.2.4. Oldószerhatás.....	56
4.1.2.5. Keresztreakciók.....	57
4.1.2.6. Mátrixhatások vizsgálata.....	59
4.1.2.7. Az ELISA teszt validálása GC-MS módszerrel.....	63
<u>4.2. Citokinin ELISA rendszer fejlesztése.....</u>	64
4.2.1. A hormonfehérje konjugációs reakciók sikerességének nyomon követése izoelektromos fókuszálással (IEF).....	64
4.2.2. Immunanalitikai vizsgálatok.....	65

<u>4.2.2.1. A szérumok titrálása citokininszelektív ELISA eljáráshoz</u>	65
<u>4.2.2.1.1. A zeatin-ribozid antiszérum titerértékek időfüggése</u>	66
<u>4.2.2.1.2. A zeatin-ribozid antiszérum titrálása hapténhomológ rendszerben</u>	67
<u>4.2.2.1.3. A zeatin-ribozid antiszérum titrálása haptén-heterológ rendszerben</u>	69
<u>4.2.2.1.4. A zeatin antiszérum titrálása hapténhomológ illetve -heterológ rendszerben</u>	69
<u>4.2.2.2. Az izopentenil-adenozin antiszérum titrálása</u>	70
<u>4.2.2.2.1. A izopentenil-adenozin antiszérum titerértékek időfüggése</u>	71
<u>4.2.2.3. A szérumok kompetitív gátlási vizsgálatai</u>	72
<u>4.2.2.3.1. A zeatin-ribozid antiszérum gátlása homológ illetve heterológ rendszerben</u>	73
<u>4.2.2.3.2. A zeatin antiszérum gátlása homológ és heterológ rendszerben</u>	73
<u>4.2.2.3.3. A zeatin-ribozid antiszérum zeatin-ribozid általi gátlásának időfüggése</u>	73
<u>4.2.2.3.4. Az anti-IPA szérumok gátlása izopentenil-adenoziddal, időfüggése</u>	74
<u>4.2.2.4. Az egyes antiszérumok gátlása különböző növényi hormonokkal</u> <u>(keresztreakciók)</u>	75
<u>4.2.2.5. A pH hatása a rendszer érzékenységére</u>	79
<u>4.2.2.6. Szerves oldószerek hatása a kifejlesztett rendszer érzékenységére</u>	80
<u>4.2.2.7. Az inkubációs és preinkubációs idő hatása a rendszer érzékenységére</u>	83
<u>4.2.2.8. A kifejlesztett ELISA rendszer növényi mintákon való alkalmazása</u>	86
<u>5. ÖSSZEFOGLALÁS</u>	90
<u>IRODALOMJEGYZÉK</u>	91

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani mindazoknak, akik segítettek munkámban és ezzel hozzájárultak doktori dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm férjemnek segítőkészségét, türelmét, amellyel jó feltételeket, nyugodt körülményeket teremtett dolgozatom megírásához.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Székács Andrásnak** szakmai irányítását, a dolgozat végső formájának eléréséhez nyújtott segítségét.

Köszönöm **Dr. Bélai Ivánnak**, a trifluralin ELISA rendszer fejlesztéséhez szükséges haptének szintézisét.

Köszönettel tartozom az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete vezetőségének, hogy munkám az intézet Szerves Kémiai Osztályán végezhettem, ott a szükséges eszközöket, vegyszereket igénybe vehettem, valamint a Varga József Alapítványnak, hogy számomra doktori ösztöndíjat biztosított.

1. BEVEZETÉS

A modern kémiai növényvédelem mintegy hetvenéves múltra tekinthet vissza, mióta az ember készítette mesterséges vegyületek általános alkalmazást nyertek a mezőgazdasági gyakorlatban. Az igen rövid idő alatt hatalmas karriert befutó növényvédő szer készítmények bevezetésének és alkalmazásának érvrendszere hagyományosan az alábbi indoklásra vezethető vissza:

- a mezőgazdasági termelékenység növelése, közéletmezés,
- emberi munka kiváltása a mezőgazdasági termelésben,
- profit.

A fenti érvek, valamint a mind hatékonyabb és szelektivebb hatóanyagok kifejlesztése nemhogy indokolttá, de igen rövid idő leforgása alatt elengedhetlenné tették a növényvédő szerek alkalmazását az iparszerű mezőgazdaságban. Ám két évtized sem telt el, s számos olyan riasztó tünetre derült fény, melyek egyértelműen jelezték, hogy e vegyi anyagok használata jelentős, nemritkán súlyos mértékben zavarja a környezeti egyensúlyt és ezáltal közvetett vagy akár közvetlen módon az emberi egészséget, életet is. Napjainkban megfigyelhető az az általános törekvés, amely az ökológiai szempontok figyelembevételével a növényvédő szerek alkalmazásának visszaszorítására irányul, a felhasználás fokozatosan a minimálisra, a legszükségesebb értékre korlátozódik. Mindazonáltal, a becslések szerint a növényvédő szerek használata elkerülhetetlen marad, felhasználásuk nélkül a mezőgazdasági termelés mintegy egyharmada veszendőbe menne [1-4].

Környezetünk állapotának nyomon követése történhet egyes környezeti állapotjelző vegyületek (biomarkerek), valamint a környezetszennyező anyagok szintjének mérésével. A mérési módszer megválasztásakor figyelemmel kell lenni arra a tényre, hogy az alkalmazott mérési módszer alapvetően meghatározza ezen vizsgálatok hatékonyságát, pontosságát, mivel a különböző eljárások más-más érzékenységgel, mérési kapacitással, munkaigénnyel jellemezhetők. A hagyományos analitikai módszerek jó részénél mind a környezetszennyező növényvédő szerek maradékainak, mind pedig a biomarker vegyületek szintjeinek meghatározásánál korlátozó tényezőt jelent: megbízhatóságuk, pontosságuk, reprodukálhatóságuk és szabványosíthatóságuk (ISO standard) mellett is – a szermaradvány analízisekben alkalmazott hagyományos műszeres analitikai módszerek (GC, HPLC) – magas mintánkénti költségük, valamint korlátozzák az analizálható minták számát a bonyolult, nagy időigényű mintaelőkészítési eljárások. A környezetanalitika számára fontos lenne tehát, hogy adott szennyezőanyagokra nézve – legalább szűrővizsgálatok szintjén –

egyszerű, költségkímélő és gyors teszteljárások álljanak rendelkezésre.

Hasonló problémákat vet föl egyes biomarker vegyületek műszeres analitikája is. A minimális kezelési dózisok megállapításának egyik eszköze a növények élettani állapotának felmérése. Erre nyújt lehetőséget a növényi hormonok szintjeinek követése az egyes növényi részekben. Az ilyen típusú vizsgálatok emellett fontos növénytani jellemzőkre adnak felvilágosítást, utalnak a kórokozókkal szembeni rezisztenciára, az időjárási viszonyokhoz és a környezethez való alkalmazkodásra, az öregedési folyamatokra stb. Az effajta növényi hormon kimutatás meglehetősen nehéz feladat, amely igen munkaigényes tisztítási lépéseket, hosszadalmas és költséges kromatográfiás eljárást és műszeres eszközöket igényel. A fentiek miatt növény kóréletti szempontból nagy fontossággal bír, hogy a növényi hormonok mennyiségi meghatározására egyszerűen kivitelezhető, nagy mintaelemzési kapacitású, kvantitatív módszerrel rendelkezünk.

A fenti kettős probléma közös megoldásához járulhatnak hozzá a kis molekulák kimutatására is alkalmas enzimes immunanalitikai (ELISA) módszerek, melyek a humán és állatgyógyászatban már elterjedten használatosak. Ez a technika a mezőgazdasági kémia és a környezetvédelem terén azonban csak az elmúlt évtizedben indult fejlődésnek [5-8]. A növényvédő szerek és egyéb kis molekulák ELISA kimutatása terén magyar eredmények is születtek [9-16].

Az immunkémiai módszerek alkalmazása számos előnyt rejt a hagyományos kromatográfiás módszerekkel szemben. A nem radioaktív immunanalitikai módszerek [17, 18] (pl. ELISA) legnagyobb előnye a gyakran tapasztalható igen magas érzékenysége, specificitása mellett, hogy tisztítási műveletek nélkül vagy csak minimális tisztítással vizsgálhatók azok a minták, amelyek a hagyományos analitikai módszereknél (GC, HPLC) bonyolult előkészítést igényelnek. Másik előnyük, hogy viszonylag gyorsan végrehajthatóak, és egyszerűsített változatban azonnali helyszíni vizsgálatot is lehetővé tesznek. A néhány órás időigényű laboratóriumi ELISA vizsgálat mennyiségi meghatározásra alkalmas, költségben pedig versenyképes lehet a bonyolultabb kémiai módszerekkel, mivel a mintakezelés és az analízis költségei lényegesen alacsonyabbak, így nagyszámú minta vizsgálata is olcsón végezhető.

Doktori munkám során meglehetősen tág tárgykörökben dolgozva a trifluralin, acetoklór és propanil herbicidek, valamint citokinin hormonosztályba tartozó két növényi hormon (zeatin-ribozid (ZR), izopentenil-adenozid (IPA)) kimutatására alkalmas immunanalitikai rendszer kidolgozásával; a triazol fungicidek (pl. miklobutanil), valamint a pirén (poliaromás szénhidrogén) környezetszennyező kimutatására kidolgozott ELISA

rendszerek alkalmazásával; illetve a trifluralin herbicid, a fenoxikarb inszekticid, valamint számos további növényvédő szer hatóanyag mennyiségi meghatározására alkalmas GC-MS módszer kidolgozásával foglalkoztam. Dolgozatomban mindezen területek közül a legjelentősebb két célkitűzésben, a trifluralinra, valamint a citokinin hormonokra érzékeny ELISA rendszerek kidolgozása során elért eredményeket ismertetem.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényvédő szerek

2.1.1. A növényvédő szerek általános jellemzése

A növényvédő szerek (peszticidek) intenzív felhasználása a mezőgazdaságban az elmúlt negyedszázad alatt következett be, de már az 1960-as években számos adat gyűlt össze a környezetkárosító hatásukról, mint a rovarok és gyomok rezisztenciájának megjelenése, a hasznos élőlények pusztulása, a talaj, a levegő, növényzet és a vizek szennyeződése. A növényvédő szerek – bioaktív vegyületek lévén – természetesen az emberre is hatással vannak; hiszen a peszticidmaradékok a táplálkozási láncban több úton is eljuthatnak az emberig. Ez is alátámasztja a monitorozás jelentőségét, annak elősegítésére, hogy a vegyszeres növényvédelem egészségügyi veszélyei az egész emberiség vonatkozásában minimalizálhatók lehessenek.

A növényvédő szer fogalom összetett: ide sorolunk minden olyan szert, amely alkalmas a haszonnövények, a termények és mezőgazdasági termékek károsodásának gátlására. A növényvédő szereket ezen belül annak alapján oszthatjuk fel, hogy milyen jellegű kártevővel szemben nyújtanak védelmet. Így megkülönböztetünk: gyomirtó szereket (herbicidek), gombaölő szereket (fungicidek), állati kártevőket pusztító szereket (zoocidek), ezen belül rovarellenes szereket (inszekticidek), atkaölő szereket (miticidek), fonalférgek elleni szerek (nematocidek); baktériumölőket (baktericidek), víruspusztítókat (viricidek) stb.

A növényvédő szereket a legkritikább esetben használják tisztán, a legtöbbször különböző segédanyagokkal befolyásolják tulajdonságaikat. Ezekkel az oldékonyságot, a nedvesítőképességet, a tapadóképeséget fokozzák, némely esetben egyszerűen csak hígítják a hatóanyagot. Emellett bevitelük elősegíti a kijuttathatóságot (pl. permetezhetőséget), vagy növelheti a hatásosságukat azáltal, hogy a segédanyag révén kevésbé pereg le a levelekről, mivel nedvesít olyan felületeket, melyek a nagy lipidotartalom miatt a tiszta hatóanyag számára nedvesíthetetlenek lennének. Emellett némely segédanyag gátolja a hatóanyag bomlását. Ezt a technológiai folyamatot, amely során a növényvédő szer elnyeri végleges – felhasználásra alkalmas, segédanyagot is tartalmazó – formáját, formálásnak nevezzük. Az ide vonatkozó irodalom szabatosabb definíciója szerint, a peszticidek formálása az a művelet, amelyben biológiailag aktív hatóanyagokat megfelelő segédanyagok alkalmazásával kívánt összetételű, meghatározott fizikai, kémiai, fizikai-kémiai és kolloidikai paraméterekkel bíró olyan terméké alakítjuk, amely a felhasználáskor a

legkevesebb hatóanyaggal, a környezetet kímélve gazdaságosan képes a célzott biológiai hatást optimálisan biztosítani [3].

Látható, hogy a hatóanyag és a szer között lényeges különbség van. A hatóanyag az a vegyület, mely a peszticid hatását kifejti; a szer pedig az a késztermék, amellyel a felhasználó találkozik. Példaként megemlítem a trifluralin nevű hatóanyagot, amely a Magyarországon engedélyezett Treflan, Oliterf, Triflurex valamint Ipifluor készítményekben megtalálható [19]. Nagyon fontos a megfelelően megválasztott adalékanyag összetétel és arány, valamint a kikészítési (formulázási) technológia helyes megválasztása, hiszen mindezekről nagymértékben függ a szerek hatékonysága.

2.1.2. Trifluralin

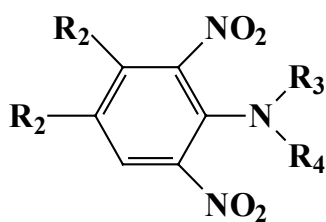
A *trifluralin* fantázianevű vegyület a Magyarországon engedélyezett Ipifluor 48EC, Olitef, Olitref 480EC, Treflan, Treflan 48EC, Triflurex 26EC és Triflurex 48EC készítmények hatóanyaga.

A vegyület fizikai-kémiai adatai:

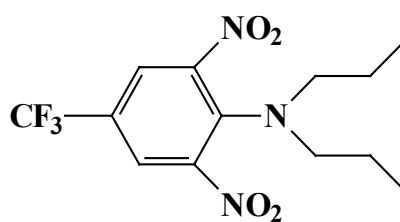
Kémiai név: *N,N*-dipropil-2,6-dinitro-4-trifluor-metil-anilin

móltömeg: 335,3 g/mol
összegképlet: C₁₃H₁₆F₃N₃O₄
megjelenés: narancssárga, kristályos
olvadáspont: 48,5-49 °C
(tech. 43-47,5 °C)
forráspont: 96-97 °C/24Pa

sűrűség: 1,36 g/cm³(22 °C)
lobbanáspont: 151 °C zárt térben
153 °C nyitott térben
oldhatóság: vízben 0,184 (pH5); 0,221 (pH7);
0,189 (pH9) [ng/l]
Henry állandó: 15 Pa.m³/mol



(1)



(2)

1. ábra A dinitro-anilin herbicidek (1) és ezen belül a trifluralin (2) szerkezeti képlete

A trifluralin (Treflan) (1. ábra, 2) hazai gyártású, 1963 óta alkalmazott dinitro-anilin herbicid. A dinitro-anilin herbicidek (1) a sejtek osztódását gátolják, hatásmechanizmusuk alapján elsődlegesen növekedésgátló gyomirtó szerek; a sejtosztódás legfontosabb momentumára, a DNS replikálódásra, valamint a növekedéshez elengedhetetlenül szükséges RNS- és fehérjeszintézisre vannak hatással. A nukleinsav anyagcserét mintegy 10 ppm-ig serkentik, de ennél nagyobb koncentrációban már gátolják. A DNS-től függő RNS- és fehérjeszintézist hormonok szabályozzák. Ezzel függ össze a dinitro-anilinek másodlagos hatása: a növények gyökereiben megbontják a hormonok közötti egyensúlyt azáltal, hogy kölcsönhatásba lépnek a hormonok által indukált enzimekkel, gátolva azok működését.

Preemergensen alkalmazva számos gyom visszaszorítására használják különböző kultúrnövények, így zöldségek, gabonák csonthéjasok, citrusfélék esetén. A trifluralin káros ökotoxikológiai, endokrin és immunmoduláns hatásaira az utóbbi időben derül fény [20-27], s a vegyület felkerült az EU COM (2001) 262. sz. listájára, a bizonyítottan vagy vélelmezett endokrin zavaró hatást (ECD) mutató antropogén vegyületek közé. A trifluralin (CN RN 1582-09-08) az ECD listában, mint vélelmezett ECD ágens szerepel. Ennek nyomán a készítmény sorsát – más dinitro-anilin herbicidekkel egyetemben – a környezetben részletesen tanulmányozták. [28-37]. Bár a tiszta trifluralin – az állatokon végzett orális, bőrön keresztüli, illetve inhalációs kísérletek alapján – nem toxikus [37], bizonyos formában, az egyes termékekben sokkal toxikusabb lehet, mint maga a technikai vegyület, és bizonyos adagú kezelések, vagy hosszabb expozíciós idő elteltével máj és vesekárosodást okozhat [22]. Emellett a vörös vértetek számának csökkenését, a Met-hemoglobin mennyiségének emelkedését okozza [21], a T-limfociták blasztogenezisének defektusát válthatja ki [25, 26].

A hatóanyag biológiai lebontása során a különböző degradatív útvonalak közötti különbség inkább kvantitatív, mint kvalitatív, végső soron ugyanahhoz a végtermékhez vezetnek *N*-dealkiláció, a nitrocsoport redukciója, hidroxilálódás és ciklizálódási reakciók során [39]. Minthogy a trifluralin lebomlási termékei nem mutatnak jelentős felhalmozódást, ez arra utal, hogy e bomlástermékek további degradációs mechanizmusok szubsztrátjai [30, 32].

A trifluralin vízzoldékonysága kicsi (1 ppm alatt), ellenben igen erősen adszorbeálódik a talajszemcsék felületén [31, 32, 40, 41]. Emiatt annak ellenére, hogy a trifluralin fotodegradációs utak szubsztrátja vízben és talajban, valamint mikrobiális lebomlási folyamatok résztvevője [28, 29, 35, 36, 42, 43], talajban mérsékelten perzisztens [33, 34].

Anaerob körülmények mellett a trifluralin felezési ideje 25 nap, míg aerob körülmények mellett 116 nap. A degradáció tehát anaerob körülmények között gyorsabb, amit eltérő laboratóriumi körülmények között mért felezési idők is alátámasztanak. A trifluralin lebomlási (közti) termékei talajban az α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-*p*-toluidin (a legfőbb metabolit); az α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-*n*-propil-*p*-toluidin, az α,α,α -trifluoro-*N,N*-dipropil-5-nitrotoluen-3,4-diamin és az α,α,α -trifluoro-*N,N*-dipropiltoluen-3,4,5-triamin [44]. Az összetett degradációs mechanizmus miatt [30, 32] a talajban komplex mátrix alakul ki [43]. Az állatokban és növényekben a trifluralin lebomlása hasonló módon történik, mint a talajban. Állati szervezetekből 72 órán belül, vizelettel a bejuttatott mennyiség 70%-a, míg széklettel a 15%-a ürül.

A hatóanyag kimutatására főként érzékeny kromatográfiás (HPLC és GC/MS) illetve spektroszkópiai eljárások használatosak [45-55], de egy korábbi, szintén trifluralin kimutatását célzó ELISA kezdeményezés alapján [56] hasznosnak látszott érzékeny immunanalitikai rendszer kifejlesztése.

2.2 Növényi hormonok

2.2.1. A növényi hormonok általános jellemzése

A többsejtű szervezetek, így a növények normális növekedésének és fejlődésének, azaz a belső szabályozásnak elengedhetetlen feltétele a sejtek közötti információcsere, valamint az, hogy a környezet felől őket ért ingerekre megfelelően reagáljanak [57]. Ennek a kölcsönhatásnak a felbomlása rendellenességhez vezethet. Az információátadás molekuláris szinten, hormonok segítségével megy végbe. A hormonok kis mennyiségben is hatásos, bonyolult endogén vegyületek, amelyek rendszerint a termelőési helyüktől távol, egy másik szervben illetve szövetben fejtik ki hatásukat.

A növényi hormonok számos tekintetben különböznek az állati hormonoktól [58]:

- ☐ A növényekben nincsenek belső elválasztású mirigyek, így a hormontermelés nem korlátozódik egy-egy speciális szervre vagy szövetre, ugyanazt a hormont több szövet is szintetizálja.
- ☐ A transzlokáció több úton is lehetséges
- ☐ Jellemző tulajdonságuk a hatáspecifitás hiánya, tehát ugyanazon a hormon sokféle szabályozómechanizmusban vesz részt, különböző szövetekben és szervekben a reakciók egész sorát válthatja ki, szabályozó hatása nem korlátozódik egyetlen életműködésre.
- ☐ A szabályozás két ellentétesen ható rendszer jelenlétének és működésének az eredménye, a serkentés és a gátlás eredője. Jellemző a növényi hormonok egymásra gyakorolt hatása.

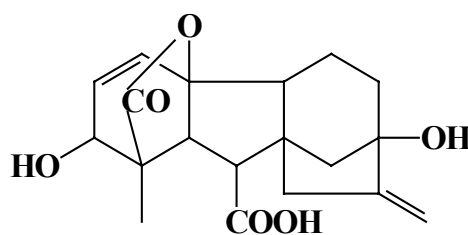
Az indolil-ecetsav általánosan elterjedt a magasabb rendű növényekben, de a mikroszervezetek is termelik, valamint az állatok triptofán-anyagcseréjének egyik mellékterméke. Az auxinok közé tartozik az ecetsavon kívül az indolil-propionsav (2. ábra, 4) valamint a fenil-ecetsav.

A legintenzívebb auxinszintézis a fiatal, kifejlődőben lévő levelekben tapasztalható. A korról az auxinszint jelentősen csökken, majd az idős növényekben szintén magas. Az auxinszintézis fő centrumai a fiatal, kifejlődőben levő levelekben, termésekben, magvakban, a szárban pedig a differenciálódás zónájában találhatók. A szintetizálódott hormonok a szár háncselemeiben a gyökerek felé, a gyökerekben pedig a gyökércsúcs irányába szállítódnak. Az auxinkoncentráció szerepet játszik a foto- és a geotropizmus szabályozásában is, azonban nem tekinthető kizárólagosan ezek háttérének.

Az auxinok kötött és szabad formában fordulnak elő. A kötött auxinok inaktívak és sokkal stabilabbak, s elsődleges a szerepük a megfelelő szabad auxinkoncentráció biztosításában.

2.2.3. A gibberellinek

A növényi sejtek megnyúlását (elongációját) szabályozó másik sejtcsoportot alkotják a gibberellinek (3. ábra, 5). A magasabb rendű növényeken kívül számos baktérium, alga és gomba is termel gibberellin aktivitású vegyületeket, de e hormonok többsége csak a magasabb rendű növényekben fordul elő. Megtalálhatók a gyökerekben, a hajtásokban, a levelekben, a fiatal virágokban, a magvakban és a termésekben egyaránt. A gibberellin a fiatalabb levelekben szintetizálódik, aktív formává pedig a gyökerekben alakul.



(5)

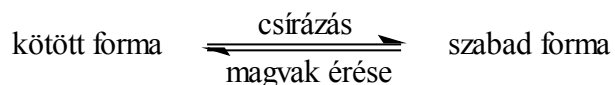
3. ábra A gibberellinsav (5) képlete

A gibberellinek két csoportra oszthatók:

- a) 19 szénatomosak, melyek gyűrűjében savlabilis belső laktolgyűrű található. E hormonok aktívabbak.
- b) 20 szénatomosak, melyekben laktolgyűrű nem található.

Az ebbe a hormoncsoportba tartozó vegyületek csak a karboxil- és a hidroxilcsoportok számában különböznek egymástól. A gibberellinek szabadon és kötött

formában is előfordulnak. A kötött gibberellinek a szabad gibberellineknek glükózzal alkotott észterei, fiziológiailag inaktívak.



A hormonszint szabályozásának a szintézis és az inaktíválás együttes feltétele. Ezen kívül szerepe van a szabályozásban az antigibberellineknek is: e vegyületek teszik lehetővé, hogy még igen nagy koncentráció esetén is jelen lehessenek a gibberellinek anélkül, hogy károsítanák a szöveteket.

A növények korának függvényében a gibberellinek serkentik mind a sejtosztódást, mind a sejtnagyobbodást, így serkentik a levél növekedését, s szerepük van a magvak raktározott tápanyagának mozgósításában.

- a) a merisztémákban (osztódó szövetekben) stimulálják a sejtosztódást
- b) a már nem osztódó, de még nem differenciálódott sejteknél serkentik a sejtnagyobbodást
- c) a differenciálódott szövetek a gibberellinre érzéketlenek

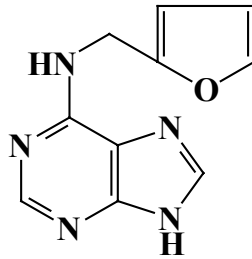
A gibberellinkoncentráció eloszlása nem egyenletes: az alaptól a csúcs mögötti részek felé haladva növekszik. A megnyúlásos növekedés és a hormonkoncentráció között egyenes arányosság áll fenn.

Gibberellines kezeléssel elérhető a genetikailag törpe növények megnyúlásos növekedése. Intenzív megnyúlást azonban csak akkor eredményeznek, ha auxin is jelen van.

2.2.4. A citokininek

A citokininek közé tartoznak az optimális auxinkoncentráció mellett citokinézist, azaz a sejtosztódást serkentő hormonok. Előfordulásuk, biológiai aktivitásuk nem korlátozódik a magasabb rendű növényekre [59-61].

Haberlandt már 1913-ban [hiv. 59] megállapította olyan anyagok létét, amelyek újbóli osztódásra készítetnek olyan differenciálódott sejteket, illetve szöveteket, amelyek ez irányú tevékenységüket már befejezték. Ezeket az ismeretlen anyagokat *sebhormonnak* nevezte el. 1955-ben a dohány bélszövetéből, olyan purinszármazékot izoláltak [hiv. 59], ami már igen kis koncentrációban serkenti a sejtosztódást. Mivel ez a vegyület a sejtekben kariokinézist indukál, *kinetinnek* nevezték el. A kinetin (6-furfuril-amino-purin) (4. ábra, 6) szintetikusán előállítható, természetes körülmények között ritkán fordul elő.

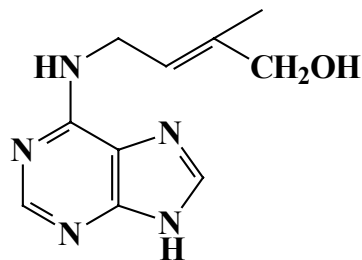


(6)

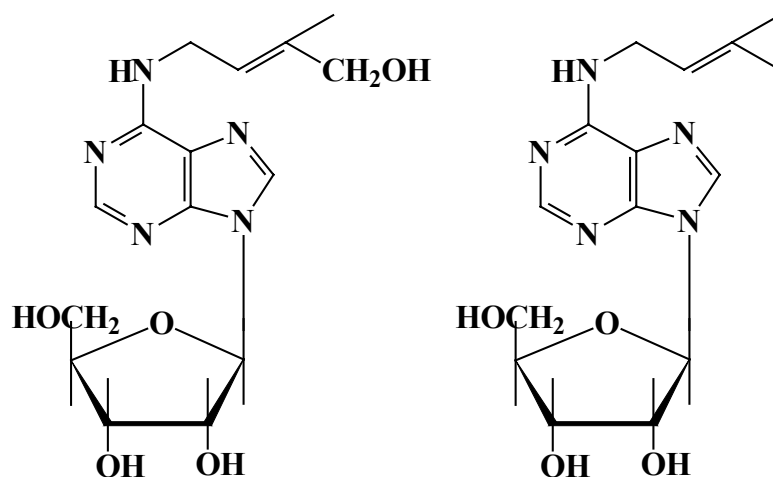
4. ábra A kinetin (6) képlete

A természetes citokininek legnagyobb mennyiségben az osztódásban levő szövetekben fordulnak elő, csírázó magvakban, termésekben, gyökerekben, növényi nedvekben.

Az első természetes citokinin, a *zeatint* (5. ábra, 7) éretlen kukoricaszemekből Letham izolálta [62]. Majd az élesztőből, spenótból és borsóból az izopentil-adenozint (IPA) (5. ábra, 9) Zachau [59] különítette el.



(7)



(8)

(9)

5. ábra A zeatin (7), a zeatin-ribozid (8) és az izopentenil-adenozin (9) képlete

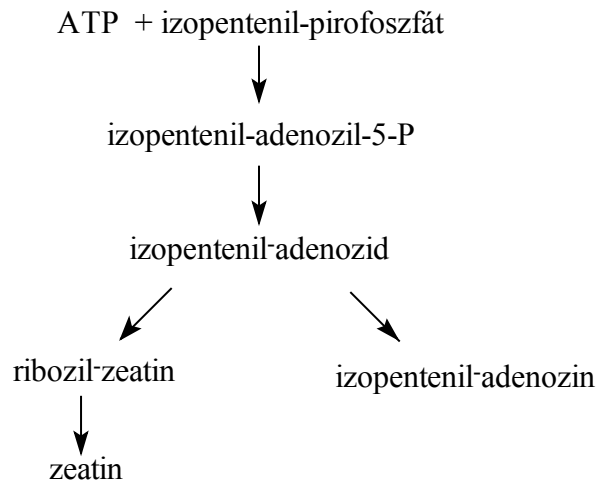
A növényi sejtek osztódását serkentő természetes citokininek izopentil oldalláncot viselő adeninszármazékok. A csoporton belül a zeatin – a növényekben legáltalánosabban előforduló citokinin – az oldalláncban OH-csoportot tartalmaz. A zeatin és az IPA öttagú gyűrűjéhez ribóz illetve ribóz-foszfát kapcsolódhat. Emellett az öttagú gyűrűhöz glükóz is kötődhet (citokinil-glikozidok).

2.2.4.1. A citokininek bioszintézise és biokémiai lebontása

A citokininek *bioszintézise* a merisztémákban illetve az aktívan növekedő szervekben történik. A citokinin szintézisének elsődleges helye a gyökér, bár a szintézisre képesek a termések és a magvak is [59, 61]. Vegetatív állapotú növények könnyezési nedvében kimutathatók, amiből arra lehet következtetni, hogy a gyökerekben szintetizálódott citokininek a xylemnedvben polárosan a föld feletti szervekbe szállítódnak. A vegetatív szervek citokininszintje tehát a gyökerekben folyó citokininszintézis függvénye. Ezt igazolja:

- a) A gyökértelenített hajtások, hajtás- és levéldugványok gyorsan öregednek, a hajtás vegetációs kúpjában a sejtosztódás leáll. Ha azonban a dugványon járulékos gyökerek képződnek, az öregedés folyamata megszakad, a hajtás vegetációs kúpjában a sejtosztódás megindul, tehát már a fiatal járulékos gyökerek is képesek ellátni a dugványt citokininekkel.
- b) Nitrogén- és bórhiányos növények könnyezési nedvében kevesebb citokinint találtak, ami a hajtás csökkent növekedésével párosul.
- c) Több egyéves növényenél mutatták ki, hogy a virágzás időszakában a hajtásba szállított citokininek mennyisége csökken.

A citokininek bioszintézisének menete: a citokininek szintézisének kiinduló vegyületeit – amelyek megegyeznek gibberellinek és az abszcizinsavak prekursoraival – az izopentenil-pirofoszfátot és az AMP-t (adenozin-monofoszfát) Taya és mtsai már 1978-ban megtalálták a nyálkagombák sejtmentes kivonataiban [63], Chen és Kristopeit pedig 1981-ben izolálta [64] a folyamatban részvevő két specifikus enzimet. A szintézis első lépésében az AMP-ből és az izopentenil-pirofoszfátból enzimek segítségével lejátszódó folyamatban, foszfátcsoport kilépése közben izopentenil-adenozin-monofoszfát, majd az ezt követő ribóz lehasadás után izopentenil-adenin (izopentenil-adenozin) keletkezik. Az így keletkezett IPA izopentenil oldallánca hidroxilálódhat, így zeatin-ribozid, továbbá a ribózgyűrű lehasadásával zeatin keletkezhet. A folyamat vázlata:



A citokininek biokémiai *metabolizmusa* az esetek többségében vagy glikozid-konjugáció útján, vagy pedig az izopentenil-oldallánc lehasadásával történik [59, 64, 65]. Az első esetben a – saját biológiai aktivitással rendelkező és a hormon transzportját meghatározó – glikozidok raktározódhatnak vagy kiválasztódhatnak. Glikozidkonjugátumaik formájában a szabad citokininbázisok inaktiválódnak, ám a lebontó enzimekkel szemben védettek. Az *N*-dealkilálási lebontási mechanizmus során a képződő purinvázat xanthin-oxidázok oxidálják inaktív uronsavvá majd karbamiddá. További indukálható specifikus lebontó enzim a citokinin-oxidáz, amely – az adott szövet citokinin-tartalmától függően – genetikai szabályozás alatt áll.

2.2.4.2. A citokininek fiziológiai szerepe

A citokininek *fiziológiai szerepe* az auxinnal együtt a merisztematikus szövetek aktivitásának szabályozása. Az auxin és a kintinkoncentráció arányának változtatásával a szövettényészetekben gyökerek és hajtások differenciálódása indukálható. A serkentett növekedés lehet normális és patológiás is. A táptalajhoz meghatározott mennyiségű auxint adva a bevitt kivonat citokinin-tartalmától függően növekszik a sejtek száma, így citokininekkel kezelt tenyészetek tömeggyarapodásának figyelemmel követésével meghatározható a citokininkoncentráció.

A citokininek:

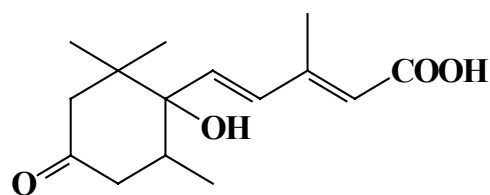
- a szártágok megnyúlását gátolják, és az auxinnal ellentétben az apikális dominanciát (a csúcshajtás gátlása a hajtástengely rügyeire) megszüntetik,
- módosítják a gének kifejeződését,
- befolyásolják a tápanyagok transzportját. Kinetinnel kezelt levelekben élénkül az anyagcsere és a tápanyagok a kezeletlen levélrészektől a nagyobb anyagcseréjű helyekre vándorolnak,

□ szerepük van a szervek fiatal (juvenilis) állapotának fenntartásában, szeneszcenciagátlók:

gyökfogóként gátolják a szabadgyökök felhalmozódását,
a méregtelenítő enzimek aktivitásának csökkenését mérsékelik,
akadályozzák a lipogénáz (szabadgyök-termelő) aktivitásának növekedését.

2.2.5. Az abszcizinsav

Az abszcizinsav (6. ábra, 10) a legjelentősebb és a legtöbb növényi szervben előforduló természetes inhibitor. Hatását a gibberellinokkal (vagy a szintézisét, vagy az általa katalizált biokémiai folyamatokat gátolja) és a citokininokkal együtt fejti ki.



(10)

6. ábra Az abszcizinsav (10) képlete

A magasabb rendű növényeken kívül a mohákban és a harasztokban is megtalálható. A zárwatermő növények valamennyi szervében előfordul, hatása a nyugalmi állapotokra irányul. Gátolja a rügyek idő előtti kihajtását, a levelek és a fiatal termések leválását, a gyümölcsérését, a gázcsere nyílások záródását, emellett a fás növények téli nyugalmi állapotának egyik fő szabályozója. Ezen felül fontos szerepe van a geotropizmus szabályozásában.

Kedvezőtlen környezeti feltételek hatására a növények abszcizinsavtartalma nő, az ekkor keletkező abszcizinsavat *stresszhormonnak* nevezik.

2.2.6. Az etilén

Az etilén szintén növekedést serkentő hatást mutat. E gázhalmazállapotú hormont a legtöbb növényi szervezet termeli. A növények etiléntermelése szoros összefüggésben áll a gyümölcsök beérési folyamatával is, arra serkentőleg hat.

A növényi szöveteket bármilyen sérülésre, vagy fertőzésre az etiléntermelés fokozásával válaszolnak. Az ilyen folyamat során keletkezett etilént *stresszetilénnek* hívják.

Az etilén fiziológiai hatása az érési folyamatok gyorsításán kívül:

- serkenti bizonyos magvak csírázását, a termésérését és a levelek leválását,
- indukálja a virágképzést,
- stimulálja a gyökérszőrök kialakulását és a járulékos gyökerek képződését,

- gátolja a hajtások megnyúlásos növekedését,
- módosítja a virágok ivarjellegét.

Az etilén- és az auxintermelés nagysága a fiatal növények esetén szorosan összefügg. Ugyanis amennyiben csökken az auxin mennyisége, az az etilénszint csökkenését is maga után vonja. Ugyanez a kapcsolat figyelhető meg ellentétes irányú változás esetén is. Így elkerülhető a növények túlzott mértékű növekedése, a torz formák kialakulása, valamint a szövetek és a szervek egyenlőtlen fejlődése.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy

- az auxinok és a gibberellinek csoportjába tartozó hormonok a sejtek megnyúlásos viselkedésére serkentőleg hatnak, ezek tehát *növekedési hormonok*,
- a citokininek (ebbe a csoportba tartoznak doktori dolgozatom szűkebb tárgykörébe tartozó zeatin-ribozid és izopentenil-adenozin is) az anyagcserefolyamatok serkentésével elősegítik a sejtek fiatal (juvenilis) állapotának fenntartását, tehát úgynevezett *juvenilhormonok*,
- az ellentétes irányú folyamatok serkentése tévén az öregedést elősegítő abszcizinsav és az etilén pedig úgynevezett *szenescencia (öregedési) hormonok*.

2.3. Az immunanalitika alapjai

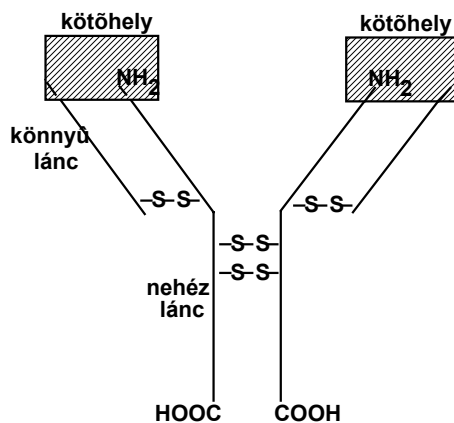
Az immunanalitikai módszerek az analitika új ágát képviselik. Ezek a módszerek a klinikai kémiai analízisben különlegesen fontos szerepet játszanak, a biológiai folyadékokban fehérjék, szteroid hormonok, gyógyszerek stb. érzékeny és szelektív meghatározásában. Egyre inkább terjednek e módszerek a környezetvédelmi analitikában is, ugyanis a különböző vegyszer- és növényvédő szer maradványok meghatározása szintén igen nagy szelektivitást igényel [66].

Az immunológiai kimutatás azt az alapvető mechanizmust állítja az analitikai biokémia szolgálatába, amellyel a magasabb rendű szervezetek (gerincesek) – specifikus reakciók révén – védekeznek a testükbe került idegen anyagokkal szemben. Egy idegen anyag (antigén) ellen a szervezet immunrendszere az ún. humorális immunválasz során specifikus ellenanyagot (antitesteket) termel [67], s az immunoglobulinok (antitestek) az antigénnel, azaz a kórokozóval, annak toxinjával vagy más testidegen makromolekulával reagálnak. Az így termelődött antitest az immunhatást kiváltó antigénnel immunkomplexet képez.

Az immunológiai reakció, az antigénellenanyag reakció nagyfokú szelektivitása miatt alkalmas analitikai célokra, tehát az antigén illetve az ellenanyag meghatározására. Az

immunanalitikai vizsgálatokhoz a gerinces állatok szérumból kinyert szelektív antitesteket használnak fel. Az ellenanyag-molekula (antitest) sajátos felépítésű, multifunkcionális fehérje, amely specifikusan meg tudja kötni az antigént. A szérumfehérje elektroforézisekor az antitestek a β - és γ -globulinokkal együtt futnak, ezért nevezték el őket immunglobulinoknak (Ig). Az immunglobulinokat kétféle polipeptidlánc építi fel, a nagyobb molekulatömegű H-lánc (*heavy*= nehéz) és a kisebb molekulatömegű L-lánc (*light*= könnyű). Normál szérumban a legnagyobb mennyiségben az immuno- γ -globulin (IgG) fordul elő, amely két-két L- (214 aminosav) és H-láncból áll. Emellett a H-láncokra tekintettel megkülönböztetünk még IgA, IgM, IgE, IgD illetve IgY (madarakban) immunoglobulinokat.

Az IgG különösen szekunder reakciónál jön létre. Embernél egyedül ez a fajta immunoglobulin képes membránon átjutni, s ezzel a placentán át az újszülötteknek is védelmet nyújtani. Az IgM először mindig a primer immunizációnál jelentkezik (“azonnal-antitest”), de 1-2 nap után a tartósan képződött IgG helyettesíti, meghatározott (izo)antigének – például az emberi AB0-vércsoportok, valamint *Salmonella* és *Escherichia coli* antigénjei – elleni esetek kivételével. Az IgA az egyetlen szecernálható antitest, így megtalálható a nyálkahártya felszínén és a tejben. Az IgD a limfociták antigénreceptora, míg az IgE megfelelő antigén jelenlétében azonnali allergiás reakciókat vált ki (szénanátha).



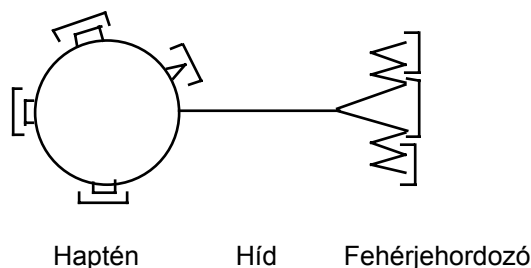
7. ábra Az immuno- γ -globulin (IgG) szerkezete

Az IgG molekula két antigénkötőhellyel rendelkezik. A kötőhelyek térszerkezete a felépítésükben részt vevő aminosavak számától, elrendezésétől függ. Néhány aminosav cseréje jelentősen befolyásolja az antigénkötőhely tulajdonságait, így számtalan, különböző specifikus antitest létezik.

A szervezet antitestjeinek specifikusbeli variabilitása annak a kb. 10^6 kombinációs lehetőségnek a következménye, amely az L- és H-láncok variábilis részei mindegyikének mintegy 1000 különböző, genetikailag fixált szekvenciaszakaszából adódik.

Az immunrendszer csak nagyobb molekulatömegű immunogénekre ad immunválaszt.

A kisebb molekulájú vegyületek (haptének) önmagukban nem váltják ki az antitest termelését, azonban nagy molekulahordozóhoz kapcsolva komplett antigénné (immunogénné) alakíthatók. Hordozó anyagként általában nagyobb méretű fehérjemolekulák használhatóak, és az így kapott fehérje konjugátumokkal végezhető el az immunizálás.



8. ábra A kis molekulákkal kapcsolt immunogének (haptén-hordozó konjugátum) szerkezete. (A szögletes zárójel a különböző antigén helyeit jelképezi.)

Az immunanalitikai módszereket molekuláris fehérjék és kis molekulák kimutatására egyaránt elterjedten használják. Ezen belül számos jelzett antigéneken vagy antitesteken alapuló eljárást fejlesztettek ki és tökéletesítettek. A kialakult immunkomplex analitikai meghatározásában a problémát a detektálás jelenti, mivel a komplex kialakulásának nincs semmilyen könnyen mérhető végterméke. Az eljárásokban tehát valamilyen mesterségesen bevitt jelölés szükséges. A detektálás jellegétől függően a nagy érzékenységű és szelektivitású vizsgálatokon belül – egyebek között – a radioimmunoassay (RIA), a fluoreszcencia-immunoassay (FIA) és az enzim-immunoassay (EIA) rendszerek egyaránt használhatók.

Az elsőként használt jelöléstípus az izotópos jelölés volt. A radioimmunanalitika alapja egy antigén és antitest közötti reverzibilis immunkémiai reakció [68]. A RIA eljárásban a vizsgálandó vegyület ellen nyert specifikus antitesteket reagáltatnak a mintában jelenlevő célvegyülettel, valamint annak radioizotóppal jelzett származékával. A rendszerben egyszerre jelenlevő jelzett és hideg antigén vetélkedik az antitest kötőhelyeiért (kompetíció). A reakció az egyensúly eléréséig tart. Így mosás után a radioaktivitást lemérve lehet meghatározni a mintában levő antigén mennyiségét.

A RIA segítségével kis mennyiségű (10-1000 μ l) mintából nagy érzékenységgel (10^{-6} - 10^{-12} g/ml) és szelektivitással, pontosan és reprodukálhatóan lehet meghatározni a mérni kívánt anyagot [68]. A RIA, amely mind kis, mind nagy molekulatömegű vegyületek népszerű és érzékeny kimutatási módszerévé fejlődött, különösen alkalmas nagy számú minta vizsgálatára, de a reagensek rövid felezési ideje, a nagyon komoly, drága berendezés, a detektáláshoz szükséges folyadékszcintillációs műszer költsége és a szigorú biztonsági

követelmények, melyek az izotóp használatánál szükségesek, majdhogynem kizárják a RIA használatát a kisebb laboratóriumokban.

A FIA módszer működési elve hasonlít a RIA módszeréhez, azzal a különbséggel, hogy a RIA-ban alkalmazott jelzett izotóp helyett itt fluoreszcens jelzõt kapcsolnak az antigénhez, mely által a módszer különösen alkalmas a fertõzõ betegséget okozó mikrobák gyors meghatározására illetve az antitestek szintjének mérésére [69]. Detektálására fluorimétert használnak.

2.4. Az ELISA technika

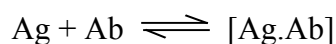
A kialakult immunkomplex analitikai meghatározására a legígéretesebbeknek a jelzõenzimek bizonyultak. A jelzõenzimeket lehetséges úgy kapcsolni antitestekre vagy antigénekre, hogy a komplex mind immunológiai, mind enzimaktivitással is rendelkezzen. Ezt az új enzimimmunoanalitikai eljárást a szakirodalomban többféleképpen nevezik a kivitelezés bizonyos fokú különbsége szerint [70, 71]:

- EIA: Enzyme ImmunoAssay (általános elnevezés)
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (heterogén eljárás)
- EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (homogén eljárás)

2.4.1. Az ELISA módszer elve

A legtöbb EIA technika legalább egy elválasztási lépést tartalmaz, amelyben az adott célvegyületre specifikus antitesthez kötõdött, szabad célvegyületet és annak konjugátumát (haptén-enzim vagy haptén-fehérje konjugátum) az antitesthez nem kötõdött frakciótól szeparálják. Így a kötött (vagy szabad) enzim aktivitása mérhetõvé válik. Az enzimaktivitást általában a jelzõenzim kromofõr szubsztrátjával adott színreakció segítségével mérik. Ennek alapján meghatározható az antitesthez kötõdött szabad antigén (a kimutatandó vegyület) mennyisége illetve koncentrációja a vizsgált mintában.

Az antigénantitest reakciók enzimes jelzésérõl 1970-1972-ben jelentek meg az elsõ publikációk [72]. A reakcióban kialakult antigénantitest komplex stabilitása függ a két komponens térszerkezetétõl. A reakció az egyensúly eléréséig tart, ilyenkor a reagensek egy része kötött, más része szabad formában van jelen. Az egyensúlyi állapot a tömeghatás törvényével írható le [73]:



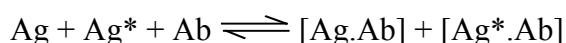
Ahol $[Ag]$: a szabad antigén koncentrációja

$[Ab]$: a szabad antitest koncentrációja

$[Ag.Ab]$: az antigén-antitest komplex koncentrációja

Ennek alapján megállapítható, hogy adott antitest mennyiség esetén az egyensúly elérése után az antigén megoszlása (kötött/szabad) függ a jelenlevő antigén össz mennyiségétől. Az ELISA technikánál az antitestet (vagy a haptént) valamilyen jelzőenzimhez kapcsoljuk, és a kimutatásra ezen enzim kolorimetrikus szubsztrátját alkalmazzuk.

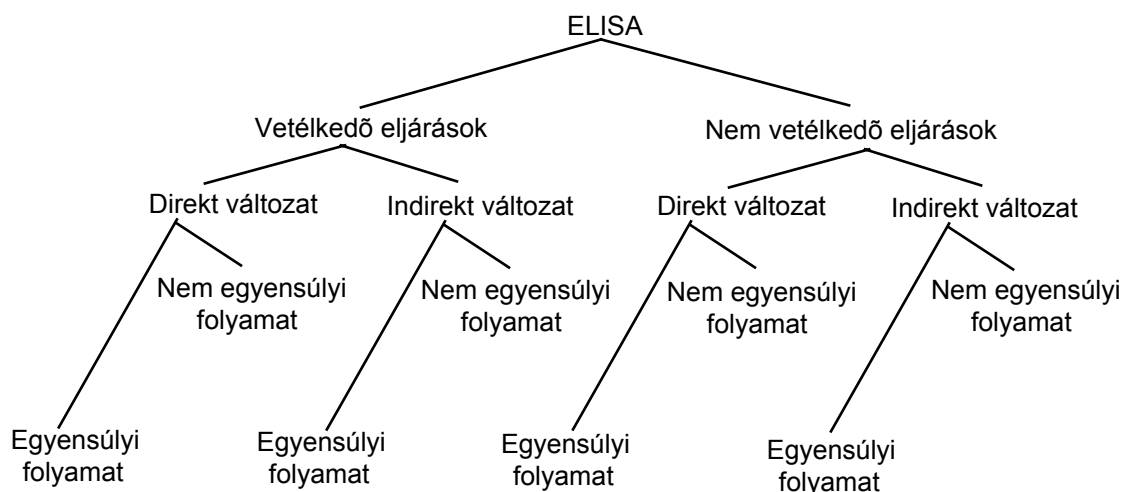
Az ELISA-rendszerben jelen levő jelzett (Ag^*) és nem jelzett antigén (Ag) kompetitív módon kapcsolódnak az antitestekhez. A reakció az egyensúly eléréséig tart.



Adott mennyiségű antitest és jelzett antigén esetén a kötött és a szabad frakció arányát a nem kötött antigén mennyisége szabja meg. Az eljárás rohamos terjedésével, a fotometriás módszer segítségével mind több különféle biológiailag hatásos anyag kis koncentrációjának meghatározása válik lehetővé.

2.4.2. Az ELISA rendszerek felépítése

Az ELISA rendszereknél a jelzés az antigéneken és az antitesteken egyaránt elhelyezhető. Ennek alapján az ELISA rendszerek két fő típusa az enzimmel jelzett antigén illetve enzimmel jelzett antitest alapú eljárások. Egy másik osztályozási szempont lehet az antigén-antitest egyensúlyi reakció kivitelezési módja (9. ábra).



9. ábra Az ELISA rendszerek osztályozása reakciókinetikai szempontból

E tekintetben meghatározó, hogy

- a jelzett antigén vetélkedik-e a nem jelzett antigénnel az antitest kötőhelyeiért vagy sem,
- a jelzőenzimet közvetlenül kapcsolják-e a célvegyületekre specifikus ellenanyaghoz, így az enzimaktivitásból lehet-e következtetni a minta antigén mennyiségére, vagy szükséges egy második, Ig-specifikus, enzimmel kötött ellenanyag is;
- az antigén és az antitest közötti reakció eléri-e az egyensúlyt vagy sem.

2.4.2.1. A vetélkedés (kompetíció) elvén alapuló ELISA eljárás

A kompetitív eljárásban az enzimmel jelzett antigént összekeverik a vizsgálati mintával, amely antigént tartalmaz. A mintában levő antigén versengeni fog az enzimmel kötött antigénnel a korlátozott mennyiségű antitestekért. A nem kötött antigéneket azután eltávolítják a rendszerből és szubsztrátot hozzáadva mérik a rendszer enzimes aktivitását. Az eljárás direkt és indirekt módon valósítható meg.

Az immobilizált antigén alapú változatban a szilárd hordozóhoz kötött antigén (Ag_{imm}), az enzimmel jelzett ellenanyagot (Ab-E) és a vizsgálati mintát, amely ismeretlen mennyiségű antigént (Ag_x) tartalmaz, reagáltatják egymással. Mivel az Ag_{imm} és az Ab-E mennyisége meghatározott, így az Ag_{imm} Ab-E komplex enzimaktivitása csökkeni fog a vizsgálati minta antigéntartalmának a növekedésével.

Az eljárás összetettebb, de gyakrabban alkalmazott változata (Second Antibody System) is hasonló felépítésű (10. ábra), ám itt a jelzett specifikus antitest (Ab-E) helyett jelzés nélküli specifikus antitestet (Ab) használnak, és a kialakuló Ag_{imm} -Ab komplexet egy második lépésben enzimmel jelzett anti-IgG antitesttel (Ab'-E) reagáltatják. (Utóbbi eljárást *indirekt* módszernek is szokás nevezni, utalva arra, hogy a jelzőenzimet nem a meghatározás alapját képező Ag-Ab komplex valamelyik tagján helyezik el.)

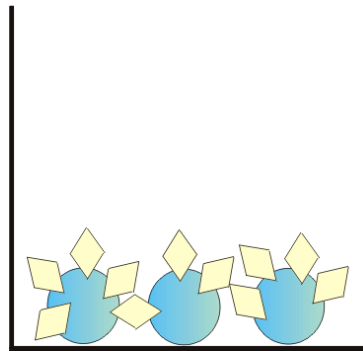
Az immobilizált antitest alapú módszer változatában hasonló elven szilárd hordozón kötött antitesttel (Ab_{imm}) is kialakítható ELISA rendszer. Itt az antitest kötőhelyeiért a szabad antigén (Ag_x) és annak enzimmel jelzett származéka (Ag-E) verseng. A módszer kivitelezését a 11. ábra szemlélteti. A rögzített antitest módszer előnye a gyakran tapasztalható magasabb érzékenység, hátránya viszont, hogy a jelzőenzim közvetlenül érintkezik a mintával, így az abban levő enzimgátló komponensek tönkretelhetik a mérést. (Ezt az eljárást *direkt* módszernek is szokás nevezni, hiszen a jelzőenzimmel közvetlenül a meghatározás alapját képező Ag-Ab komplex egyik tagját (Ab) módosítják.)

A gyakorlatban a gyorsabb kivitelezhetőség és a gyakran nagyobb érzékenység miatt a *direkt* eljárások használatosak, de nagyszámú *indirekt* módszer is ismeretes. Ugyanakkor a

direkt rendszerek kidolgozása valamivel bonyolultabb, hiszen ebben az esetben az antigén-enzim konjugátumot is elő kell állítani. A jelzőenzimmel keresztreagáló mintaközeg vagy a jelzőenzimet gátló célvegyület (haptén) esetén az *indirekt* eljárás a kedvezőbb.

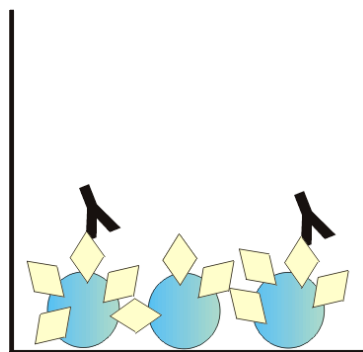
Indirekt kompetitív ELISA

1. Antigénnel érzékenyített lemez



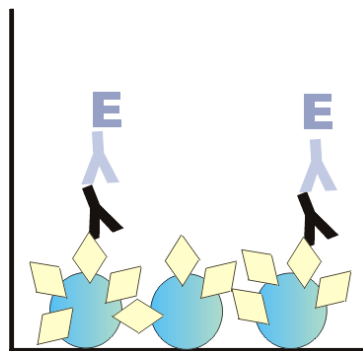
2. Mérendő minta (antigén), nyulakkal termeltetett antitest adagolása

3. Mosás

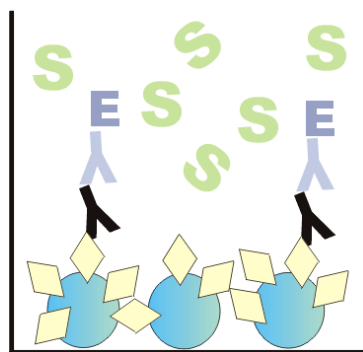


4. Enzimmel jelzett antitest adagolása

5. Mosás



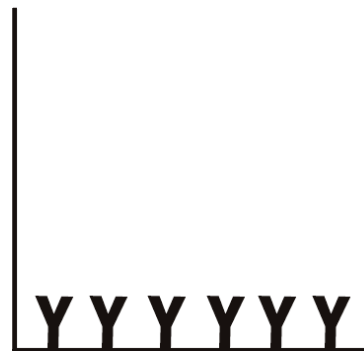
6. Szubsztrát adagolása, színreakció



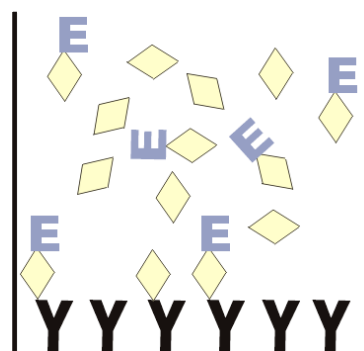
10. ábra Indirekt kompetitív ELISA sematikus váza

Direkt kompetitív ELISA

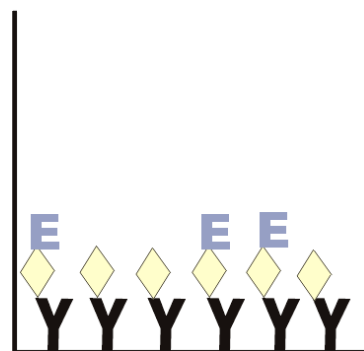
1. Antitestekkel érzékenyített lemez



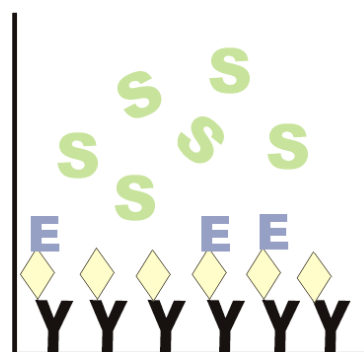
2. Mérendő minta (antigén), enzimmel jelzett antigén adagolása



3. Mosás



4. Szubsztrát adagolása, színreakció



11. ábra Direkt kompetitív ELISA sematikus váza

2.4.2.2. A nem vetélkedő (konszekutív) elven alapuló ELISA eljárás

A konszekutív ELISA rendszerben ugyanazokat a komponenseket használják, mint a vetélkedő ELISA rendszerben, csupán a komponensek adagolási sorrendje különbözik.

Egy lehetséges *direkt* eljárás, az ún. "kettős szendvics" technika elvi rajza a 12. ábrán látható. A szilárd hordozóhoz kötött specifikus antitesteket reagáltatják a vizsgálati minta antigénjeivel. Azután hozzáadják az enzimmel jelölt specifikus antitestet (konjugátumot) valamint az enzim szubsztrátját. A vizsgálati mintában levő célvegyület (antigén) megkötődik az immobilizált antitesttel érzékenyített szilárd fázison, majd a következő lépésben saját maga rögzíti az enzimmel jelölt antitestet is. Ez a technika analóg Miles és Hales [74] immunradiometriás analízismódszerével, ám csak olyan célvegyületekre alkalmazható, amelyek egyszerre több antigéndeterminánssal (epitóppal) rendelkeznek, vagyis egyszerre két antitest is kötődhet hozzájuk. A kismolekulájú vegyületek (növényvédő szerek) nem rendelkeznek ilyen tulajdonsággal.

A nem vetélkedő *indirekt* ELISA rendszer (kettős antitest szendvics-antiglobulin rendszer) is hasonló felépítésű, de ebben a módszerben a nem rögzített antitest enzim jelzést nem tartalmaz, ám a rögzített antitesttől különböző állatfajból származik. A kettős antitest szendvics komplexet egy, a szabad antitest IgG-jére specifikus és enzimmel jelzett második ellenanyaggal (Ab-E) reagáltatják. Az így képződő komplexet az Ab-E jelzőenzime segítségével detektálják. Ennek az az előnye, hogy elkerüli a specifikus antitest biokémiai jelölését, amely antitest esetleg kis mennyiségben vagy csak nagy hígításban állhat rendelkezésre. Természetesen ez a módszer is csak többszörös antigéndeterminánssal rendelkező célvegyületek (makromolekulák) meghatározására alkalmas.

Az antigén és az antitest között végbemenő folyamat egyensúlyi reakció, mely rendszerben az egyensúlyi állapot hosszú idő (5-72 óra) áll be [68], és ezt nem mindig lehet megvárni. Az inkubációs idő rövidítésével a reakciót olyan állapotban állítják le (a kötött és szabad frakciók szétválasztásával), amikor a rendszer még nem érte el az egyensúlyt. Ilyen esetekben a választott inkubációs időt minden esetben rendkívül szigorúan be kell tartani, mert kicsiny változása is jelentős pontatlanságot okoz a meghatározásban.

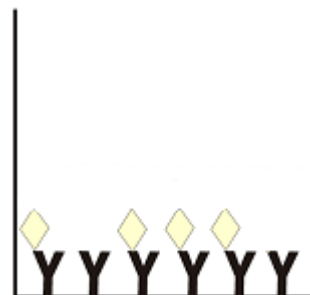
Konszekutív, "kettős szendvics" ELISA

1. Antitestekkel érzékenyített lemez



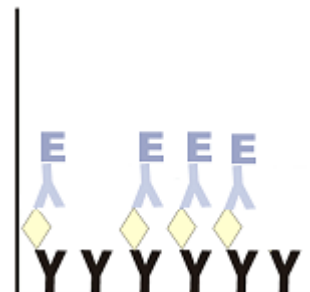
2. Mérendő minta adagolása

3. Mosás

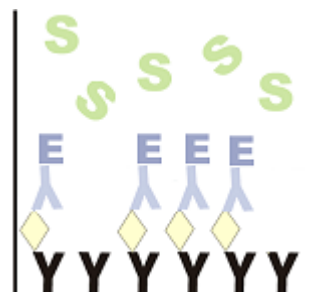


4. Enzimmel jelzett antitest adagolása

5. Mosás



6. Szubsztrát adagolása, színreakció



12. ábra Konszekutív ELISA eljárás "kettős szendvics" változatának sematikus váza

2.5. Molekulaspektroszkópiás módszerek

Az immunanalitikai szempontok figyelembevételével szükségessé válik a haptén-fehérje konjugátumok spektrofotometriás elemzése a konjugációs (fehérje-haptén kapcsolás) lépés eredményességének a vizsgálatára, azaz a fehérjébe beépült haptén mennyiségének, koncentrációjának meghatározása. A szabad illetve a fehérjébe beépült hapténmolekulák mennyiségi meghatározására vagy becslésére gyakorta abszorpciós spektrofotometriás módszereket alkalmaznak, de emellett az utóbbi időben tömegspektrometriás eljárások (MALDI ToF) is terjedőben vannak. Emellett régóta alkalmazott (ámbar meglehetősen pontatlan) módszer a hordozófehérjékben a haptén kapcsolásához felhasznált funkciós csoportok (főként amino- vagy tiolcsoportok) visszatitrlása is, amelyben a kapcsolási reakció során fogyott funkciós csoportok arányából következtetnek a beépült hapténmolekulák koncentrációjára a fehérjében. Amennyiben azonban a hapténmolekula saját, jellegzetes elnyelést mutat a látható vagy az ibolyántúli fény hullámhossztartományokban, úgy a hapténbeépülési mérésének egyik legelterjedtebb módja – könnyű kivitelezhetősége miatt, valamint annak köszönhetően, hogy a szükséges spektrofotométerek a legtöbb biokémiai laboratóriumban rendelkezésre állnak – az UV-VIS spektrofotometriás technika maradt.

2.5.1. UV-VIS spektrofotometria

Az ultraibolya (UV), látható (VIS) és infravörös (IR) abszorpciós spektrofotometria a molekulák által elnyelt ultraibolya, látható illetve infravörös sugárzás mérésén alapszik [66].

Az ultraibolya (10-380 nm) és látható (380-780 nm) tartományba eső elektromágneses sugárzás abszorpciója a molekulában az elektroneloszlás megváltozását eredményezi. Az UV fotonok energiája a molekula bizonyos elektronjait gerjesztheti, amelyek ezáltal alapállapotból egy magasabb energiájú állapotba kerülnek [75]. A mennyiségi meghatározás alapja, mint minden fényelnyelésen alapuló módszernél, a Lambert-Beer törvény [66]. A mérés során a sugárzás intenzitása a mintára jellemző hullámhossznál fellépő abszorpció miatt csökken. A Lambert-Beer törvény szerint monokromatikus sugárzás és nem túl nagy koncentrációk esetén a mintába belépő sugár I_0 intenzitása, annak abszorpciója következtében I -re csökken és a csökkenés mértéke az anyagi minőségnek, a fénysugár mintában megtett útjának és az abszorbeáló anyag koncentrációjának egyértelmű függvénye az alábbi összefüggés szerint:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ahol ε az adszorpciós (extinkciós) együttható, az anyagi minőségre jellemző és hullámhossztól függő érték. Ha a koncentrációt mol/dm³-ben adjuk meg, akkor moláris abszorpciós együtthatóról beszélünk. Az abszorpciós együttható egységnyi rétegvastagságú és koncentrációjú oldat elnyelése. Az l a rétegvastagságot [cm], c pedig a koncentrációt jelenti [mol/dm³].

2.5.2. Repülési idő tömegspektrométer

Az ionforrásban keletkező pozitív ionokat az ionforrás egy negatív U gyorsítófeszültség bekapcsolásával (pozitív tömegspektrometria) indítja az anilizátorba. Ha minden töltéshordozó azonos kinetikus energiára tesz szert, a különböző tömegű ionok különböző sebességgel ($v_1, v_2, \dots v_n$) repülnek és időben külön-külön érik el a detektort. Az U a gyorsítófeszültség, z a részecske töltése, m a tömege. A repülési idő adott ionforrás – detektor távolság (L) és gyorsítófeszültség mellett csak a fajlagos tömeg függvénye. Így a detektorban adott pillanatban mért intenzitás adott ionhoz rendelhető. Ez az analizátor nagyon gyors működésű, hiszen egy – egy ion repülési ideje a 10^{-5} – 10^{-7} s intervallumba esik. Az ionok relatív intenzitása (a legintenzívebb ionok intenzitásának százalékában kifejezett intenzitás) és a fajlagos tömege közötti kapcsolat szolgáltatja a vegyületre jellemző tömegspektrumot. Ez a fajta analizátor korábban csak tudományos jelentőségű volt, korunkban azonban egyre inkább reneszánszát éli és fontos szerkezetvizsgálati módszeré válik [76].

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Minthogy a gerinces immunrendszer csak mintegy 5 kD fölötti molekulatömegű vegyületekre válaszol antitestek termelésével [68, 71], a kismolekulájú célvegyületeket immunizálás előtt hordozófehérjékhez kellett kötni. A célvegyületek (a trifluralin valamint a zeatin-ribozid és az izopentenil-adenozin) hordozófehérjéhez való köthetőségének elérése érdekében a kis molekula "aktiválása" vált szükségessé, vagyis a kimutatni kívánt molekulákat mindhárom esetben kémiai kapcsolásra alkalmas funkciós csoporttal kellett ellátni. A hatékony immunfelismerés érdekében a származékoltatott molekuláknak (az ún. haptének) minél közelebbi szerkezeti hasonlóságot kell mutatniuk a kimutatni kívánt vegyülethez. Ezen kémiai módosítások – a célmolekulák eltérő kémiai szerkezetét tekintve – eltérő módon történtek.

3.1. Hapténmolekulák és fehérjekonjugátumok szintézise

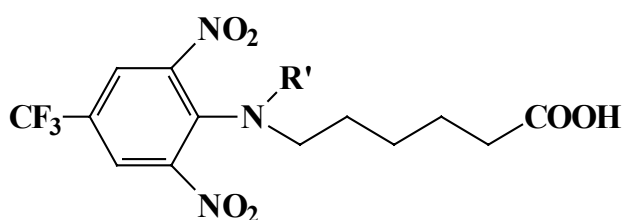
3.1.1. Fehérjék jellemzése

A konjugálási reakciók során háromféle fehérjéhez kötöttem a hapténmolekulákat, hemocianinhez, mely egy mélytengeri puhatestűből, a *Diotocardia* rendbe tartozó kürtőscsigából (*Fissurellidae*) származott (a puhatestű angol neve: *keyhole limpet*, így a fehérje rövidítése KLH), marha szérumból származó albuminhoz (*bovine serum albumin*, BSA), illetve ovalbuminhoz (OVA). Az egyes fehérjék eltérő immunogenitási tulajdonságokkal rendelkeznek. A KLH emlősökben általában önmagában is erősebb immunogenitást mutat, mint a két albumin (amelyek aminosavtartalma, immunogenitása nagyfokú hasonlóságot mutat, azonban egymással nem keresztreakálnak), s ezáltal a kapcsolt hapténhez is több és avidabb antitest képződése várható. Ennek viszont az a hátránya, hogy sok antitest a fehérje ellen irányul a szérumban. Egy efféle "egzotikus" (kürtőscsiga) fehérje választása azért célszerű, mert ilyen (vagy ehhez hasonló) fehérjével az antitestjeink nem igen találkoznak a hétköznapi életben. A BSA és az OVA fehérjék előnye, hogy (a) könnyen kezelhetők, (b) olcsóak és (c) nagy mennyiségben rendelkezésre állnak. Ezért használjuk például a BSA-hoz kapcsolt haptént érzékenyítő antigénként.

3.1.2. Hapténszintézis és -konjugálás a trifluralinszelektív ELISA eljáráshoz

A trifluralin kimutatását célzó ELISA teszt kifejlesztés esetében annak érdekében, hogy az alapmolekula szerkezetét minél kevésbé módosítsuk, valamint szintetikus kémiai megfontolások alapján a választás arra esett, hogy a kapcsoláshoz szükséges funkciós csoport karboxilcsoport legyen, melyet az alapmolekula egyik *N*-propil-csoportjának fiktív meghosszabbításával vihettünk be a molekulába. (A haptének előállítása valójában természetesen totálszintézissel történt.) E cél érdekében három karboxiszármazékot állítottak elő, melyek a trifluralin *N*-propil-csoportja helyett 5-karboxi-pentil funkciós csoportot tartalmaztak, s emellett az alapmolekula másik *N*-propil-csoportja helyén H, metil- vagy propilcsoport található (14. ábra). A három haptén (*N*-(2,6-dinitro-4-triflorometil-fenil)-6-aminohexánsav (NKI-42722), *N*-(2,6-dinitro-4-triflorometil-fenil)-*N*-metil-6-aminohexánsav (NKI-42750), valamint *N*-(2,6-dinitro-4-triflorometil-fenil)-*N*-propil-6-aminohexánsav (NKI-42734)) szintézise Leitis és Crosby [42], valamint Kooistra és Richards [77] által leírt eljárás szerint történt. Az NKI-42722 haptén (**11**) szintézise esetén 10,0 g (37 mmol) 1-klór-2,6-dinitro-4-triflorometil-benzol etanolos oldatához (110 ml) 55 ml, 6,55 g (45 mmol) 6-aminohexánsavat és 5,15 g (61 mmol) nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmazó vizes oldatot adagoltunk. Az elegyet egy éjszakán át kevertettük, majd az oldószer nagy részét vákuumban elpárologtattuk, 150 ml desztillált vízzel hígítottuk, majd telített nátrium-bikromát oldattal tovább hígítottuk a kivált csapadék visszaoldódásáig. A nem reagált reagenseket diklórmetános extrakcióval eltávolítottuk, majd csapadék kiválásig koncentrált sósavat adtunk az elegyhez. A terméket szűrtük, desztillált vízzel mostuk, majd víz-etanol (35:30 V/V) elegyből átkristályosítottuk a kivált sárga kristályokat (1,71 g, 63,4 %). A kapott kristály fizikai paraméterei: o.p. 119-122 °C, TLC: $R_f = 0,46$, hexán/aceton/ecetsav (6:4:0.1 V/V), UV: λ_{max} (nm) 416,5, [¹H]-NMR (ppm): δ 1,36-1,49 (m, 2H, CH₂), 1,56-1,79 (m, 4H, 2 CH₂), 2,35 (t, 2H, $J = 6$ Hz, CH₂-CO₂H), 2,96-3,06 (m, 2H, CH₂-N), 8,37 (s, 2H, aromás), 8,61 (brs, 1H, NH). Az *N*-(2,6-dinitro-4-triflorometil-fenil)-*N*-metil-6-aminohexánsav haptén (NKI-42750, **12**) szintézise azonos módon történt a fentiekben leírtakkal azzal a különbséggel, hogy *N*-metil-6-amino-hexánsavat használtunk reagensként [78], a reakcióelegyet az etanol eltávolítása előtt szűrtük, az átkristályosítást hexán-*i*-propil-éterből (15:12 V/V) végeztük. Az előállított haptén (1,38 g 50,0 %) fizikai paraméterei: sárga kristályos, o.p. 75-77 °C, TLC: $R_f = 0,54$, hexán/aceton/ecetsav (6:4:0.1 V/V), UV: λ_{max} (nm) 383,5, [¹H]-NMR: (ppm) δ 1,31- 1,38 (m, 2H, CH₂), 1,58-1,68 (m, 4H, 2 CH₂), 2,35 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH₂-CO₂H), 2,97 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, CH₂-N), 2,88 (s, 3H, CH₃), 8,07 (s, 2H,

aromás). A harmadik, *N*-(2,6 dinitro-4-triflorometil-fenil)-*N*-propil-6-aminohexánsav haptén (NKI-42734, **13**) szintézise is az előzőekhez hasonlóan történt. Ebben az esetben *N*-propil-6-amino-hexánsavat [79] használtunk reagensként. A reakciósor végén kivált csapadékot, szűrést követően desztillált vízzel mostuk, majd szilikagél töltetű kromatográfiás oszlopon, hexán/aceton (6:4 V/V) eluenssel tisztítottuk. Az így előállított haptén (1,0 g, 33,2 %) fizikai tulajdonságai: sárga kristályos vegyület, o.p. 58-59 °C, TLC: $R_f = 0,54$, hexán/aceton/ecetsav (6:4:0.1 V/V), UV: λ_{max} (nm) 386,5, $[^1H]$ -NMR: (ppm) δ 0,88 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz), 1,29-1,37 (m, 2H, CH₂), 1,56-1,65 (m, 6H, 3 CH₂), 2,34 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂-CO₂H), 2,97 (t, 2H, $J = 7,48$, CH₂-N), 3,02 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂-N), 8,06 (s, 2H, aromás), ~ 10,8 (brs, 1H, COOH). A kapott haptén molekulák szerkezetét a 14. ábra mutatja be.



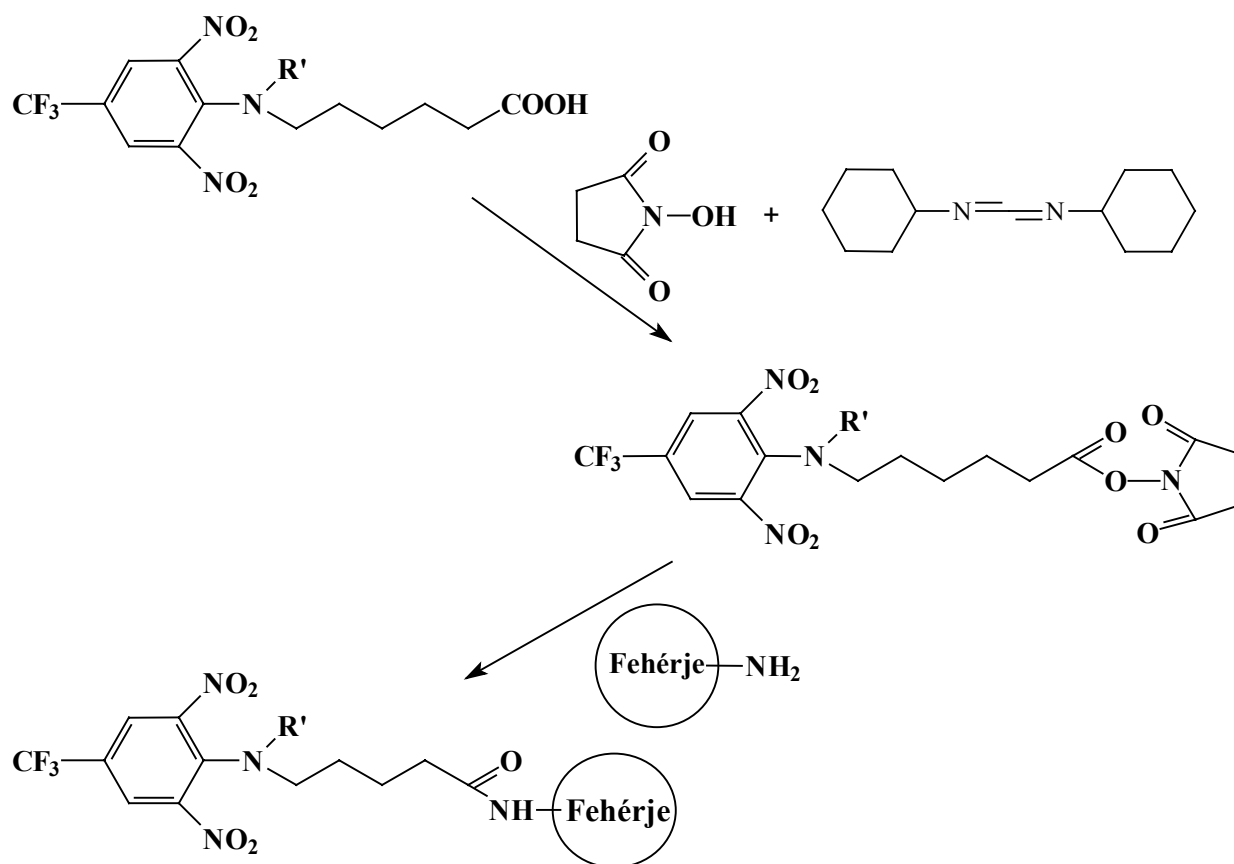
NKI-42722 : R' = H (**11**)

NKI-42750 : R' = Me (**12**)

NKI-42734 : R' = *n*Pr (**13**)

14. ábra A szintetizált trifluralinanalóg haptén molekulák

A fehérjék jellemzésénél leírt megfontolások alapján az NKI-42734-es trifluralin haptént KLH fehérjéhez kötöttem, mivel ezt szántuk a kifejleszteni kívánt rendszer immunogénjének. Így haptén-fehérje konjugátumot csak egy, viszonylag magas hapténsűrűségben készítettem el (1,0 μ mol haptén / mg fehérje). A többi haptént ugyancsak az előbbi megfontolások alapján BSA-hoz kötöttem, mivel ezeket az ELISA teszt érzékenyítő antigénjeinek szántuk. Ezen konjugátumok alkalmazása – ha jó a szérum – a csökkenő haptén-sűrűség függvényében érzékenyebb módszert eredményezhet, ezekből molekulánként három-három hapténsűrűségű változatot készítettem. A konjugátumok betűjelölésében a haptén-fehérje arányára mindhárom esetben a m (magas), k (közepes), illetve a (alacsony) jelzés utal. Az egyes esetekben a haptén fehérje arány 1,0, 0,2 és 0,039 μ mol haptén / mg fehérje volt (magas, közepes illetve alacsony hapténsűrűség) A haptén NKI-42734 konjugálása egyetlen haptén-fehérje molarány mellett KLH-hoz történt (1,0 μ mol haptén/mg fehérje). A konjugátumok a közti ún. aktivált észter előállításához *N*-hidroxi-szukcinimidet (NHS) alkalmaztam, dehidratáló ágensként pedig diciklohexil-karbodiimidet (DCC) használtam.



15. ábra Trifluralinanalóg hapténmolekulák kapcsolása fehérjemolekulákhoz

72,7 mg (0,19 mmol) 2,6-dinitro-*N*-(5-karboxi-pent-1-il)-*N*-metil-4-trifluórmetil-anilint (NKI-42750) és 15 mg (0,22 mmol) *N*-hidroxi-szukcinimidet feloldottam 3,9 ml dimetil-formamidban (DMF), majd hozzáadtam 45 mg (0,22 mol) diciklohexil-karbodiimidet. Az elegyet két órán át szobahőmérsékleten kevertettem. Ezután három külön lombikban feloldottam (lombikonként) 150 mg BSA fehérjét 16 ml desztillált víz és 0,9 ml DMF elegyében. A fenti elegyből 3,1 ml, 0,62 ml és 0,12 ml mennyiségeket rendre a fehérje oldatokhoz adtam (ezzel a teljes elegy DMF-tartalma rendre $4,0/20,0 = 20\%$, $1,52/17,52 = 8,7\%$, $1,02/17,02 = 6,0\%$ lett. A DMF a haptén oldhatóságát segíti elő a vizes reakcióelegyben.).

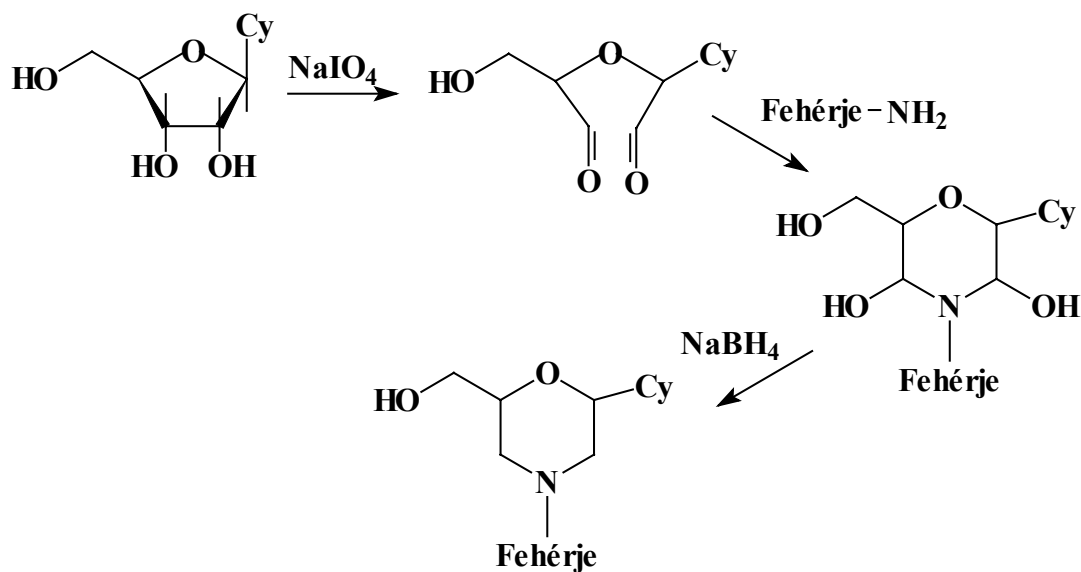
A konjugálási reakció ugyanilyen körülmények között zajlott le a 2,6-dinitro-*N*-(5-karboxi-pent-1-il)-4-trifluórmetil-anilin (NKI-42722) és a 2,6-dinitro-*N*-(5-karboxi-pent-1-il)-*N*-propil-4-trifluórmetil-anilin (NKI-42734) fehérjéhez való kapcsolása során is. A különbség a hordozóként választott fehérjében volt, ugyanis az utóbbi esetben (NKI-42734) BSA helyett – mint azt korábban jeleztem – KLH-t alkalmaztam hordozó fehérjeként.

A legnagyobb molekuláris hasonlóság miatt az NKI-42734 számú vegyületet (pontosabban annak fehérjekonjugátumát) választottam immunizáló antigénként

(immunogénként), míg a másik két molekulát (pontosabban azok fehérjekonjugátumait) rögzített, érzékenyítő (immobilizált) antigénként (Ag_{imm}) alkalmaztam indirekt kompetitív (vetélkedő) ELISA eljárásban (ld. a 4.1.2. alfejezetet).

3.1.3. Hapténszintézis és -konjugálás a citokininszelektív ELISA eljáráshoz

A konjugációs reakciót növényi hormonok esetében – a leírt irodalmi előzmények alapján [80-84] – a zeatin-ribozid illetve az izopentenil-adenozin molekulák ribozid csoportjának származékoltatásával végeztük. A ribozid geminális diol csoportjait nátrium-perjodát segítségével – a ribozid gyűrű C-C kötésének hasadása mellett – a megfelelő dialdehiddé alakítottuk, majd kontrollált pH-körülmények között ezen dialdehidet reagáltattuk a hordozófehérje aminocsoportjaival. A közti termékként keletkező, instabil α,α' -dihidroxi-szek.amin származékot [83] redukálva megfelelő stabilis, szekunder amin konjugátumot nyertünk (16. ábra). Ezen konjugálási reakciósor jó reprodukálhatóságot mutat.



Cy: citokinin csoport (2-IP, zeatin)

16. ábra Citokinin hormonok kapcsolása fehérjemolekulákhoz

20 mg (60 μ mol) N⁶-(2-izopentenil)-adenozin (IPA) 4 ml metanolban készített oldatához cseppenként hozzáadagoltunk 10 ml 0,01 M nátrium-perjodát oldatot (42,8 mg $NaIO_4$ 20 ml vízben). Az elegyet 20 percig kevertettük, majd a fölös perjodátot 0,6 ml 0,1 M etilén-glikol (63 mg etilén-glikol 10 ml vízben) hozzáadásával megbontottuk, és az elegyet 5 percig kevertettük.

Ezalatt két külön lombikban 115 mg BSA (1,7 μ mol) illetve OVA (1,5 μ mol) 5-5 ml vízben felvett oldatait készítettük el, és az oldatok pH-ját 5 %-os K_2CO_3 oldat hozzáadásával

9,3-ra állítottuk be. Ezen oldatokhoz adagoltuk elfelezve és lassan a fenti IPA oldatot úgy, hogy az elegyek pH-ja 9,2 és 9,4 között maradjon, majd 9,4-es pH-n az elegyeket 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettük.

Ezután az α,α' -dihidroxi-*sze*k.amin közti termék redukálása céljából külön-külön mindkét elegyhez hozzáadtunk 5,7 mg nátrium-borohidridet (0,15 mmol), az elegyeket 45 percig kevertettük, majd a pH-t mindkét elegyben 1 M vizes ecetsav oldat (572 μ l ecetsav 10 ml vízben) óvatos hozzáadásával 6,5-re állítottuk be. Ezután az elegyeket újabb 2 órán át kevertettük, a kapott oldatot desztillált vízzel szemben dializáltuk. A dializátumokat ezután vákuumban liofilizáltuk, és a szilárd fehérjeszármazékokat -18 °C -on tároltuk.

A zeatin-ribozid (ZR) fehérjekonjugátumait az izopentenil-adenozin (IPA) konjugátumainak fenti előállítási sémája szerint készítettük el, 20 mg (57 μ mol) ZR alkalmazásával.

Az IPA és a zeatin-ribozid konjugálásához hasonlóan, irodalmi adatok alapján Orchard et al. [85], a *trans*-zeatin hordozófehérjéhez való kapcsolását is elvégeztük – a hidroxipentil oldalláncon keresztül –, ám ebben az esetben sokkal magasabb hormon/fehérje reagensarány (5 mg (22,8 μ mol) zeatin, 57 mg (0,8 μ mol) BSA) mellett végeztük a konjugációt.

3.2. A konjugátumok tisztítása, dialízis

A különböző méretű molekulák elválasztására, illetve a nagy molekulatömegű alkotók megtisztítására a kis molekulatömegű komponensektől jól alkalmazható eljárás a dialízis. A dialízis során az alkalmazott féligáteresztő membrán (Spectra/Por Membrane MWCO:12-14000) pórusméretének megfelelően, a membrán két oldalán fellépő ozmotikus koncentrációbeli különbség hajtóereje hatására azok a molekulák, amelyek számára a membrán még átjárható (jelen esetben a fehérjékhez nem kötődött haptének), kiáramolnak a membránon kívüli térbe. Az elegyeket 4 °C-on hat napon keresztül desztillált vízzel szemben dializáltattam (4 óránkénti vízcserével) a meg nem kötődött hapténmolekulák eltávolítása érdekében. Ezen tisztítási lépés után kapott dializátumok térfogatát μ l pontossággal mértem, a konjugátumok közelítő fehérjekoncentrációjának meghatározása érdekében.

3.3. A beépült hapténkoncentráció mérése a fehérjekonjugátumokban

A trifluralin fehérjekonjugátumai esetében az alapmolekula jellegzetes UV elnyelése lehetővé tette, hogy a hapténmolekulák beépülését UV spektroszkópiás vizsgálatok segítségével követhessem. Ehhez felvettem mind a hapténszármazékok, mind a fehérjekonjugátumok UV spektrumait különböző koncentrációkon. Az UV-VIS

spektrometriás méréseket Shimadzu UV-1601 spektrofotométer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japán) segítségével végeztem a 240-520 nm hullámhossztartományban.

Mint ahogy a citokininszármazék haptének esetében a hapténsűrűség UV spektroszkópiás úton nem határozható meg (a hapténmolekulák nem mutatnak elnyelést az UV-VIS tartományban), e molekulák esetében a konjugátumokban a fehérje móltömegváltozását gélelektroforézises módszerrel, izoelektromos fókuszálással mutattuk ki. A fehérjekonjugátumok izoelektromos fókuszálását Phast System műszeren végeztük (Pharmacia LKB Biotechnology AB Uppsala, Sweden) PhastGel felhasználásával, amely a fókuszálást pH 3-9 tartományban tette lehetővé. A PhastGel IEF poliakrilamid gél (5% T, 3% C) homogén összetételét Pharmalyte amfolit biztosította.

3.4. Immunizálás

A fenti hapténekkal történő immunizálási kísérleteket az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének kísérleti telepén, Dr. Tóbiás István laboratóriumában (növényi hormonok esetében), illetve a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben (trifluralin esetén) végezték. Immunogénként a citokinin-ribozidok OVA/BSA-konjugátumait illetve a trifluralin-haptén KLH-konjugátumát alkalmaztam. Az immunizálás mind a két kutatóintézetben hasonlóképpen történt, így 6 mg konjugátumot 3 ml desztillált vízben szuszpendáltak, az elegyből 3 ml komplett Freund adjuváns hozzáadásával emulziót készítettek, és a kapott emulziót háromfelé osztva immunogénenként 3-3 egyéves hím nyulat (Új Zéland típus) intramuszkulárisan immunizáltak. A nyulak ezután havonta illetve 6 hetente emlékeztető injekciót kaptak, amelyekhez az emulziót hasonló úton készítették el, azonban csupán 0,6 mg konjugátum valamint inkomplett Freund adjuváns felhasználásával.

Az emlékeztető oltásokat követően három héttel véreztetést végeztek, mely során a fülvenéből 5-20 ml vért vettek. A szérumokat a felhasználásig -20 °C-on illetve +4 °C-on tárolták.

3.5. Az ELISA módszer

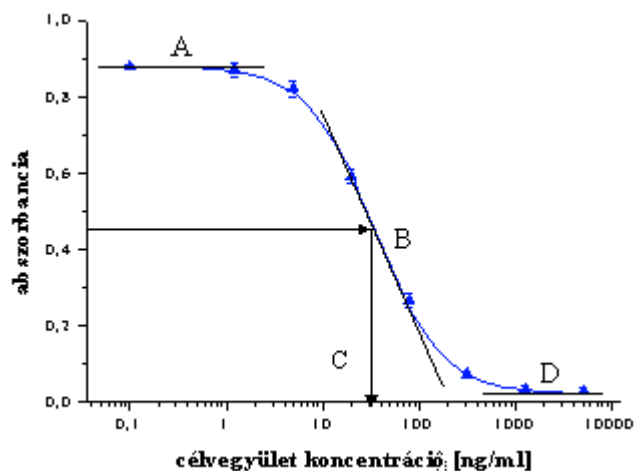
3.5.1. Az ELISA teszt elve

Mind a trifluralin, mind pedig a citokininek kimutatására kifejlesztett immunanalitikai módszerek kompetitív ELISA rendszeren alapszanak. Az adott célvegyületet tartalmazó minta és a mikrotálca szilárd felületén rögzített haptén-fehérje konjugátumok versengenek a szérumban jelenlevő antitest kötőhelyekért. Amennyiben a minta nem tartalmaz célvegyületet, a haptén-fehérje konjugátum foglalja el az összes antitest kötőhelyet, minek eredményeképpen a szilárd felületen megkötődött antitest mennyisége maximális. A

megkötődött antitesteket – a szabad frakció elmosása után – egy jelzőenzimhez kötött második antitest konjugátummal reagáltattam. A második antitest jellegzetessége, hogy a nyúl immunoglobulin fehérjére specifikus, a hozzákötött jelzőenzim pedig esetünkben torma peroxidáz (TP) vagy alkalikus foszfatáz (AP) enzim volt. Az utolsó lépésen (újabb mosási lépés után) a szilárd felületen megkötődött jelzőenzimet színreakcióban reagáltattam valamely kolorimetrikus szubsztrátjával. A színreakció jelzőenzimenként változik. Alkalikus foszfatáz esetén az enzimhez – megfelelő puffer oldatban – 4-nitro-fenil-foszfát szubsztrátot adtam. Az enzim a szubsztrátot 4-nitro-fenollá hidrolizálja, melynek színintenzitását annak elnyelési maximumán, 405 nm-es hullámhosszon mérhető. A peroxidáz enzim szubsztrátja a hidrogén-peroxid, melyből az enzim oxigént szabadít fel. A keletkező oxigénnel valamely színreagenst (kromofórt) oxidálhatunk, mely folyamatban az oxigénfejlődéssel arányos színintenzitást mérhető. Az ismertető ELISA vizsgálatokban torma peroxidáz alkalmazása esetén kétféle kromofórt alkalmaztam, o-fenilén-diamint (OPD) valamint *N,N,N',N'*-tetrametil-benzidint (TMB). A képződő oxigén mindkét kromofort kinoidális vegyületté oxidálja, amely így jellegzetes színt vesz fel. Az OPD színtelenből sárga színűvé, a TMB szintén színtelenből kék színűvé válik. (Toxikus és mutagén hatásai miatt az OPD alkalmazását, ha tehettem, kerültem.) A kellő színreakciót elérve a reakcióközeg pH-jának erőteljes csökkentésével a további szubsztrátreakciót az enzim inaktiválásával megállítottam, és a színt (mely a savas kémhatás hatására mindkét esetben mély sárgára vált) 492 nm-es hullámhosszon mértem. Mint látható, az AP enzim esetében folytonos (ún. kinetikus), míg a TP esetében végpont mérést végeztem. A végpont mérés előnye, hogy több párhuzamos minta esetén az enzimet valamennyi mintában egyidejűleg inaktiválható (vagyis a mérés szisztematikus hibája csökken). Ugyanakkor a kinetikus mérésben ugyanaz a minta-sorozat különböző időpontokban, vagyis különböző színintenzitások mellett is mérhető.

Tehát az utolsó lépésben lejátszódó enzimes reakció eredményeképpen megjelenő szín jelzi a reakciósor lejátszódását, s egyben alkalmat ad arra, hogy fotometriás mérés segítségével, kvantitatív – ismert koncentrációjú standard törzsoldatokkal a jelentkező jelcsökkenés kalibrálható – módon kiszámítsuk az első lépés során a rendszerbe juttatott mérendő anyag koncentrációját. A megjelenő szín intenzitása fordítottan arányos a mintában jelenlevő célvegyület koncentrációjával. Az immunanalitikai mérések során kapott standard görbék a kompetitív mechanizmusnak köszönhetően szigmoid lefutásúak (17. ábra). Nagyon magas mintakonzentráció esetén a görbe minimális abszorbanciaértékhez (alsó plató), míg nagyon alacsony koncentráció esetén maximális abszorbanciaértékhez (felső plató) tart. A két határérték közötti tartományba foglal helyet a görbe négyparaméteres (szigmoid) görbe,

melynek középső szakasza lineárisnak tekinthető. A szigmoid görbe matematikai egyenletének leírása Rodbard névéhez fűződik [86], ezen úgynevezett négyparaméteres – az ELISA technikában általánosan elfogadott – görbe paraméterei egyenként fontos információkat hordoznak.



17. ábra Szigmoid lefutású görbe

A görbe egyenlete:

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

ahol

x: célvegyület koncentráció

y: mért abszorbancia

A: maximális abszorbancia ($x \rightarrow 0$)

B: a görbe meredeksége a C pontnál

C: IC_{50} (50 %-os gátláshoz tartozó koncentráció)

D: minimális abszorbancia ($x \rightarrow \infty$)

A mérés kiértékelésének pontosságát illetően érdemes megjegyezni, hogy a mért abszorbancia kalibrációs görbén való elhelyezkedése alapvető fontosságú. A minta koncentrációjának kvantitatív meghatározását a görbe lineáris szakasza sokkal nagyobb pontossággal teszi lehetővé, mint a platókhöz közeli szakaszok, ugyanis kis mértékű abszorbanciakülönbség a görbe lineáris szakaszában sokkal kisebb mért koncentrációbeli különbséget okoz, s emellett a görbe várható elméleti hibája is az IC_{50} érték közelében a legkisebb. (A szigmoid görbe lineáris szakasza általában több, mint egy nagyságrend.)

3.5.2. A puffer oldatok elkészítése

A puffer oldatok az oldatokban rögzített pH-t és izotóniás sókoncentrációt biztosítottak. Az ötszörös töménységű PBS puffert 20,41 g KH_2PO_4 és 87,66 g NaCl 2000 ml desztillált vízben való feloldásával készítettem. Az így előállított pufferből készült a kísérletek során felhasznált PBS, a hígított oldat pH-ját 1,5 N-os NaOH felhasználásával 7,4-re állítottam. A lemezek mosásához szükséges 0,2 % (V/V) PBST a 2 ml TWEEN-20, illetve a hígítási sorozatok elkészítése során alkalmazott 0,05 % (V/V) PBST 0,5 ml TWEEN-20 1000 ml PBS-ben való feloldásával készült. Az ELISA tesztek utolsó, detektálási lépésében alkalmazott szubsztrátpufferek: a) citrát puffer: – torna peroxidáz jelzőenzim alkalmazásakor – 19,2 g citromsavat, valamint 8,89 g Na_2HPO_4 500 ml desztillált vízben elkészített oldata (pH = 5); b) dietanol-amin puffer – alkalikus foszfatáz jelzőenzim alkalmazásakor – 9,7 ml dietanol-amin, valamint 0,02 g NaN_3 100 ml vízben elkészített oldata (pH = 9,8).

3.5.3. Az ELISA teszt kivitelezése

Az ELISA tesztek 96-üreges mikrotálcán (Nunc, Roskilde, Dánia) végeztem. A mikrotálca egyes üregeibe mértem be a reagenseket a megfelelő sorrendben, a szükséges 50-200 μl /üreg mennyiségben.

Az egyes preparatív lépéseket az alábbiakban részletesen is ismertetem:

1. Az első lépés a lemezek **érzékenyítése** a megfelelő koncentrációjú haptén-fehérje konjugátummal. Az érzékenyítéshez lúgos érzékenyítő puffert alkalmaztam. A puffer 0,42 g NaHCO_3 50 ml desztillált vízben való oldásával készült, a pH 9,6-ra való beállítása 5N NaOH-val történt. A haptén-fehérje konjugátumot 100 μl /üreg mennyiségben vittem fel a mikrotálcára, a tálcát egy éjszakán át +8 $^{\circ}\text{C}$ -on termosztáltam, és PBST 0,2 pufferrel háromszor mostam. A lemezeket felhasználásig -20 $^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztoóban tároltam.
2. A második lépés a **blokkolás** 150 μl /üreg 3 %-os zselatinos PBS puffer adagolásával. A 3 %-os zselatin 1,5 g zselatin 50 ml desztillált vízben való feloldással készül. Az oldat felvitele után 1,5 órán át 37 $^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam, majd a lemezeket PBST 0,2 pufferrel négyszer mostam. (A blokkolási lépés azért szükséges, mert az egyes fehérjék – így az érzékenyítő antigén és más proteinek, mint például az antitestek vagy az enzimek – mikrotálcák felületén történő kötődésében nincs alapvető különbség. Az érzékenyítési lépés során alkalmazott magas érzékenyítő antigén koncentráció miatt a mikrotálca nem minden egyes aktív helye telítődik, köt

meg fehérjét. Így szükség van a mikrotálca felületén fennmaradó szabad (aktív) helyek inert proteinnel való telítésére. Ezen fehérjékkal szemben támasztott követelmények: olcsóság, könnyű felhasználás, emellett, természetesen, nem fejthet ki negatív hatást a rendszer paramétereire. Általánosan elterjedt blokkoló ágensek a tejpor, a BSA, valamint a zselatin.)

3. A harmadik lépés a **szérum és minta adagolása**. Ez a lépés eltérő módon történik a titrálási és gátlási reakciók esetében. A titrálásnál 0,1%-os PBST 0,05 oldattal készített szérum hígítási sorának 100 μ l/üreg mennyiségben való felvitelével, gátláskor 50 μ l/üreg szérum felvitele adott hígítás mellett, valamint antitest hígítási sorának 50 μ l/üreg adagolásával történik. A hígítások gátláskor is 0,1%-os PBST 0,05 oldattal készülnek. Ezt követően mind gátlás, mind titrálás esetén 2 órás, 37 $^{\circ}$ C-os termosztálás, majd a lemezek mosása következik, négyszer, PBST 0,2 pufferrel.
4. A negyedik lépés a jelzőenzimhez kötött **második antitest**, azaz 100 μ l/üreg enzim-jelzett anti-IgG felvitele 0,1 %-os zselatinos PBST 0,05 pufferben. Amennyiben a jelzőenzim anti-IgG-torma peroxidáz konjugátum volt (Humán Oltóanyagtermelő és Gyógyszergyártó Rt., Gödöllő, Magyarország), 1:4000 hígítást, míg anti-IgG-alkalikus foszfátáz konjugátum (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) esetén 1:5000 hígítást alkalmaztam. Ezt követően a lemezt 1 órán át 37 $^{\circ}$ C-on inkubáltam, végül PBST 0,2 pufferrel négyszer mostam.
5. Az ötödik lépés a **szubsztrát, kromofór felvitele**. Peroxidáz enzim esetében a hidrogén-peroxidot és a kromofórt (OPD, TMB) 200 mM kálium-dihidrogén-citrát pufferben (pH=3,8) vittem fel, míg alkalikus foszfátáz esetén a 4-nitro-fenil-foszfát szubsztrátot 0,5 M dietanol-amin pufferben (pH=9,8) oldva adagoltam 200 μ l/üreg mennyiségben.
6. Az utolsó lépés a **fotometrázás** 492 nm-en torma peroxidáz esetén, illetve 405 nm-en alkalikus foszfátáz alkalmazásakor (OD érték mérése).

Minden mérés előtt megterveztem a negatív kontrolloknak, a standard hígítási sorának és a vizsgálandó minták hígítási sorának három ismétlésben való elhelyezését a mikrolemezen.

3.6. Az ELISA módszer validálása GC-MS módszerrel

Annak kimutatására, hogy a kifejlesztett trifluralinspecifikus ELISA rendszer a trifluralinkoncentrációt pontosan és megbízhatóan képes mérni, az immunanalitikai módszert független, műszeres analitikai eljárás segítségével “hitelesíteni” (validálni) kellett. Validálási műszeres analitikai eljárásként gázkromatográfiás–tömegspektrometriás (GC-MS) módszert választottunk, szilárd fázisú mikroextrakciós (SPME) mintaelőkészítéssel. A GC-MS méréseket – Saturn 2000 készüléken (Varian, Walnut Creek, CA, USA), CP-Sil 8 CB oszlopon (0,25 µm film vastagságú, 30 m hosszú, 0,25 mm belsőátmérőjű) – 80 °C-ról induló hőmérséklet program (80 °C (1 percig), majd 20 °C / perces melegítés 300 °C eléréséig), valamint 230 °C-os splitless módú injektor mellett, SPME technikával végeztem (carbowax/divinilbenzol bevonatú tű), a szorpciós bevonaton megkötődött trifluralint 3 perces hődeszorpcióval távolítottam el.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. Trifluralin ELISA rendszer fejlesztése

4.1.1. A konjugálási reakciók eredményességének vizsgálata

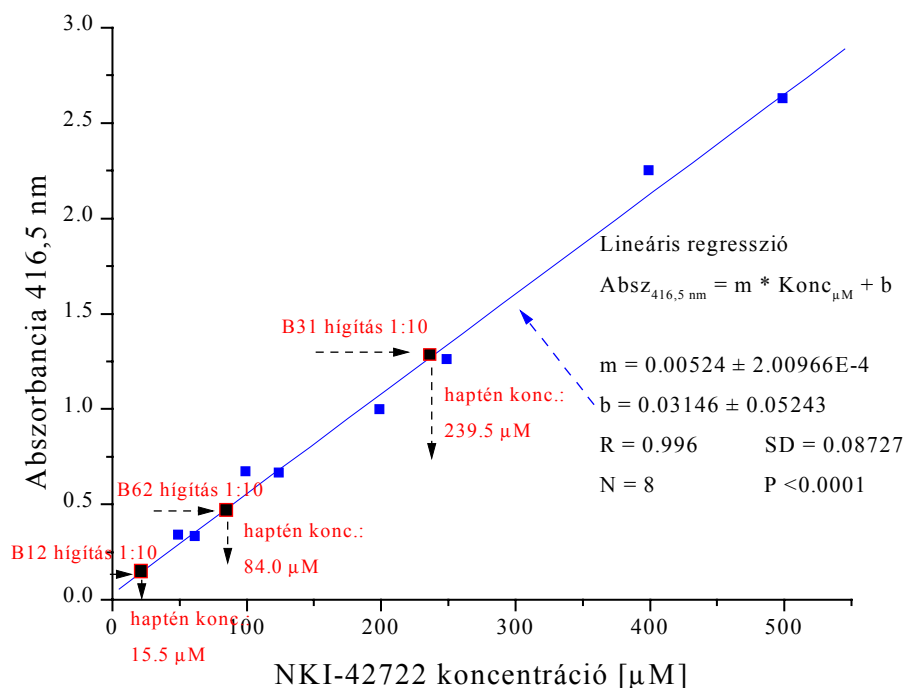
A konjugálási reakciókat követően UV-spektroszkópiás (iEMS Microplate Reader, Labsystems Oy. Helsinki, Finnország) és mátrixvezérelt lézereszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás (MALDI ToF, Kratos Kompact MALDI3 V5.2.0 tömegspektrométer, Kratos Analytical Ltd., Whafside, UK) módszerrel meghatároztam a lejátszódott reakciók hatásfokát (azaz a beépült hapténmolekulák fajlagos mennyiségét). Az UV-spektroszkópiás számításokban a hapténmolekulák 380-420 nm hullámhossztartományban észlelt elnyelési maximumainál meghatározott moláris extinkciós koefficienseket ($\epsilon = 1900 - 5300 \text{ l/mol/cm}$) alkalmaztam, a MALDI ToF vizsgálatokban pedig közvetlenül a módosított fehérjék átlagos molekulatömegéről nyertem információt.

4.1.1.1. Hapténkoncentráció mérése a trifluralin-fehérje konjugátumokban

A spektroszkópiai vizsgálatok célja a kapott, különböző haptén-fehérje molarányú, KLH illetve BSA fehérjéket tartalmazó konjugátumokban a beépült haptén mennyiségének meghatározása. A haptének karakterisztikus UV abszorbanciaspektrumai lehetővé tették a fehérjekonjugátumokba beépült haptének mennyiségi meghatározását. A spektrumok felvételének kezdeti lépéseként minden egyes esetben standard hígítási sort készítettem, majd felvettem az egyes hígításokhoz tartozó UV-VIS spektrumokat. A haptének spektrumai csúcsmaximumához tartozó abszorbanciaértékekből ábrázoltam az elnyelés koncentrációfüggését, vagyis az extinkciós kalibrációs egyeneseket. (Ezen egyenesek kalibráló pontjai az egyes haptének spektrumainak csúcsmaximumaihoz tartozó hullámhosszakon mért abszorbanciaértékek.) Az egyenes meredeksége (iránytangense) adja meg az elnyelés koncentrációfüggését, s a küvetta méretének felhasználásával ebből számítható a moláris extinkciós koefficiens (ϵ).

A következő lépésben, különböző hígítások mellett – minden egyes haptén esetén 50 és 500 μM -os koncentrációtartományon belül 8 különböző koncentráció mellett mérve – felvettem a haptén-fehérje konjugátumok spektrumait is, s a már rendelkezésre álló kalibrációs egyenesek ismeretében, a konjugátumok különböző hígítási frakcióiban az adott csúcsmaximumokhoz tartozó elnyelési értékekből meghatároztam az előállított konjugátumokban a beépült haptének mennyiségét. Egy így kapott kalibrációs egyenest

valamint az egyenesre illesztett, a hígított konjugátumok vizsgálatakor kapott értékeket mutatja a 18. ábra. Emellett az ábráról leolvashatóak a számított hapténkoncentrációk illetve a kalibrációs görbe paraméterei.

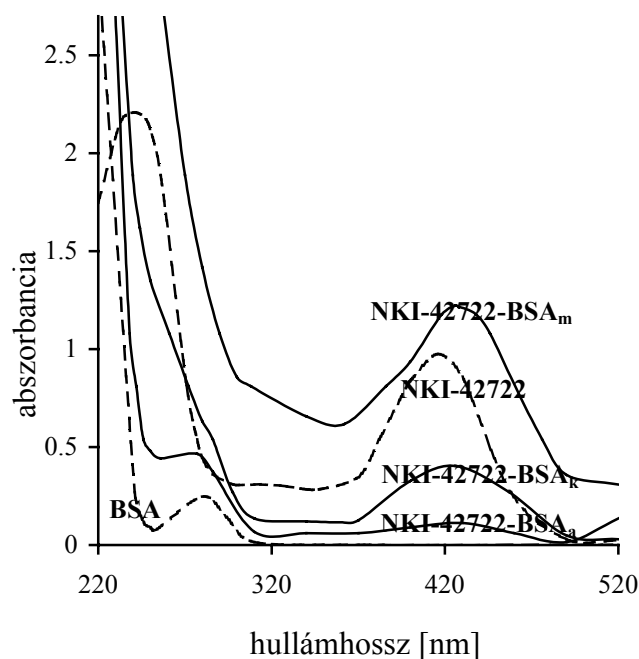


18. ábra Az NKI-42722 számú haptén standard kalibrációs egyenese

Az ábrán használatos jelölések: B31, B62, B12 rendre a 3,1 ml, 0,62 ml illetve 0,12 ml hozzáadott hapténtartalmú konjugátumokat jelöli.

Ezen vizsgálati módszer alkalmazhatósága annak köszönhető – amellett, hogy a hapténmolekulák az UV-VIS tartományban abszorbancia maximummal rendelkeznek –, hogy a konjugátum mellett található nagy mennyiségű fehérje nem fejt ki zavaró hatást a mérésre, ugyanis elnyelési maximuma jóval alacsonyabb hullámhossztartományban (megközelítőleg 280 nm környékén) található. Ezen elméleti adatok alátámasztásaként felvettem az alkalmazott fehérjék spektrumait is, amely vizsgálatok eredménye az előző megállapítást alátámasztják.

A haptének valamint a konjugátumok informatív csúcsai a 370-480 nm-es hullámhossztartományba estek, a vizsgált NKI-42722, NKI-42750 és NKI-42734-gyel jelzett haptének esetében rendre 416,5, 383,5 és 386,5 nm-es hullámhosszon jelentkeztek. A megfelelő mértékben hígított konjugátumok csúcsmaximumhoz tartozó abszorbanciaértékekből a standard görbék egyenleteinek felhasználásával kiszámítottam a hapténkoncentrációkat az egyes konjugátumokban, majd a hígítás figyelembevételével megkaptam a minta hapténkoncentrációját.



A kalibrációs egyenesek paraméterei: ($A=m*c+b$)

NKI-42722($Abs_{416,5\text{ nm}}$): $m=(5,24 \pm 0,2)*10^{-3}$, $b=0,032 \pm 0,052$, $R=0,996$, $\sigma=0,087$;

NKI-42750($Abs_{383,5\text{ nm}}$): $m=(1,9 \pm 0,07)*10^{-3}$, $b=-0,085 \pm 0,024$, $R=0,996$, $\sigma=0,047$;

NKI-42734($Abs_{386,5\text{ nm}}$): $m=(1,9 \pm 0,07)*10^{-3}$, $b=0,003 \pm 0,024$, $R=0,995$, $\sigma=0,052$

A kalibrációs egyenesek egyenletei jól szemléltetik a hapténkoncentráció és az abszorbancia közötti lineáris kapcsolatot. Ezen egyenletekből számított moláris adszorpciós együtthatók (ϵ):NKI-42722: 5300 1/M.cm; NKI-42750: 1900 1/M.cm; NKI-42734: 1900 1/M.cm. Az adott haptén moláris extinkciós koefficiensének meghatározása lehetővé tette a fehérjekonjugátumok hapténkoncentrációjának kiszámítását.

Az UV-VIS spektrumok felvétele nyomán mindhárom haptén esetében jól megfigyelhető a hapténmolekulák beépülése. Szemléltetésképpen bemutatom az NKI-42722 haptén konjugátumainak, illetve a BSA fehérje spektrumát (19. ábra). Az egyes konjugátumokban a moláris extinkciós koefficiens segítségével megállapított hapténkoncentrációkat a II. táblázat tartalmazza.

19. ábra Az NKI-42722 számú haptén illetve a hapténfehérje konjugátumok spektrumai

II. táblázat Az egyes fehérjekonjugátumokban mért hapténkoncentrációk

konjugátum	mérési hullámhossz [nm]	számított hapténkoncentráció [mM]
NKI-42722 _m	416,5	0,37 ± 0,09
NKI-42722 _k		0,11 ± 0,01
NKI-42722 _a		0,04 ± 0,02
NKI-42750 _m	383,5	0,54 ± 0,07
NKI-42750 _k		0,08 ± 0,05
NKI-42750 _a		0,04 ± 0,00
NKI-42734 _m	386,5	0,27 ± 0,09

4.1.1.2. A fehérjetartalom mérése

A tényleges haptén/fehérje molarány meghatározásához a konjugátumok fehérjetartalmának meghatározása is szükséges volt. A fehérjekoncentráció mérésére BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) (Bio-Rad protein) fehérjekimutatási módszert alkalmaztam, amely eljárás réz-szulfátot és bicinehoninsavat (2,2'-bikinolin-4,4'-dikarbonsav) használ fel a fehérjék jelölésére. A mérés során a különböző haptén-fehérje arányú konjugátumokat a mérés linearitási tartományának és az elméleti fehérjetartalom figyelembevételével 200-1200 µg/ml koncentrációra hígítottam. 20 mg/ml fehérje törzsoldatot használtam a mérés során. A meghatározást 96 üreges mikrotálcán végeztem, amelyen a minta/reagens arány 4:1; ennek megfelelően 120 µl minta mellé 30 µl reagenst adagoltam. Majd az ezt követő összerázás után, pontosan 15 majd 30 perc múlva a színintenzitást mértem 540 illetve 620 nm-en. (A fehérje-festék komplex spektrumának 595 nm-en található a maximuma mint azt az eljárás leírása is tartalmazza. Sajnos az általam használt fotométer ezen a hullámhosszon való mérést – a megfelelő szűrő hiányában – nem tette lehetővé, így a két legközelebb választható hullámhosszon végeztem el az abszorbancia mérését.) A fehérje-festék komplex spektrofotometriás vizsgálata bizonyította azt a mért abszorbanciaértékekből is levonható feltevést, hogy a jellemző maximumot mutató görbe az 595 nm-en jelentkező csúcstól meredeken, utána kevésbé meredeken csökken, így a 640 nm-en történő mérés szolgáltatja a koncentrációval leginkább arányos jelet. A vizsgált minták abszorbancia pontjainak standard kalibrációs görbére való illesztésével leolvasható azok fehérje koncentrációja. A mért értékeket a III. táblázat tartalmazza.

III. táblázat A fehérjekoncentráció meghatározása az egyes konjugátumokban

konjugátum	fehérje	fehérje-koncentráció [mg/ml]	fehérjemolekulatömeg	fehérjekoncentráció [$\mu\text{M}/\text{ml}$]
NKI-42722 _m	BSA	3,241	68000	$4,77 \cdot 10^{-2}$
NKI-42722 _k		4,207		$6,19 \cdot 10^{-2}$
NKI-42722 _a		3,259		$4,79 \cdot 10^{-2}$
NKI-42750 _m		5,103		$7,50 \cdot 10^{-2}$
NKI-42750 _k		3,552		$5,22 \cdot 10^{-2}$
NKI-42750 _a		3,569		$5,25 \cdot 10^{-2}$
NKI-42734 _m	KLH	1,396	600000	$2,33 \cdot 10^{-2}$

4.1.1.3. A haptén/fehérje arány meghatározása a konjugátumokban

A fent leírtak alapján kiszámolt haptén- és fehérjetartalmak ismeretében a haptén/fehérje arány meghatározható. A számított adatokat a IV. táblázat tartalmazza.

A NKI-42734 esetében (*) nem kaptam értékelhető eredményt, illetve nagyon nagy értéket kaptam a számított molarányra, aminek az az oka, hogy a KLH hordozófehérje koncentrációja csak nagy pontatlansággal határozható meg a rossz oldhatósági tulajdonságainak köszönhetően.

A számított haptén/fehérje molarány konzekvensen arányos a konjugálási reakció során adagolt reagens aránnyal (az elméleti haptén-fehérje molarányok rendre 1,0, 0,2, 0,039 μmol haptén / mg fehérje): magasabb reagensarány magasabb haptén beépülési arányt eredményezett, bár az UV spektroszkópiás és MALDI-ToF mérések segítségével meghatározott haptén/fehérje molarány alacsonyabb reagensarány mellett jobban megközelítette az elméletileg számítható értéket. A két egymástól független mérési módszer – UV spektroszkópia és MALDI-ToF – által kiszámított haptén/fehérje arány jó egyezést mutat, bár a spektroszkópiai mérés során szisztematikusan magasabb értékek voltak mérhetőek. Ezen jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy a konjugálás után végzett dialízis során nem távozott el a nem kötődött haptének teljes mennyisége, s ennek következtében a spektroszkópiásan mérhető viszonylag magas értékeket a konjugátumban kis mennyiségben még megtalálható kötetlen haptének elnyelése okozta.

IV. táblázat Konjugátumok UV spektrofotometriai és MALDI-ToF módszerrel mért haptén/fehérje aránya

konjugátum	moláris extinkciós koefficiens s [l/mol.cm]	számított haptén koncentráció [mM]	fehérje koncentráció [μM]	haptén/fehérje molarány UV spektroszkópia [mol/mol]	a konjugátum molekulatömeg MALDI-ToF	haptén/fehérje molarány MALDI-ToF [mol/mol]
NKI-42722-BSA _h	5300 ^c	0,37 ± 0,09	47,7	7,86	69329,1	6,99
NKI-42722-BSA _m		0,11 ± 0,01	61,9	1,72	67096,1	1,10
NKI-42722-BSA _l		0,04 ± 0,02	47,9	0,83	66940,6	0,69
NKI-42750-BSA _h	1900 ^d	0,54 ± 0,07	75,0	7,20	69228,1	6,72
NKI-42750-BSA _m		0,08 ± 0,05	52,2	1,53	67100,2	1,11
NKI-42750-BSA _l		0,04 ± 0,00	52,5	0,76	66916,1	0,62
NKI-42734-KLH _h	1900 ^e	0,27 ± 0,09	0,53	509*	n.d. ^f	n.d. ^f

^c mérési hullámhossz 416,5 nm.

^d mérési hullámhossz 383,5 nm.

^e mérési hullámhossz 386,5 nm.

^f nem meghatározható

4.1.2. Immunanalitikai vizsgálatok trifluralin meghatározására alkalmas ELISA rendszerek kifejlesztéséhez

Az immunanalitikai titrálási illetve gátlási kísérletek célja az immunizálást követő hetekben a szérum titerértékének valamint a gátlások IC₅₀ értékének megállapítása és ezen értékek változásának nyomonkövetése volt az optimális időpontban történő szérum nyerése érdekében.

4.1.2.1. A szérumok titrálása trifluralinszelektív ELISA eljáráshoz

Az előzőekben részletezett vizsgálatok után sor kerülhetett a konjugálási reakciók tényleges eredményességének vizsgálatára, azaz a kísérleti állatok immunizálására, vagyis a célvegyület elleni antitest termelésének kiváltására. Az immunizáláskor alkalmazott immunogén – a korábban ismertetett megfontolások alapján – a KLH hordozófehérjét tartalmazó NKI-42734-es konjugátum volt. Az első véreztetés az immunizálást követő 14. héten történt.

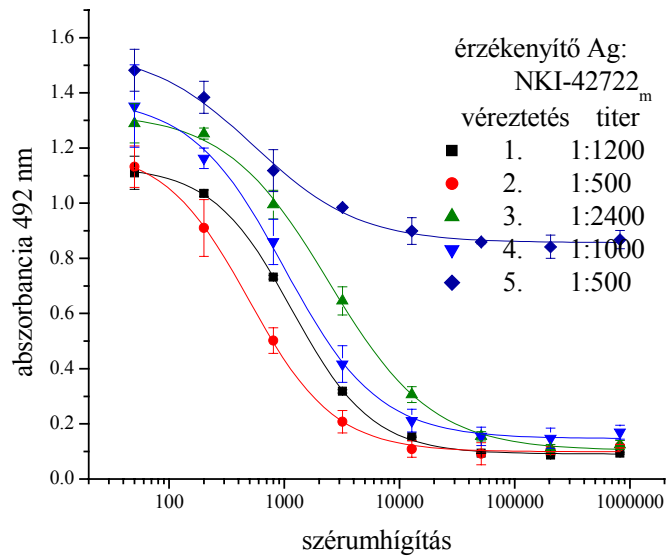
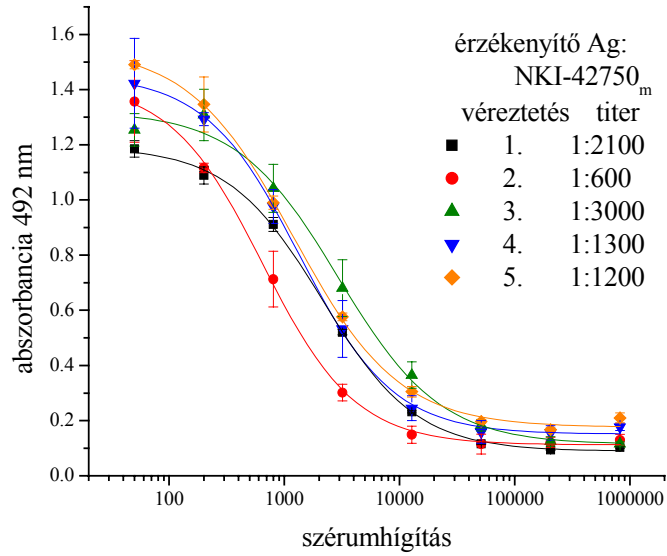
Az ELISA teszt fejlesztése során haptén heterológ rendszerben (az immunogén és az érzékenyítő antigén nemcsak a hordozófehérjében, de az ahhoz konjugált hapténben is különbözik egymástól) szilárd fázishoz kötött antigén (indirekt) alapú formában történt. A véreztetések során kapott szérumokat első lépésben titráltam, azaz megállapítottam a szérum azon koncentrációját, melyben a gátlási kísérletek során alkalmazható. (A szérum titerérték azzal a szérumhígítással definiálható, amely mellett az adott körülmények között az érzékenyítő antigén 50 %-a kötődik, vagyis amely mellett a maximumhoz képest 50 %-os jelintenzitás észlelhető.) Ezen kísérleteket két, egymástól független rendszerben végeztem, melyekben más-más érzékenyítő antigént alkalmaztam (NKI-42722-BSA, NKI-42750-BSA). Annak érdekében, hogy a mérések során értékelhető jelet kapjak, a kísérletsorozatot valamennyi esetben nagy érzékenyítésű (5 µg/ml konjugátum üregeként 100 µl adagolásban) lemezen kezdtem el. A viszonylag magas érzékenyítési koncentráció alkalmazása azért célszerű, mivel ez a kísérletsorozat kiinduló alapul szolgált az egyes véreztetések során mérhető szérum titerértékek összehasonlításához. Ilyen paraméterek között jól megfigyelhető az az előrelátható és elvárt tendencia, hogy az egymást követő véreztetésekkor a szérum antitesttartalma az újabb emlékeztető oltások nyomán egy bizonyos ideig növekszik.

Az öt különböző időpontú véreztetés alkalmával nyert szérumok alkalmazott hígítási sorát mindkét rendszerben 1:50-től 4-es inkrementummal növelve 1:819200-as hígításig készítettem el. (Vagyis az immunanalitikai színreakciót kísérletenként nyolc pontban végeztem el, minden esetben három párhuzamos mérést alkalmazva.)

A titrálási – majd később a gátlási – kísérletekben peroxidáz jelzőenzimhez kötött anti-IgG antitesteket (Bio-Rad) alkalmaztam 1:4000-es hígításban. A 20. ábrán egy-egy tipikus titrálási görbesor látható, a mérési paraméterek feltüntetésével.

V. táblázat Számított szérum titerértékek a véreztetések után

érezkenyítő antigén	titerértékek									
	1. véreztetés		2. véreztetés		3. véreztetés		4. véreztetés		5. véreztetés	
	#196	#197	#196	#197	#196	#197	#196	#197	#196	#197
NKI-42750 _m	552	628	396	646	350	2950	348	1444	404	1406
NKI-42750 _k	111	137	505	241	320	1478	237	918	266	985
NKI-42750 _{an}	125	133	123	132	121	405	112	307	117	432
NKI-42722 _m	635	600	318	461	200	2820	284	2002	174	648
NKI-42722 _k	536	474	245	344	160	2800	164	991	104	594
NKI-42722 _a	112	115	115	135	80	380	75	394	66	273



20. ábra A szérumok titrálási görbéi, titerértékek feltüntetésével az egyes véreztetések után.

Az egyes véreztetések után mindkét kísérleti nyúl által termelt antitesteket tartalmazó szérumokban meghatároztam a titerértékeket, valamint az IC_{50} értékeket (lásd. később), s ezen adatok alapján a harmadik véreztetéskor nyert szérumok tekinthetők a legjobboknak (*V. táblázat*), mindemellett az *V. táblázat* adatai azt a tényt is jól tükrözik, hogy a #197 szérum lényegesen nagyobb szérumhígítást tesz lehetővé.

A harmadik véreztetés #197 szérumával, különböző érzékenyítő konjugátumok (NKI-42722, NKI-42750), illetve azok eltérő koncentrációi mellett (5, 1, 0,3 ng/ml) nyert titerértékeket a VI. táblázat tartalmazza. A táblázat adatai azt mutatják, hogy az egyes konjugátumok magasabb érzékenyítési koncentráció mellett magasabb titerértéket engednek meg.

VI. táblázat Titerértékek indirekt, haptén-heterológ ELISA rendszerekben

érzékenyítő antigén	érzékenyítő antigénkoncentráció [µg/ml]		
	5,0	1,0	0,3
	Titer	Titer	Titer
NKI-42750 _m	1:3000	1:2000	1:1500
NKI-42750 _k	1:1500	1:800	1:300
NKI-42750 _a	1:400	< 1:200	< 1:200
NKI-42722 _m	1:2800	1:1500	1:400
NKI-42722 _k	1:2800	1:700	1:200
NKI-42722 _a	1:400	< 1:200	< 1:200

Immunogén: NKI-42734-KLH konjugátum.

A mérési pontokra illesztett szigmoid görbéből számított titerértékeket abban az esetben fogadhattam el tényleges titerértékként, ha a görbe szabályos, vagy megközelítően szabályos szigmoid lefutású, azaz felső és alsó platóval rendelkezik.

4.1.2.2. A szérumok gátlása

A gátlási kísérletekben a konjugátumok standard hígítási sorainak alkalmazásával kalibrációs görbéket vettem fel a titrálások során meghatározott szérumhígítási értékek mellett. Az ELISA módszerek érzékenysége a gátlási koncentráció középértékével úgynevezett IC₅₀ érték jellemezhető. Ez a szám definíció szerint az inhibitornak (esetünkben a trifluralinnak) azt a koncentrációértékét jelenti, amely – a rögzített paraméterek (érzékenyítés, szérumhígítás stb.) – mellett a háttérrel korrigált jelintenzitás a negatív kontroll (B₀, gátolatlan) érték a felére csökken. Az IC₅₀ értékeket a gátlási görbék középső, kvázilineáris szakaszából állapítottam meg.

A titrálási eredmények összefoglalásához hasonlóan, táblázatban összegeztem a gátlási kísérletek során nyert adatokat is, amelyek az alábbiakban láthatóak. Minden esetben feltüntettem a reakciók során alkalmazott szérumhígításokat. Az alább látható IC₅₀ értékek - a titerértékekhez hasonlóan – számítógép által számított értékek, amelyek egyes esetekben megtévesztők (ahogy arra korábban utaltam), mivel megbízható IC₅₀ érték csak szigmoid görbéről állapítható meg. Az általam nem elfogadhatónak ítélt értékeket a táblázatban dőlt betűvel jelöltem.

A VII. táblázat adatai alapján elmondható, hogy az IC₅₀ értékek – a várakozásnak megfelelően – a hozzáadott haptén mennyiségének csökkenésével párhuzamosan csökkenést mutatnak a titerértékek jelentős csökkenése mellett.

VII. táblázat Számított IC₅₀ értékek az egyes véreztetések után az alkalmazott szérumhígítások feltüntetésével.

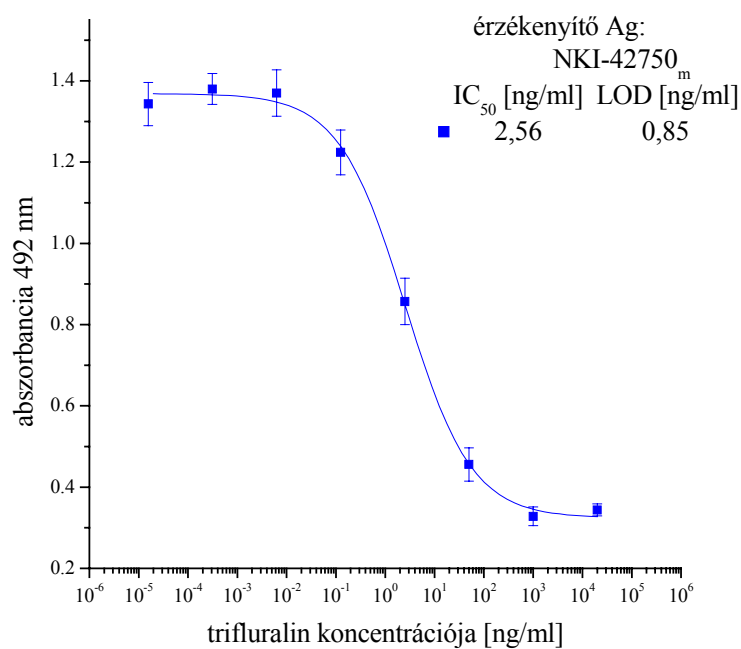
érzékenyítő antigén ^a	1. véreztetés		2. véreztetés		3. véreztetés		4. véreztetés		5. véreztetés	
	titer-érték	IC ₅₀ [ng/ml]	titer-érték	IC ₅₀ [ng/ml]	titer-érték	IC ₅₀ [ng/ml]	titer-érték	IC ₅₀ [ng/ml]	titer-érték	IC ₅₀ [ng/ml]
NKI-42750 _m	1:600	257	1:600	176	1:3000	132	1:1500	841	1:1500	22,8
NKI-42750 _k	1:200	116	1:500	6,8	1:1500	57,6	1:1000	30,9	1:1000	9,5
NKI-42750 _a	1:150	—	1:150	2,0	1:400	1,2	1:300	1,8	1:500	—
NKI-42722 _m	1:600	404	1:600	559	1:2800	2,5	1:2000	236	1:700	334
NKI-42722 _k	1:500	134	1:400	35,3	1:2800	0,2	1:1000	15,2	1:600	39,8
NKI-42722 _a	1:100	16	1:150	2,6	1:400	0,1	1:400	—	1:300	—

^a érzékenyítő antigén koncentrációja 5 µg/ml

Az optimálisnak nevezhető rendszer kiválasztásának szempontjai az IC₅₀ érték, az alkalmazható maximális szérumhígítás, a gátlás során nyert jel intenzitása (illetve az abszorbancia maximum és minimum közötti különbség), valamint a szigmoid görbe meredeksége volt. Ezen paraméterek mérlegelése után – a VIII. táblázat adatainak felhasználásával – az optimálisnak ítélt rendszer az 1 µg/ml NKI-42750_m érzékenyítésű, a harmadik véreztetés #197-es szérumát alkalmazó rendszer. A rendszer IC₅₀ értéke 2,56 ng/ml, a kimutatás alsó határa (LOD, limit of detection) 0,85 ng/ml (21. ábra).

VIII. táblázat A harmadik véreztetés szérumával nyert IC₅₀ értékek 3 érzékenyítő antigén koncentráció mellett

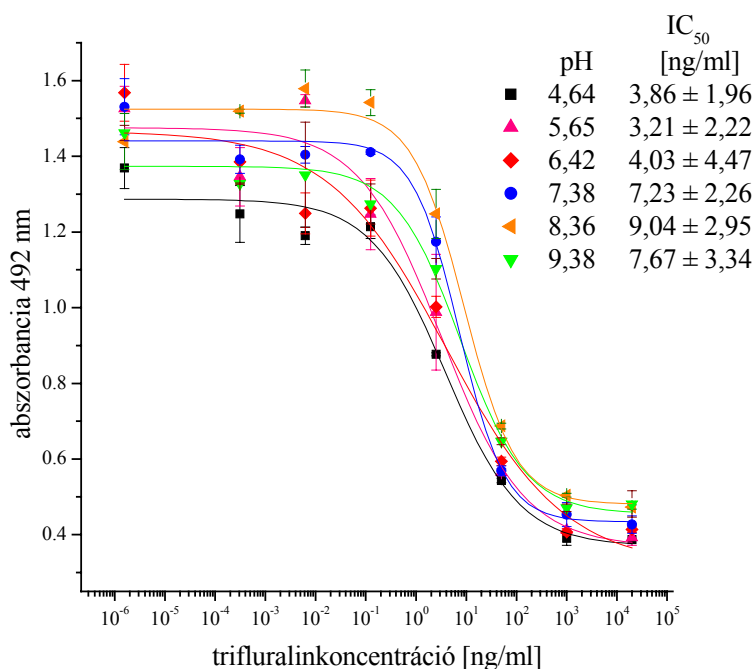
érzékenyítő antigén	érzékenyítő antigén koncentrációja [µg/ml]	titer	IC ₅₀ [ng/ml]
NKI-42750 _m	5,0	1:3000	8,13
	1,0	1:1500	2,56
	0,3	1:400	10,5
NKI-42750 _k	5,0	1:1500	4,84
	1,0	1:700	4,23
	0,3	1:200	8,81
NKI-42750 _a	5,0	1:400	2,57
	1,0	<1:200	—
	0,3	<1:200	—
NKI-42722 _m	5,0	1:2800	17,1
	1,0	1:1500	13,3
	0,3	1:200	13,1
NKI-42722 _k	5,0	1:2800	4,20
	1,0	1:800	4,11
	0,3	1:300	11,7
NKI-42722 _a	5,0	1:400	5,12
	1,0	<1:200	—
	0,3	<1:200	—



21. ábra Optimalizált standard görbe trifluralinszelektív ELISA rendszerben

4.1.2.3. pH hatás

A kísérletsorozat célja annak megállapítása, hogy az optimális rendszer érzékenységét milyen mértékben befolyásolja a pH változtatása. A mérések során hat standard görbét vettem fel (optimális rendszerparaméterek mellett), 4,64 - 9,38 pH tartományban (pH=4,64, 5,65, 6,42, 7,38, 8,36, 9,38) A méréseket 3 ismétlésben végeztem minden egyes pH-jú oldatban. A mért IC_{50} értékek jól láthatók a 22. ábrán.

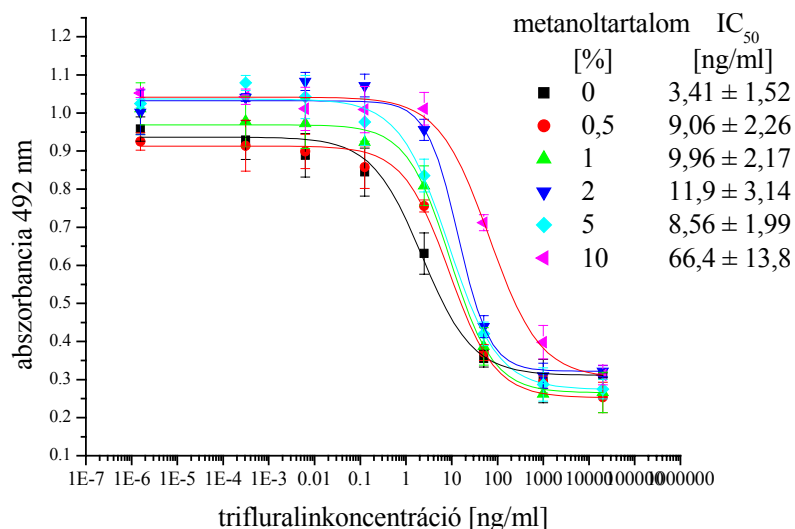


22. ábra A pH hatása az optimalizált trifluralinszelektív ELISA rendszerre

Az IC_{50} értékek valamint a görbék lefutása, meredeksége azt mutatja, hogy bár nincs a pH változtatásának szignifikáns hatása a rendszerre, optimálisnak az enyhén savas pH=6,4 tekinthető. Mindemellett a továbbiakban a gyakorlati szempontból praktikusabb, semleges (pH=7,4) pH-t alkalmaztam.

4.1.2.4. Oldószerhatás

Az optimális rendszer egyéb paraméterekre adott érzékenységbeli válaszát a különböző mintaextrakciós lépések során alkalmazható, vízzel elegyedő szerves oldószerek (metanol, etanol, acetonitril, aceton, DMSO (dimetil-szulfoxid), DMF (dimetil-formamid)) hatásának vizsgálatával folytattam. E kísérletekben a standard görbéket eltérő szerves oldószertartalmú pufferben vettem fel. Az ELISA tesztek három ismétlésben végeztem. Példaként a puffer metanoltartalmának a gátlási görbére gyakorolt hatását mutatja be a 23. ábra.



23. ábra A metanoltartalom hatása az optimalizált trifluralinszelektív ELISA rendszerre

Ahogy azt a 23. ábra görbéi is jól szemléltetik, a rendszer még jól tolerálja az 5 % (V/V) alatti metanoltartalmat, 10 % (V/V)-os metanolkoncentráció már jelentős IC₅₀-értékbeli különbséget eredményez. A metanolon kívül vizsgált egyéb oldószereket a rendszer 2 % (V/V) koncentrációig tolerálja.

4.1.2.5. Keresztreakciók

Az immunanalitikai rendszer mérni kívánt vegyületre vonatkozó specificitása az úgynevezett keresztreaktivitási értékkel jellemezhető. Ez az érték a rendszer adott vegyületre mutatott érzékenysége egy adott referenciavegyülettel szembeni érzékenységre vonatkoztatva. (A referenciavegyület általában az immunanalitikai rendszer célvegyülete.) Ennek megfelelően a keresztreaktivitási vizsgálatok célja a kifejlesztett ELISA tesztekben felhasznált antitestek specificitásának megállapítása, azaz annak vizsgálata, hogy a célvegyülethez hasonló kémiai szerkezetű vegyületek, növényvédő szer hatóanyagok esetleges jelenléte a mintában milyen mértékben zavarja a célvegyület koncentrációjának pontos meghatározását. Tehát a keresztreaktivitás (CR, *cross-reactivity*) arra ad felvilágosítást, hogy a rendszerbe a célvegyülettel együtt esetlegesen bekerülő egyéb immunreaktív vegyületek milyen mértékű gátlást mutatnak ugyanazon rendszerparaméterek mellett.

$$CR [\%] = \frac{IC_{50}(\text{ref})}{IC_{50}} * 100$$

ahol

$IC_{50}(\text{ref})$: a referenciavegyület (célvegyület) 50 %-os gátláshoz tartozó koncentrációja

IC_{50} : a keresztreagens vegyület 50 %-os gátlási koncentrációja

A képletből jól látható, hogy az egyes vegyületekre jellemző keresztreaktivitási értékeket a trifluralin illetve a kérdéses anyag IC_{50} értékének az arányából határoztuk meg. A 100 %-os CR azt jelenti, hogy a keresztreagens azonos koncentrációja ugyanakkora abszorbanciaértéket, gátlást eredményez, míg 50 %-os CR esetén az ELISA teszt keresztreagensre mutatott érzékenysége fele a célvegyületének, szemléletesen: a minta 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ keresztreagenstartalma úgy jelenik meg a mért koncentrációban, mintha 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ célvegyület lett volna jelen.

A trifluralinspecifikus ELISA rendszer keresztreaktivitási kísérleteiben, a standard trifluralin gátlási görbe mellett számos dinitroanilin herbicid (etalfluralin, benfluralin, izopropalin, pendimetalin), haptén komponensek, valamint szintetikus intermedierek gátlási görbéit vettem fel. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy az antitest igen specifikus az anilin nitrogénatomjához kapcsolt alkiláncra, s a molekula felismeréséhez valamely alkilcsoport aromás gyűrűn való jelenléte szükséges. Ennek megfelelően az *N*-alkil haptének és származékaik erősebben, jobban kötődnek az antitesthez, a felismeréshez azonban nem szükséges az anilin- illetve a benzolgyűrűn két nitrocsoport jelenléte.

IX. táblázat A trifluralin ELISA rendszerben végzett keresztreaktivitási kísérletek eredményei

keresztreagens	IC ₅₀ [ng/ml]	CR [%]
NKI-42734	3,55	163
trifluralin	5,78	100
NKI-42750	20,6	28,1
benfluralin	112	5,2
etalfuralin	203	2,9
NKI-42722	341	1,7
2,6-dinitro-4-trifluorometilfenol	7003	0,18
izopropalin	13150	< 0,1
pendimetalin	> 20000	<< 0,1
anilin	> 20000	<< 0,1
2,6-dinitroanilin	> 20000	<< 0,1
2,4-dinitro-klór-benzol	> 20000	<< 0,1
2-hidroxi-benzotrifluorid	> 20000	<< 0,1
N-propil-6-amino-hexánsav	> 20000	<< 0,1
N-metil-6-amino-hexánsav	> 20000	<< 0,1

Tehát a keresztreaktivitási értékek azt mutatják (IX. táblázat), hogy a rendszer kellő mértékben specifikus a trifluralinra, számottevő keresztreaktivitást hapténekre, nem „rokon” dinitro-anilin herbicidekre ad.

4.1.2.6. Mátrixhatások vizsgálata

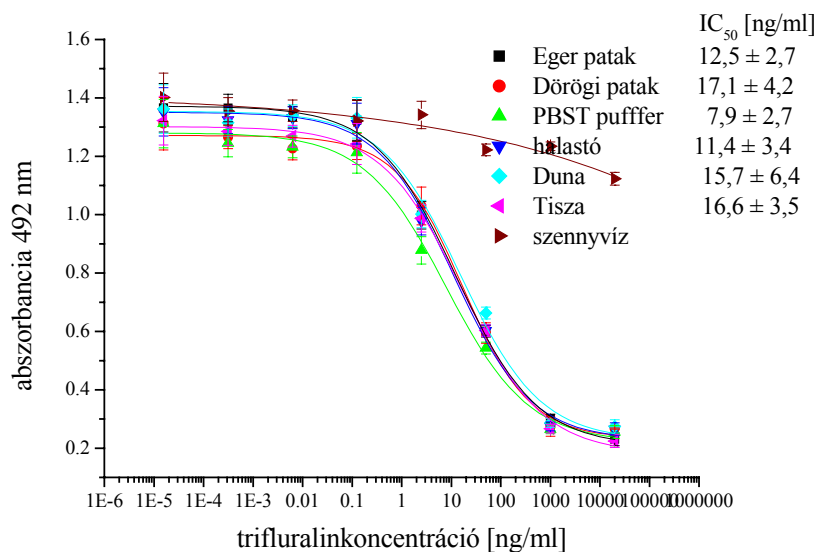
A növényvédő szerekkel kezelt növények, a felhasználásukkal készült takarmányok, élelmiszerek növényvédő szer maradványai az egész társadalomra terhelést jelentenek. Hazánkban a fogyasztásra kerülő növényi és állati eredetű élelmiszerekben lévő peszticidmaradványok koncentrációját folyamatosan ellenőrzik. A mérési eljárások élelmiszerek monitorálására is alkalmas formáit és gyakorlatát az Amerikai Egyesült Államokban már néhány éve kidolgozták (*The National Pesticide Monitoring Program*, 1994). Ennek alapján lehetőség van arra, hogy az élelmiszer alapanyagokat, a készételeket, a konzerveket, a mirelit árukat stb. alapos vizsgálat alá vegyék. Tekintve, hogy élelmiszer-egészségügyi szempontból a még megengedhető peszticid maradékszinteket szigorú előírások szabályozzák, az ezen típusú anyagok kimutatása, illetve mennyiségi meghatározása az élelmiszervizsgálatok fontos része. Ehhez a programhoz tartozik a talaj, az élővizek, növény- és állatvilág terhelésének felmérése is [87]. A felszíni vizek peszticidszennyeződése világméretű probléma. Az élővizek szennyeződése bekövetkezhet a szél elhordó hatására, a talajvíz bemosódásával, a befolyó vizekkel, szándékos szennyezéssel stb. A víz minősége romlik, amelynek következtében költségesebb az ívóvíztisztítás, és a

szennyezőanyag a vízi szervezetek pusztulását, az ökológiai egyensúly megbomlását idézi elő. Az ember részben a szennyezett ivóvízzel, részben a szervezetükben peszticideket tartalmazó halak fogyasztásával kontaminálódhat.

Az ELISA módszer legnagyobb előnyeként említettem meg, hogy tisztítási műveletek nélkül vagy csak minimális tisztítással vizsgálhatók azok a vizes közegű minták, amelyek a hagyományos analitikai módszereknél (GC, HPLC) bonyolult előkészítést igényelnek. Azonban, az általam vizsgált zöldséglé minták magas szervesanyag-tartalma miatt célszerűnek tűnt a mátrixhatás vizsgálatára irányuló kísérletek elvégzése. Kétféle jellegű mintát választottam egyrészt a mátrixhatás jelentőségének szemléltetése, másrészt az ELISA rendszerek alkalmazhatósági (felhasználási) területeinek érzékeltetése céljából. A mátrixhatás vizsgálatokat felszíni élővizekben, illetve különböző zöldséglevékben végeztem.

A trifluralin kimutatására optimalizált ELISA eljárást különböző folyó és felszíni vizeken teszteltem. Mivel a vízminták tisztának látszottak – nem tartalmaztak lebegő anyagokat – így az ELISA teszttel való elemzésük előzetes filtrációs/szűrési lépés közbeiktatása nélkül történhetett. A mért eredmények alapján elmondható, hogy nem volt detektálható mennyiségű trifluralin a 6 vizsgált mintában, mezőgazdaság által művelt területeken átfolyó patakok (Dörögdi és Eger patak), halastó (Monostorapáti), nagyobb jelentőségű és szennyezett folyók (Duna Leányfalu és Tisza Keleti Főcsatorna), valamint erősen szennyezett még kezeletlen ipari szennyvíz (Budapesti Vegyiművek, KOI \cong 3000-4000 mg/ml), ennek köszönhetően a következőkben ezen mintákat a standard trifluralin gátlási görbék mátrixaként alkalmazhattam. A vízminták pH értéke némileg alkalikusnak mutatkozott, azonban a felszíni vizekben felvett standard görbék statisztikailag minden esetben megegyeztek a PBST pufferben felvett görbével annak ellenére, hogy a pH-t nem állítottam be pontosan 7,4-es értékre. Ennek megfelelően az ELISA rendszer kimutatásának alsó határa megegyezett a felszíni vizekben a pufferben mérttel (0,85 ng/ml). Jóllehet ez az érték nem alkalmas az ivóvizek trifluralintartalmának monitorizálására (MRL = 0,1 ng/ml), megfelelő a környezeti trifluralinszennyezettség vizsgálatára (24. ábra).

Ezzel ellentétesek a szennyvízminták vizsgálatakor kapott eredmények, mikor is nem kaptam értelmezhető standard görbét, a rendkívül magas, mért jelintenzitás a vizsgált mátrixban jelenlevő vegyületekre utal. Ez a jelenség fennmaradt akkor is, amikor a szennyvíz savas pH-ját (3,5) beállítottuk 7,4-re, valamint szűréssel eltávolítottuk a pH állításkor kivált fehér csapadékot.



24. ábra Mártixhatás vizsgálata szennyvízben és felszíni élővizekben

A trifluralintartalom és a mártixhatás tesztelése hasonló módon történt sárgarépa- (8,8% szárazanyag tartalom, Dr. Steinberger Nachf., Unkel, Németország), tök- (9% szárazanyag tartalom, Bercsényi M. Élelmiszeripari Szakközépiskola, Budapest, Magyarország), illetve paradicsomlé (5% szárazanyag tartalom, Rauch Hungaria Kft., Budapest, Magyarország) esetében. Mivel nem volt detektálható mennyiségű trifluralin egyik zöldséglében sem, a leveket különböző hígítási faktorok mellett (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100) PBST 0,05 pufferrel hígítottam és különböző mennyiségű trifluralint (2, 10, 50 és 150 ng/ml) adagoltam hozzájuk. Az ismert mennyiségű, hozzáadott trifluralinkoncentráció meghatározása a három említett zöldségmátrixban történt, mikor is a standard görbét pufferben vettem fel, a zöldséglé mintákat hármas ismétlésben vittem fel a mikrotiter lemezre. (X. táblázat). A kapott eredményekből arra következtethetünk, hogy a tök- valamint a paradicsomlevek esetén 10-szeres, míg sárgarépalé esetén 5-szörös hígítás szükséges az egyébként fellépő mártixhatás kiküszöböléséhez. (A hígítási faktor értéke nem csökkenthető centrifugálási lépés közbeiktatásával sem.)

X. táblázat Trifluralin ELISA rendszerben végzett visszamérési kísérletek eredményei

minta mátrix	bemért trifluralin-koncentráció [ng/ml]	ELISA teszttel visszamért koncentráció [ng/ml]
répalé	2	< 1
	10	15,9 ± 2,4
	50	54,7 ± 3,2
	150	196 ± 5,6
töklé	2	< 1
	10	14,9 ± 2,9
	50	44,5 ± 4,8
	150	135 ± 8,2
paradicsomlé	2	3,87 ± 1,21
	10	11,2 ± 4,1
	50	45,3 ± 5,4
	150	>500

A legalacsonyabb, 2 ng/ml hozzáadott trifluralinkoncentráció répa- és töklé esetén túlságosan alacsonynak mutatkozott, azonban a magasabb hozzáadott trifluralinkoncentráció már mérhető volt mindhárom vizsgált mátrix esetén. Paradicsomlé esetén a kimutatás alsó határa alacsonyabbnak mutatkozott, már 2 ng/ml hozzáadott trifluralinkoncentráció detektálható volt – bár meglehetősen magas felülmérés (94%) mellett –, 10 és 50 ng/ml-es koncentráció már nagyobb pontossággal volt mérhető, a 150 ng/ml-es szint azonban már túl magasnak bizonyult.

Bár sem a FAO/WHO sem az Európai Unió nem határozott meg trifluralinra hivatalos maximális szermaradékszintet (MRL, *maximal residue level*) [88, 89], számos ország 0,05 és 1,0 ppm között határozza meg a MRL-t (Mint például a US EPA szerint az MRL 1,0 ppm répában [90], továbbá Magyarországon az MRL minden termékre vonatkozóan 0,1 ppm). Mivel a gyümölcs- és zöldséglevelek szárazanyagtartalma 60-96% közötti (kivételt képez az alma, ahol is ez az érték 37 % körüli) [91], az MRL értéke ezen levekben 30 - 600 ng/ml. (A répa-, tök-, valamint paradicsomlevelek sűrűsége a fentebb leírt kísérletekben rendre 1,028, 1,036 és 1,043 mg/ml volt.) Ezen értékek figyelembevételével a kifejlesztett ELISA rendszer kimutatási határa (LOD, *limit of detection*) alkalmassá teszi a mérési módszert a vizsgált ivólevelek trifluralinkoncentrációjának MRL szinten való mérésére. Különösen igaz ez az állítás répalé esetén, mikoris az ELISA rendszer kimutatási határa több mint egy nagyságrenddel kisebb, mint ami az MRL méréséhez szükséges lenne.

4.1.2.7. Az ELISA teszt validálása GC-MS módszerrel

A kifejlesztett teszt pontosságának meghatározása érdekében desztillált vizes mintában ismert mennyiségű trifluralint tartalmazó vizes oldatok trifluralinkoncentrációját mértem vissza az ELISA meghatározás mellett független, GC-MS módszerrel. A hozzáadott trifluralinkoncentráció 0,25–25 ng/ml tartományba esett. A két módszerrel mért koncentrációkat a *XI. táblázat* tartalmazza.

A GC-MS vizsgálatokban a mennyiségi meghatározás érdekében két jellemző fragmensiontot választottam ki a teljes spektrumból (264, 306). A mennyiségi meghatározáshoz szükséges kalibrációs görbét a standard oldatokhoz tartozó csúcsterületek segítségével vettem fel. A választott GC kolonna és hőmérsékletprogram mellett a trifluralin csúcs retenciós ideje (R_t) 7,27 perc. A 0, 0,25 és 0,50 ng/ml trifluralinkoncentrációjú kalibrációs pontok esetében nem kaptam a nulla értéktől szignifikánsan különböző jelet, amely arra enged következtetni, hogy SPME/GC-MS technikát alkalmazva a trifluralin kimutatásának alsó határa (LOD) 1 ng/ml. A kalibrációs görbe 0, 5 és 25 ng/ml tartományban mért magas regressziós együtthatója ($r^2 = 0,994$) azt mutatja, hogy a standard görbe alkalmas desztillált vizes, trifluralintartalmú minták analízisére. A minták trifluralinkoncentrációját keresztvalidálással (más néven „*leave-one-out*” módszerrel) határoztam meg, azaz az adott pontot kihagyva a kalibrációs egyenes felvételéből, a regressziós egyenes segítségével kiszámítottam annak koncentrációját. A validálási kísérletek során az ELISA tesztekben ugyanazon mintákat használtam fel a trifluralinkoncentráció meghatározására, mint amelyeket a GC-MS mérés során megmértem, a koncentrációkat ebben az esetben (ELISA) – a fentebbiekben leírtak szerint – PBS pufferben felvett standard görbe segítségével állapítottam meg. A két módszer által kapott értékek jó egyezést mutattak 1 - 10 ng/ml koncentrációtartományban (meredekség 0,96, $r^2 = 0,988$); míg 25 ng/ml-es koncentrációban az ELISA teszt a trifluralin mennyiségét 35 %-kal felülbecsülte (*XI. táblázat*).

XI. táblázat Pufferben mért hozzáadott trifluralinkoncentráció GS-MS és ELISA rendszerben

hozzáadott trifluralin-koncentráció [ng/ml]	GC-MS-sel mért trifluralin-koncentráció [ng/ml]	ELISA-val mért trifluralin-koncentráció [ng/ml]
0	-0,28 ± 0,29	< 0,02
0,25	-0,15 ± 0,28	0,22 ± 0,09
0,50	0,03 ± 0,25	0,39 ± 0,12
1,00	0,83 ± 0,21	0,84 ± 0,15
2,50	2,92 ± 0,08	1,79 ± 0,38
5,00	4,32 ± 1,01	4,16 ± 1,16
10,0	11,3 ± 2,22	10,6 ± 0,48
25,0	24,6 ± 3,76	34,1 ± 8,8

4.2. Citokinin ELISA rendszer fejlesztése

4.2.1. A hormonfehérje konjugációs reakciók sikerességének nyomon követése izoelektromos fókuszálással (IEF)

A hapténmolekuláknak fehérjébe való beépülése a hordozófehérje és a BSA-konjugátumok izoelektromos fókuszálással jól nyomon követhetőnek bizonyult. A fehérje és konjugátumai izoelektromos pont (pI) értékeiket a következő fehérjestandardok felhasználásával határoztuk meg: amiloglükozidáz (pI=3,5), szójabab-tripszin inhibitor (pI=4,55) és szarvasmarha szénsav-anhidráz (pI=5,84). Minden egyes BSA konjugátum esetén (Z-BSA, ZR-BSA és IPA-BSA) a pI csökkenése volt tapasztalható, ami a hapténmolekuláknak a fehérjék szabad aminosavaihoz való kötődésének tudható be, amikor is a kötődés hatására a fehérjék kevesebb pozitív töltésű csoportot tartalmaztak. A pI érték a BSA, a Z-BSA, a ZR-BSA és az IPA-BSA esetében 4,63, 4,32, 4,01 illetve 4,17 volt. A ZR-BSA, valamint az IPA-BSA pI értéke kisebbnek mutatkozott, mint a Z-BSA pI értéke, amely magasabb hapténbeépülési arányra utal a hapténmolekula ribozidgyűrűjén történő konjugáláskor. A zeatin-BSA konjugátum esetében – bár a konjugáció határfoka kisebb volt ez esetben – a pI érték csökkenése bizonyos mértékű hapténbeépülésre utal. További közvetett bizonyítéka annak, hogy a haptén sikeresen kötődött a protein felületére (ahogy az már a korábbiakban is valószínűsíthető volt), hogy a kompetitív, haptén homológ ELISA rendszerben végzett kísérletek során az elméletinek megfelelő gátlási görbéket sikerült felvenni. Tehát az eredmények azt mutatják, hogy lezajlott a hapténbeépülés a fehérjekonjugátumokban.

4.2.2. Immunanalitikai vizsgálatok

A citokininspecifikus ELISA tesztek fejlesztése során – első lépésben – a trifluralin ELISA-ban is alkalmazott torma peroxidázt használtam jelzőenzimként. Azonban, mint az a fejlesztési lépések során végzett kísérletekből kiderült, annak ellenére, hogy a mintaelőkészítést követően esetenként peroxidázt tartalmazó növényi extraktumok a detektálási lépést megelőzően kerülnek az ELISA tálcára, és az egyes lépések közé iktatott mosási lépések során az enzim fő mennyisége eltávozik a rendszerből, néhány esetben „fals” pozitív eredmény okoz a még esetlegesen jelenlevő aktív peroxidáz enzim. A probléma megoldására két út "kínálkozott": a növényi minta ELISA tesztel történő mérést megelőző tisztítása a jelenlevő peroxidáz enzimtől, illetve a peroxidáz jelzőenzim cseréje más jelzőenzimre. Mivel a kiindulási cél egy gyors, minél kevesebb előkészítési lépést szükségessé tevő rendszer kifejlesztése volt, valamint figyelembe véve, hogy a minta „peroxidázmentesítése” esetlegesen gátolhatja az ELISA teszt peroxidáz jelzőenzimének aktivitását, a döntés a jelzőenzim cseréjére esett. A következőkben ismertetem mindkét jelzőenzimmel (torma peroxidázzal (TP), valamint alkalikus foszfatázzal (AP)) végzett optimalizálási lépéseket, mely így lehetőséget nyújt a két enzim rendszeren belüli viselkedésének összehasonlítására.

4.2.2.1. A szérumok titrálása citokininszelektív ELISA eljárásához

A titrálási kísérletek során az alkalmazott két különböző konjugátumnak, illetve antitestnek köszönhetően kétféle felépítésű ELISA rendszert használtam. Hapténhomológ rendszert, amikor az immunogénben és az érzékenyítő antigénben szereplő haptén (esetünkben citokinin hormon) azonos (csak a hordozófehérje különböző, így BSA vagy OVA), valamint hapténheterológ rendszert, ekkor az immunogén és az érzékenyítő antigén nemcsak a hordozófehérjében, de az ahhoz konjugált (hormon) hapténben is különbözik egymástól. A hapténhomológ rendszerben az antitest erősebben kötődik az érzékenyítő antigénhez (magasabb titer), ugyanakkor a rendszer érzékenysége rendszerint gyengébb (magasabb IC_{50}). A hapténheterológ rendszerek rendszerint kedvezőbb érzékenységuék, ugyanakkor csak akkor kivitelezhetők, ha azt az antitest szelektivitási jellemzői lehetővé teszik (vagyis az antitest a hapténheterológ konjugátumhoz is kötődik).

A szérum titrálási kísérletekben a három citokinin hormon (zeatin [Z], zeatin-ribozid [ZR] és izopentenil-adenozin [IPA]) ellen immunizált nyulakból hat-hat időpontban nyert szérumokat használtam, nyersalakban, előzetes tisztítás nélkül. A kezdeti szérum- és antitestkoncentrációtól, valamint érzékenyítéstől kiindulva kerestem az optimális,

legnagyobb érzékenységhez tartozó mérési paramétereket. A méréseket minden egyes vizsgált rendszerben hármas ismétlésben végeztem. A titrálási kísérletek – mint majd később a gátlási kísérletek – során második antitestként kétféle jelzőenzimet alkalmaztam: torma peroxidázt (Humán Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet) valamint alkalikus foszfatázt (Sigma Chemicals), a peroxidázt 1:4000-es, a foszfatázt pedig 1:5000-es hígításban.

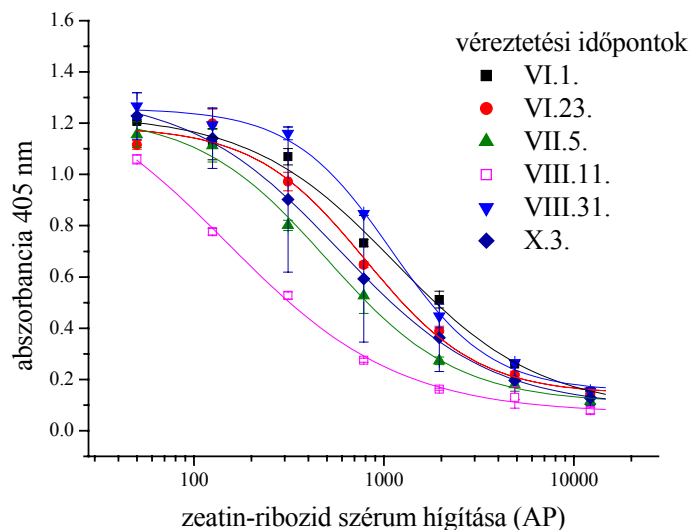
4.2.2.1.1. A zeatin-ribozid antiszérum titerértékek időfüggése

Abból a célból, hogy az immunizálást követő hat véreztetés szérumai közül kiválaszthassam az optimálist a zeatin-ribozid homológ rendszerben minden egyes szérum titrálási vizsgálatát elvégeztem. A kísérletsorozatban 1 $\mu\text{g/ml}$ -es lemez érzékenyítést alkalmaztam, a szérumokat 1:20-as hígítástól kiindulva 2,5-ös inkrementummal 1:12200-es hígításig készítettem. A titrálási görbék a 25. ábrán láthatók.

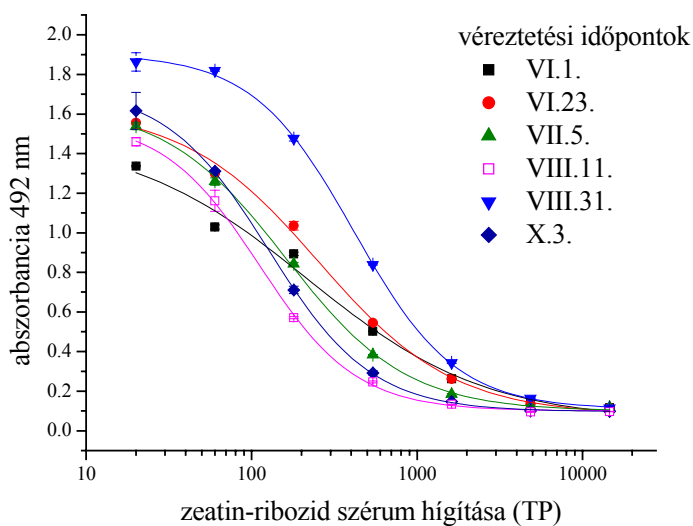
Az azonos (ZR-OVA) antigén ellen azonos nyúlból hat különböző időpontban nyert szérumok peroxidáz jelzőenzim alkalmazása mellett szignifikánsan kisebb titerértéket mutatnak (lásd. XII. táblázat adatait). A további kísérletekben a foszfatáz-rendszerben legmagasabb szérumhígítást megengedő két szérum közül a VI. 21-i szérumot választottam.

XII. táblázat Különböző véreztetési időpontokhoz tartozó titerértékek

véreztetési időpont	titer	
	torma peroxidáz	alkalikus foszfatáz
VI. 1.	1:210	1:1100
VI. 21.	1:250	1:800
VII.5.	1:160	1:500
VIII. 11.	1:110	1:150
VIII. 31.	1:410	1:1100
X. 3.	1:130	1:580



(a)



(b)

25. ábra Különböző időben nyert anti-ZR-OVA szérumsok titrálási görbéje
jelzőenzim: (a): alkalikus foszfátáz, (b): torna peroxidáz

4.2.2.1.2. A zeatin-ribozid antiszérums titrálása hapténhomológ rendszerben

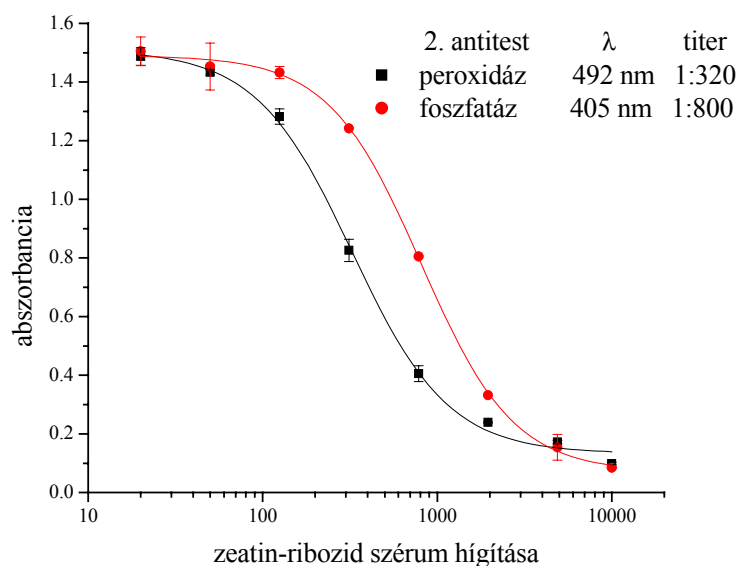
A titrálási kísérleteket először torna peroxidáz jelzőenzim alkalmazásával végeztem. Ezen kísérletekben a mikrotálcák érzékenységét (5, 2,5 és 1 $\mu\text{g/ml}$ ZR-BSA konjugátum 100 $\mu\text{g/üreg}$ mennyiségben) változtattam. A ZR-OVA szérums hígítási sorát 1:20-tól 2,5-ös inkrementummal növelve 1:12200-es hígításig készítettem el. Jellegzetes titrálási görbe látható a 26. ábrán. Ezt a görbét 1 $\mu\text{g/ml}$ -es érzékenyítés mellett nyertem (titerértéke

1:320), ám a további kísérletekből nyert titrálási görbék is hasonló lefutásúak voltak. A különböző érzékenyítési szintek mellett kapott titerértékeket a *XIII. táblázat* tartalmazza.

XIII. táblázat Különböző érzékenyítési szintek mellett mért titerértékek

ZR antiszérum titrálása homológ rendszerben	érezkenyítés [###g/ml]	titer
	5	1:160
	2,5	1:250
	1	1:320

A táblázat adataiból látható, hogy a különböző érzékenyítések mellett azonos nagyságrendű titerértékeket kaptam, melyek az érzékenyítés csökkentésével párhuzamosan, enyhén emelkedtek. Ezen kísérletek eredményeit felhasználva végeztem el a titrálási kísérleteket alkalikus foszfatáz jelzőenzim alkalmazásakor. A titrálási kísérletekhez 1 ### g/ml ZR-BSA konjugátummal érzékenyített mikrotálcát használtam, amely érzékenyítési koncentráció mellett, a torna peroxidáz jelzőenzimmal végzett optimalizálási kísérletekben a legnagyobb érzékenységet tudtam elérni. A kísérlettel azt próbáltam eldönteni, hogy az enzimsere milyen mértékben befolyásolja a szérumszámértékét, a standard gátlási görbék felvételekor alkalmazható-e egyazon szérumszámérték. Torna peroxidáz enzim rendszer esetében a titerérték 1:320, míg alkalikus foszfatáz rendszerben 1:800 volt.



26. ábra ZR szérumszámérték titrálási görbéje homológ rendszerben

4.2.2.1.3. A zeatin-ribozid antiszérum titrálása haptén-heterológ rendszerben

A ZR-OVA szérumhígítási sorát a homológ rendszerhez hasonlóan 1:20-tól 2,5-ös inkrementummal 1:12200-as hígításig növelve használtam. A titrálási kísérletekben a mikrotálca érzékenyítését 1, 2,5, 5 μ g/ml-es Z-BSA konjugátum (100 μ l/üreg) között változtattam. Egyik érzékenyítési koncentráció mellett sem kaptam jól értékelhető titrálási görbét. A színreakció nemcsak lassú volt, de az egyes hígítási értékek mellett nem volt megfigyelhető színintezitásbeli különbség. Azaz a rendszer nem szelektív a zeatin-ribozidra: az antitest nem kötődik a szilárd fázison rögzített heterológ zeatinkonjugátumhoz. Az eredmények azt mutatják, hogy ezen heterológ rendszer nem használható fel növényi hormonok kimutatására.

4.2.2.1.4. A zeatin antiszérum titrálása hapténhomológ illetve -heterológ rendszerben

A homológ rendszerű titrálási kísérlet sorozatban 1 μ g/ml-es Z-BSA konjugátum érzékenyítési koncentráció mellett dolgoztam. A Z-OVA szérumot 1:20-tól 3-as inkrementummal 1:14580-ig hígítottam. Ezen homológ rendszerben a színreakció kellőképpen gyors, azonban a titrálási görbe felső platóját még 1:20-as hígítás mellett sem sikerült elérni. A titerérték tehát alacsonynak, 1:20-as (vagy afölötti) értékűnek mutatkozott.

A heterológ rendszer esetében érzékenyítő antigénként kétféle hapténkonjugátumot használtam, a ZR-OVA esetén 1 μ g/ml, míg ZR-BSA esetén 1, 2,5, 5 μ g/ml-es koncentrációban. Mindkét alkalmazott szérum (ZR-OVA-val érzékenyített lemez mellett Z-BSA szérum, ZR-BSA-val érzékenyített lemez mellett Z-OVA szérum) koncentrációját 1:20-tól 3-as inkrementummal 1:14580-ig változtattam. A különböző érzékenyítések és érzékenyítési szintek mellett kapott titerértékeket az *XIV. táblázat* tartalmazza.

XIV. táblázat Eltérő érzékenyítésű lemezek vizsgálatával nyert titerértékek

érezkenyítő antigén	érezkenyítés [μ g/ml]	titer ^a	megjegyzés
ZR-BSA	1	1:100	
ZR-BSA	2,5	1:150	nincs felső plató
ZR-BSA	5	1:180	nincs felső plató
ZR-OVA	1	1:270	szabálytalan lefutású görbe, igen gyenge jel

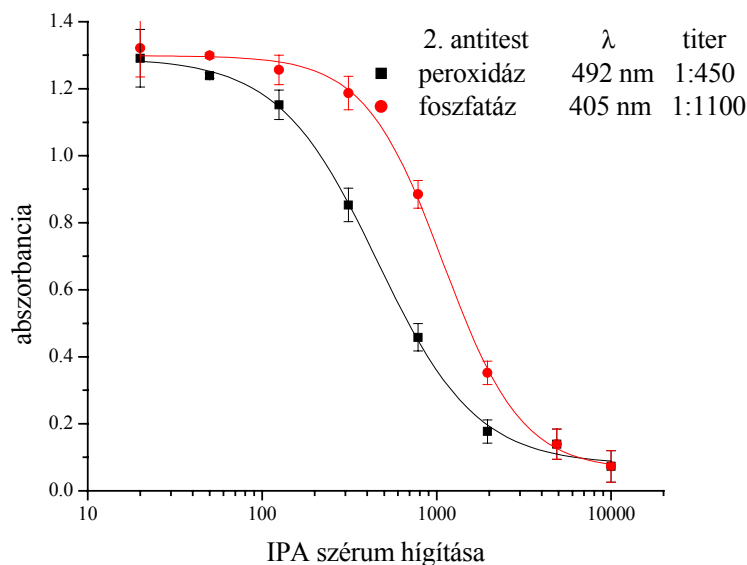
^a a jelzőenzim torma peroxidáz

A táblázat adataiból látható, hogy a különböző érzékenyítések mellett azonos nagyságrendű titerértékeket kaptam, melyek az érzékenyítés csökkenésével, enyhén csökkentek.

4.2.2.2. Az izopentenil-adenozin antiszérum titrálása

Az izopentenil-adenozin (IPA) antiszérum titrálását a zeatin-ribozid antiszérum titrálási kísérleteihez hasonlóan végeztem el, azaz először torna peroxidázt, majd alkalikus foszfátázt alkalmazva jelzőenzimként, 1, 2,5, valamint 5 $\mu\text{g/ml}$ érzékenyítő antigén (IPA-BSA) koncentráció mellett. Itt az IPA szérumhígítási sorát 1:50-től 2,5-es inkrementummal növelve 1:12200-as hígításig készítettem el.

Az anti-IPA szérum 5 $\mu\text{g/ml}$ -es érzékenyítés mellett nyert titrálási görbéit (a két enzim mellett) mutatja a 27. ábra. Összehasonlítva a peroxidáz jelzőenzim használata mellett kapott titerértékekkel (optimális esetben 1:450), az alkalikus foszfátáz jelzőenzimet alkalmazó rendszert (itt a titerérték 1:1100) egy nagyságrendi különbség tapasztalható. Ez arra utal, hogy ez utóbbi rendszer érzékenyebben reagál kisebb szérumkoncentrációra is.



27. ábra IPA szérum titrálási görbéje

Mint az a növényi minták hormonkoncentrációját célzó kísérletek során láthatóvá vált, a peroxidáz enzimes jelölés nem alkalmas növényi mintákban való hormonszint meghatározásra. A XV. táblázatban az alkalikus foszfátáz mellett mért titerértékeket foglaltam össze a későbbiekben mért IC_{50} értékek feltüntetésével.

XV. táblázat A titrálási kísérletek összefoglaló táblázata a titer és IC₅₀ értékek feltüntetésével

érzékenyítő antigén	érzékenyítési koncentráció [µg/ml]	immunogén	titer ^a	IC ₅₀ ^a [ng/ml]	kimutatási határ [ng/ml]
ZR-BSA	5,0	ZR-OVA	1:1000	>100 ^b	6,2
	2,5		1:800	100 ^b	4,9
	1,0		1:800	19 ^b (1:800)	0,4
			130 ^b (1:160)	1,9	
ZR-OVA	5,0	Z-BSA	1:600	—	—
ZR-BSA	5,0	Z-OVA	1:600	—	—
	2,5		1:500	—	—
	1,0		1:300	—	—
Z-BSA	1,0	Z-OVA	1:100	—	—
IPA-BSA	5,0	IPA-OVA	1:1100	18 ^c	0,7
	2,5		1:1500	> 240 ^c	10,5
	1,0		1:1600	—	—

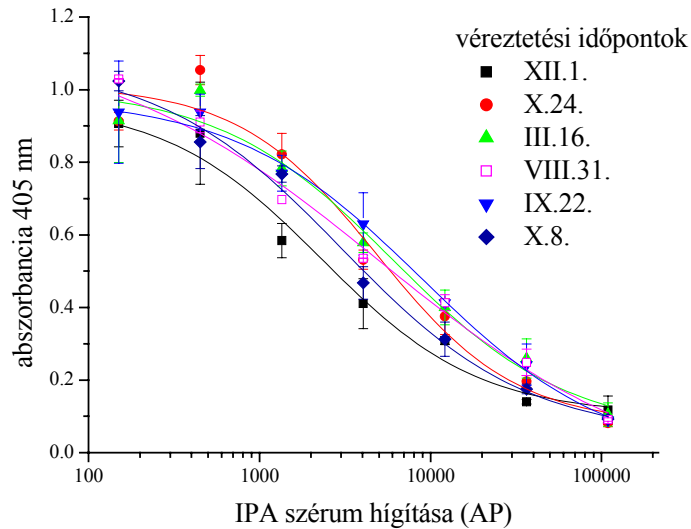
^a A táblázatban szereplő adatok alkalikus foszfatáz jelzőenzimmel végzett kísérletek eredményeit tükrözik.

^b Célvegyület: ZR.

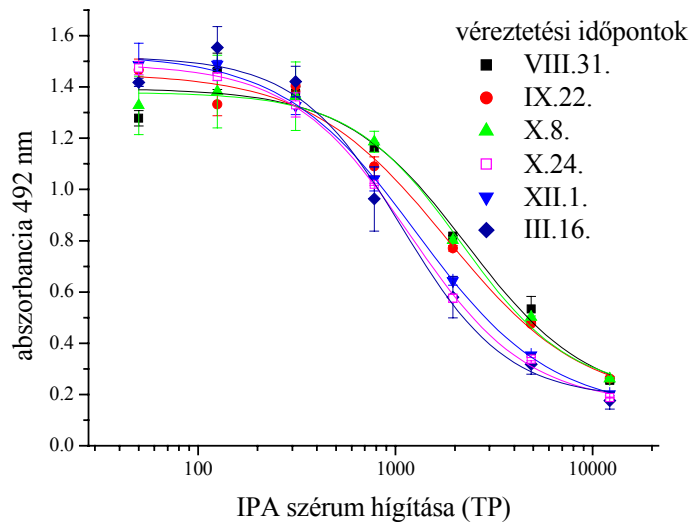
^c Célvegyület: IPA.

4.2.2.2.1. A izopentenil-adenozin antiszérum titerértékek időfüggése

Csakúgy, mint a ZR antiszérum esetében, az IPA antiszérumok között is hat különböző időpontban vett frakciót vizsgáltam. A kísérleti körülmények itt is a fentiekkel azonosak voltak. Ebben a sorozatban 5 µg/ml-es érzékenyítést alkalmaztam. A titrálási görbék a 28. ábrán láthatók. Az azonos (IPA-OVA) antigén ellen azonos nyúlból hat különböző időpontban nyert szérumok e vizsgálatban mind azonos lefutásúak voltak mindkét jelzőenzim mellett.



(a)



(b)

28. ábra Különböző időben nyert anti-IPA szérumok titrálási görbéje
jelzőenzim: (a): alkalikus foszfatáz, (b): torna peroxidáz

4.2.2.3. A szérumok kompetitív gátlási vizsgálatai

A gátlási (kompetitív) kísérletekben a hormonok standard hígítási sorainak alkalmazásával kalibrációs görbéket vettem fel különböző szérumhígítási értékek és érzékenyítési koncentrációk mellett a módszerek érzékenységét jellemző IC_{50} érték (definíciót lásd trifluralin ELISA) minimalizálása céljából. A következőkben ismertetem a növényi minták mérésekor is felhasznált alkalikus foszfatáz enzim jelölést alkalmazó ELISA-teszt fejlesztés gátlási kísérleteit.

4.2.2.3.1. A zeatin-ribozid antiszérum gátlása homológ illetve heterológ rendszerben

A gátlási kísérleteket a titrálás alapján megállapított szérumszámítások mellett végeztem. Zeatin-ribozid homológ rendszerben három szérumszámítás mellett dolgoztam (1:800, 1:300 és 1:160) az optimális érték meghatározása érdekében, s a zeatin-ribozid koncentrációját 4000 ng/ml-től negyedelve 0,97 ng/ml-ig hígítottam. A kapott IC₅₀ értékek rendre 19, 32, 130 ng/ml, tehát ebben a vizsgálatban a szérumszámítás optimális hígítást 1:800-nak találtam, s a későbbiekben is ezt az értéket használtam.

Zeatin-ribozid heterológ rendszerben a gátlási reakciók nem végezhetőek el, mivel az előzetes titrálási reakciók nem adtak pozitív eredményeket, amely alapkövetelménye a gátlási kísérleteknek.

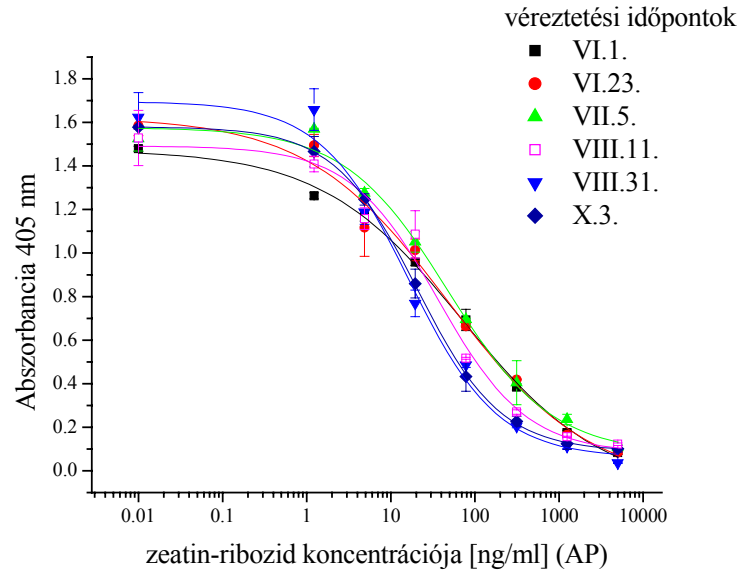
4.2.2.3.2. A zeatin antiszérum gátlása homológ és heterológ rendszerben

A haptén-homológ ELISA rendszerben a titrálási kísérletek eredményessége után sor kerülhetett a gátlási görbék felvételére, amely kísérletek sikeressége esetén ezen rendszer alkalmazható lett volna a természetes növényi citokininek közül az egyik legnagyobb koncentrációban előforduló hormon mennyiségi meghatározására. A gátlási kísérletek azonban negatív eredményt adtak, így ezen rendszer gyakorlatban nem használható.

A gátlási görbéket heterológ rendszerben is a titrálás reakciók alapján megállapított szérumszámítások mellett végeztem. (A titerértékeket ld. a *XV. táblázatban*.) A gátlási reakciók azonban – hasonlóan a homológ rendszerhez – minden alkalommal ugyanazzal az eredménnyel jártak. Egyik esetben sem lehetett a standard görbéket megállapítani, ugyanis az egyes hígítási értékek színreakciói között nem jelentkezett különbség.

4.2.2.3.3. A zeatin-ribozid antiszérum zeatin-ribozid általi gátlásának időfüggése

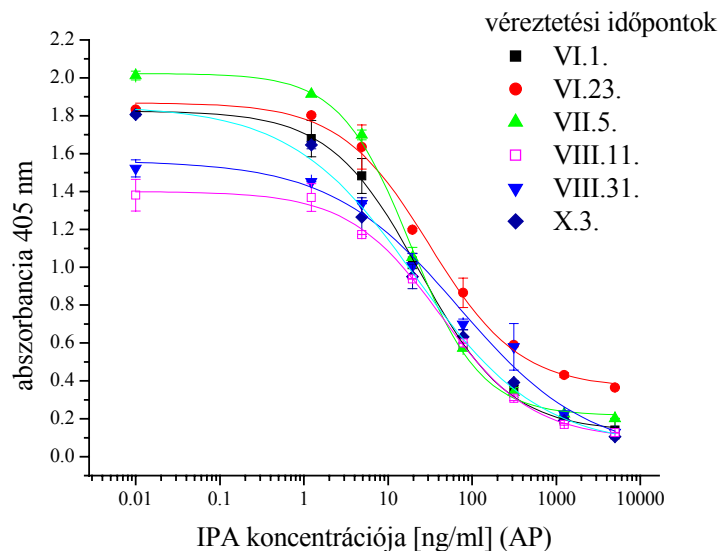
A fenti reakciók után 1 µg/ml-es érzékenyítésű lemezen összehasonlítottam a hat különböző időpontban (VI.1., VI.21., VII.5., VII.11., VIII.31., X.3.) vett anti-ZR szérumszámítását. Amint azt a különböző időpontokban vett ZR antiszérumok titrálásánál is láthattuk, az egyes frakciók között nem mutatkozott szignifikáns eltérés, bár bizonyos mértékű érzékenység megfigyelhető a szérumszámítások többszöri immunizálások során (lásd a *29. ábra* alsó három görbéjét). Ugyanaz a tendencia volt megfigyelhető mindkét jelzőenzim esetén, tehát a jelzőenzim cseréje nem befolyásolja a görbék lefutásának jellegét. Azonban a két enzimet összehasonlítva igen nagy eltérés tapasztalható az optimálisnak tekintett rendszer érzékenységére jellemző IC₅₀ érték tekintetében, míg torma peroxidáz alkalmazása mellett az IC₅₀ érték 158 ng/ml, alkalikus foszfatáz alkalmazásakor 19 ng/ml.



29. ábra Különböző időpontokban nyert anti-ZR szérumok gátlási görbéje

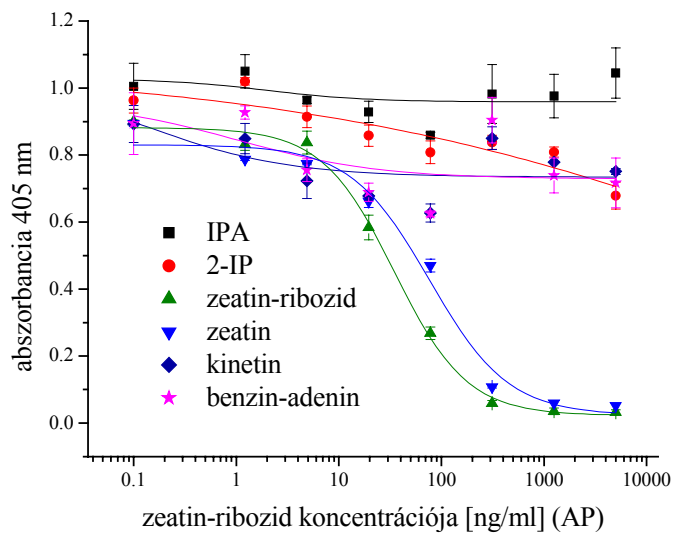
4.2.2.3.4. Az anti-IPA szérumok gátlása izopentenil-adenoziddal, időfüggése

A zeatin-riboziddal folytatott kísérletekhez hasonlóan az IPA esetén is végeztem összehasonlítást hat eltérő időben vett szérum gátlása között (30. ábra). A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a legkorábbi és a legkésőbbi időpontban vett szérumok között csupán csekély az eltérés.

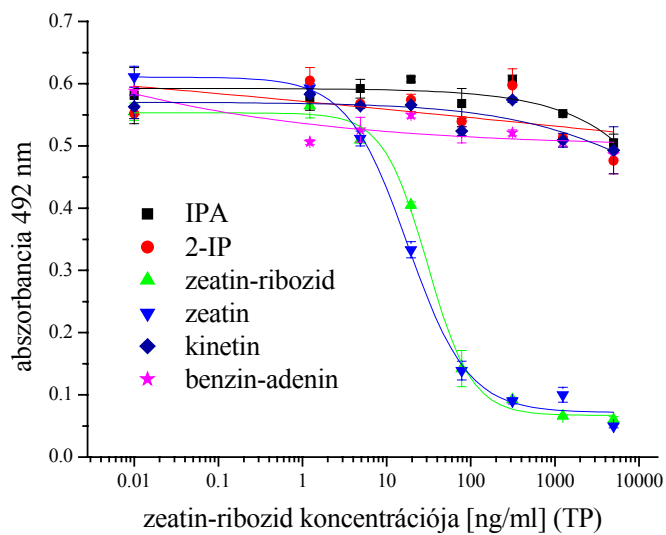


30. ábra Különböző időben nyert anti-IPA szérumok gátlási görbéje

A kísérleteket torna peroxidáz (a kísérlet eredményeként kapott görbék a 32 – 33. ábrán (alsó) láthatóak), majd alkalikus foszfatáz jelzőenzimet alkalmazva is elvégeztem, ezen görbéket összehasonlítva megállapítható, hogy (a várakozásnak megfelelően) a jelzőenzim cseréjét követően a keresztreaktivitási értékek (a felhasználás tekintetében) számottevő módon nem változtak. Azaz a zeatin-ribozidra érzékenyített (1 µg/ml) lemez közel azonos érzékenységet mutat a zeatinra és a zeatin-ribozidra, azonban más, citokinin hormonosztályba tartozó hormonnal gyakorlatilag nem keresztreakál, s így a zeatin valamint a zeatin-ribozid együttes tartalma jól meghatározható egyéb citokininnek jelentésében is. Az IPA haptén-homológ rendszerben végzett kísérletek is hasonlóan jó eredményeket mutatnak, számottevő érzékenység csak a 2-iP-vel és az IPA-val végzett gátlás során jelentkezik. Mindemellett bizonyos fokú keresztreakálás mutatkozott benzil-adeninre és kinetinre (ez a jelenség a zeatin-ribozidra érzékenyített rendszerben nem volt tapasztalható), azonban a zeatinra és annak származékára a zeatin-ribozidra a rendszer nem érzékeny (33. ábra). Ezen tapasztalatok arra utalnak, hogy az OH-csoport jelenléte vagy hiánya (hidrofilítási tulajdonságok) sokkal nagyobb változást eredményez, mint az adenzincsoport illetve a ribóz egység. A mért keresztreaktivitási értékek alapján elmondható, hogy a kifejlesztett ELISA tesztek nagyfokú szelektivitást mutatnak az IPA-ra, illetve zeatin-ribozidra, s ezen hormonok növényi mintákból való szelektív meghatározását teszik lehetővé. Az összesített keresztreakciós adatokat az XVI. táblázat tartalmazza. Az eredmények jó egyezést mutatnak a RIA [80, 81] és ELISA [92-94] rendszerekben mért korábbi irodalmi adatokkal. Érdekes, hogy Barthe és Stewart [93] vizsgálatai szerint a benzil-adenin 23 %-os keresztreaktivitásával szemben annak ribozil- származéka, a benzil-adenozin az izopentenil-adenozinnal azonos reaktivitású (100 %-os keresztreaktivitás). Az említett két hormon tehát elvileg jól kimutatható más citokininnek mellett.

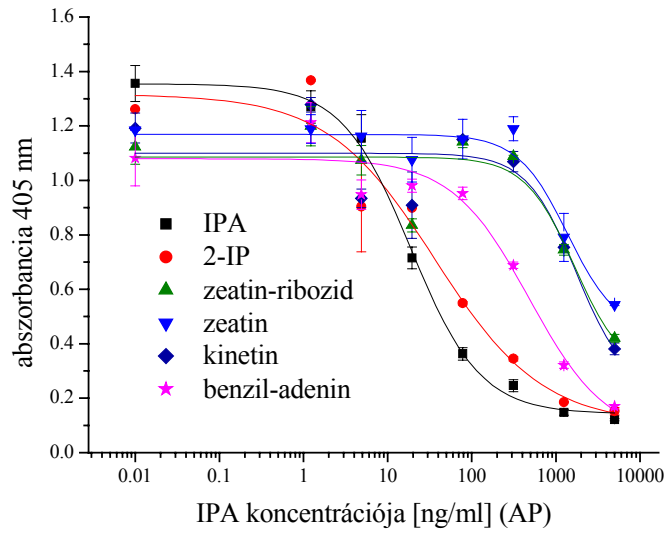


(a)

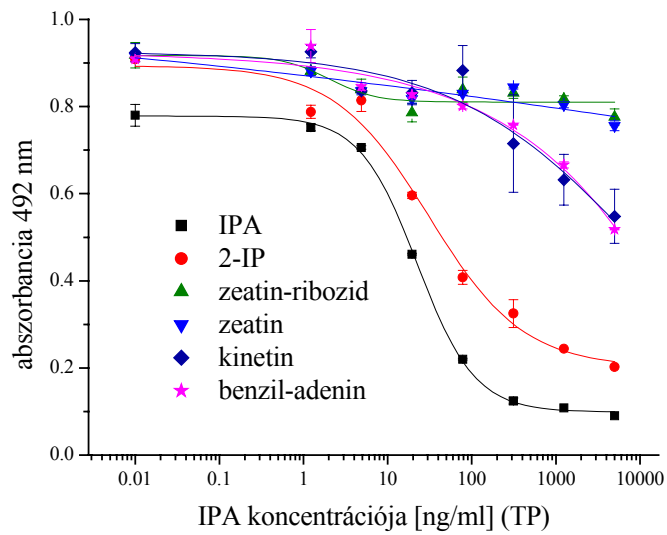


(b)

32. ábra Keresztreaktivitási kísérlet sor zeatin-ribozidra érzékenyített lemezen
jelzőenzim: (a): alkalikus foszfatáz, (b): torna peroxidáz



(a)



(b)

33. ábra Keresztreaktivitási kísérlet sor zeatin-ribozidra érzékenyített lemezen
jelzőenzim: (a): alkalikus foszfatáz, (b): torna peroxidáz

XVI. táblázat Keresztreaktivitási kísérletek összefoglaló táblázata

vegyület	keresztreaktivitás CR [%]			
	zeatin-ribozid antiszérum ^a		IPA antiszérum ^b	
	TP	AP	TP	AP
zeatin-ribozid	100	100	--	2,2
zeatin	69,2	42,6	--	1,6
IPA	--	--	100	100
2-iP	--	--	57,5	74,3
benzil-adenin	--	--	6,8	11,2
kinetin	--	--	3,5	2,2

^a érzékenyítő antigén koncentrációja: 1 µg/ml, szérumhígítás: 1:12000

^b érzékenyítő antigén koncentrációja: 5 µg/ml, szérumhígítás: 1:4500

TP: torna peroxidáz

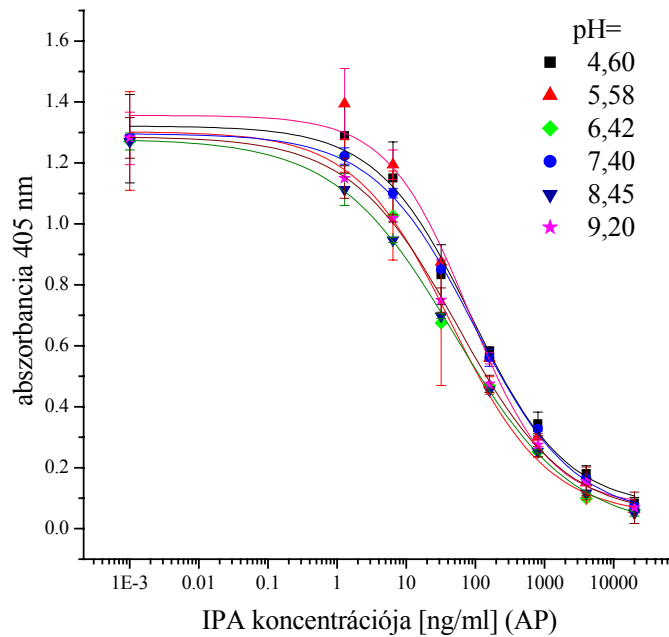
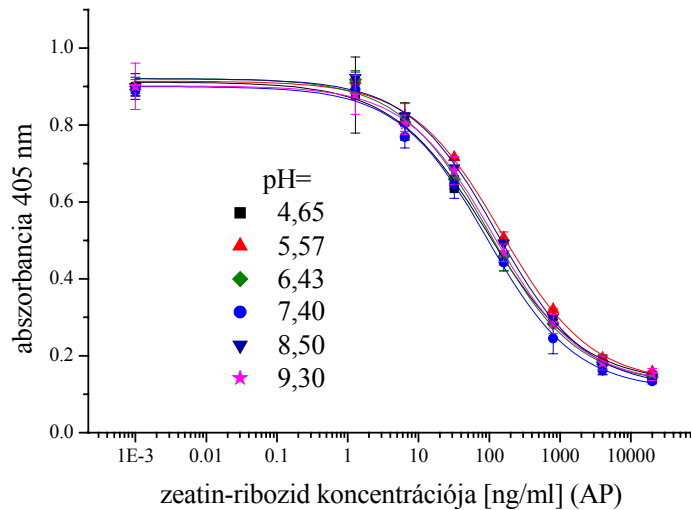
AP: alkalikus foszfatáz

4.2.2.5. A pH hatása a rendszer érzékenységére

A pH változásának az ELISA rendszer érzékenységére kifejtett hatását 4,60 - 9,20 pH-tartományban vizsgáltam (34. ábra). Ezen kísérletek során a standard görbéket (tényleges növényi mintát nem, ismert mennyiségű növényi hormont tartalmazó standard oldatsor felhasználása mellett készült görbék) – mind ZR, mind IPA esetében – hapténhomológ rendszerben 6 különböző pH érték mellett vettem fel, az így kapott görbékből számított IC₅₀ értékeket a XVII. táblázat tartalmazza. A legalacsonyabb IC₅₀ érték mindkét ELISA rendszerben 7,4-es pH érték mellett volt mérhető, bár egyik rendszer esetében sem jelentkezett szignifikáns, a rendszerek segítségével történő növényi hormonkoncentráció-meghatározást lehetetlenné tevő különbség. Mindazonáltal elmondható, hogy az IPA-ELISA rendszer bizonyos mértékű érzékenységsökkenést mutat alacsony, 4,6-os pH-érték mellett.

XVII. táblázat A pH hatása az immunanalitikai rendszerek érzékenységére (alkalmazott jelzőenzim: AP)

pH	IC ₅₀ [ng/ml]	
	ZR	IPA
4,60	32,5 ± 3,83	43,6 ± 11,5
5,58	50,9 ± 9,04	39,8 ± 10,3
6,42	33,7 ± 5,56	23,7 ± 6,60
7,40	32,1 ± 5,43	18,9 ± 4,99
8,45	44,8 ± 7,82	23,2 ± 0,95
9,20	39,2 ± 2,42	22,6 ± 1,70



34. ábra Különböző pH értékek mellett felvett standard görbék

4.2.2.6. Szerves oldószerek hatása a kifejlesztett rendszer érzékenységére

Ezen kísérletsorozatban számos, extrakciós eljárások során széles körben alkalmazott, vízdoldható szerves oldószer (metanol, etanol, acetonitril, aceton, dimetil-szulfoxid (DMSO), dimetil-formamid (DMF)) ELISA teszt érzékenységére kifejtett hatását vizsgáltam. A fentebb felsorolt oldószereket PBST 0,05 pufferhez 0,5 (V/V) % és 32 (V/V) % között 6 különböző koncentrációban adagoltam. Az immunesztek oldószerekre való érzékenységének leírására egyrészt az oldószerek standard görbékben mutatkozó módosító hatását, másrészt a

„nem gátolt” jel oldószertoleranciáját használtam fel, mikoris a gátlási görbék felvételekor a citokininek hígítási koncentrációsora helyett az egyes oldószerek hígítási sorát adagoltam a rendszerbe (*XVIII. táblázat*). Az elvégzett kísérletek alapján mindkét rendszerről megállapítható, hogy a puffer 8 (V/V) % metanol- valamint etanolkoncentrációig terjedően gyakorlatilag változatlan standard görbék mérhetők, a „nem gátolt” rendszer az oldószereket 32 (V/V) %-ig tolerálja. Ezzel szemben már 2 (V/V) % DMF-, illetve DMSO-koncentráció is negatívan befolyásolta az érzékenységet.

XVIII. táblázat Szerves oldószerek hatása a kifejlesztett ELISA rendszerek érzékenységére,
jelző enzim alkalikus foszfatáz

Oldószer tartalom [V/V %]	metanol		etanol		aceton	
	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]
0,5	29,6 ± 4,63	18,4 ± 2,78	31,2 ± 4,90	18,2 ± 2,11	41,4 ± 6,17	24,1 ± 3,62
1	31,1 ± 7,20	17,9 ± 3,82	32,1 ± 7,91	17,4 ± 5,38	50,1 ± 5,66	34,9 ± 2,10
2	32,0 ± 7,04	19,3 ± 2,68	34,4 ± 7,40	19,1 ± 265	83,9 ± 6,89	--
4	32,8 ± 6,42	20,7 ± 3,14	32,9 ± 6,09	22,0 ± 3,38	--	--
8	38,2 ± 9,06	19,2 ± 5,06	35,0 ± 9,88	18,6 ± 4,27	--	--
16	57,6 ± 11,2	36,0 ± 7,97	53,7 ± 2,63	37,7 ± 4,56	--	--
32	68,5 ± 10,4	--	--	59,0 ± 7,64	--	--
Oldószer tartalom [V/V %]	acetonitril		dimetil formamid		dimetil szulfoxid	
	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]	ZR IC ₅₀ [ng/ml]	IPA IC ₅₀ [ng/ml]
0,5	60,2 ± 6,15	36,3 ± 3,72	68,7 ± 9,17	40,2 ± 4,27	50,6 ± 4,05	31,6 ± 2,31
1	--	52,6 ± 6,68	--	57,1 ± 6,11	72,1 ± 5,46	48,1 ± 8,83
2	--	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--	--
16	--	--	--	--	--	--
32	--	--	--	--	--	--

-- : nem mérhető, számítható IC₅₀ értékre utalnak

4.2.2.7. Az inkubációs és preinkubációs idő hatása a rendszer érzékenységére

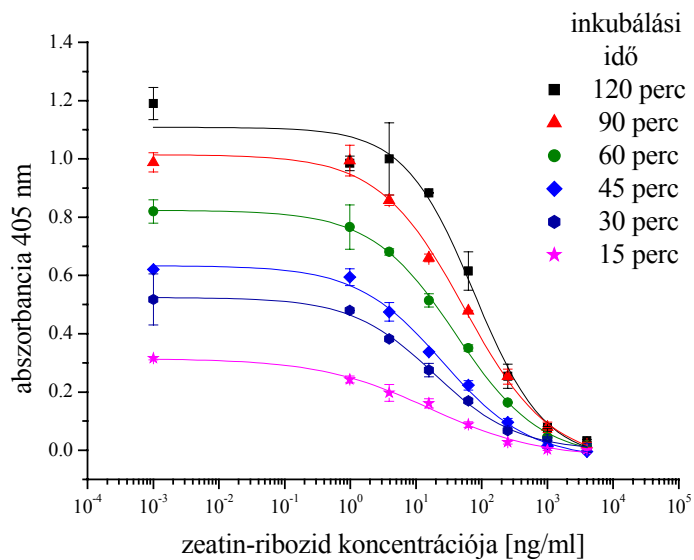
A következő vizsgált mérési paraméter az inkubálási idő volt. Az analitikai eljárásokkal szemben támasztott általános követelmények az olcsóság és a gyorsaság, ennek megfelelően a munka- és időigényesség csökkentése. Az optimális/minimális inkubációs időt meghatározó alapvető tényező az inkubálási hőmérséklet, illetve az antigénspecifikus antitest koncentrációja. Az inkubációs idő a rendszerbe adagolt reagensek közötti egyensúly megteremtésére, illetve megközelítésére szolgál. Egyrészt kompetitív reakció zajlik le a szilárd fázis felületére adagolt, kötött érzékenyítő antigén és a minta szabad „antigén”-tartalma között az elérhető, rendelkezésre álló szabad antitest kötőhelyekért, másrészt a következő lépésben, az enzimjelölt második antitest speciális kötődése során nem kompetitív reakció megy végbe. Mivel e kötődési reakció a szilárd fázishoz kötött antigén és antitest (a második lépésben pedig a szilárd fázishoz kötött antigén-antitest komplex és antitest) között zajlik le, a szükséges reakcióidőt befolyásolja a fellépő diffúziós hatás. Ezen hatás az inkubáció alatti rázózálcán történő „keverés/koncentrációkiegyenlítés” segítségével lényegesen csökkenthető.

A kiindulási inkubációs idők, melyek kezdetben igen hosszú 4 órás időtartamok voltak, csökkentésének érdekében történő inkubálási hőmérsékletemelés nem célravezető, mivel az emelkedett hőmérséklet erősen negatív irányban befolyásolja a mért abszorbanciaértékek szórását, a mérés precizitását. Lehetséges megoldása ezen idő rövidítésének az antitest koncentrációjának növelése. A legfőbb háttérjel e lehetőségnek, hogy a magasabb antitestkoncentráció nagyobb háttérjelet, valamint az érzékenység csökkenését eredményezi.

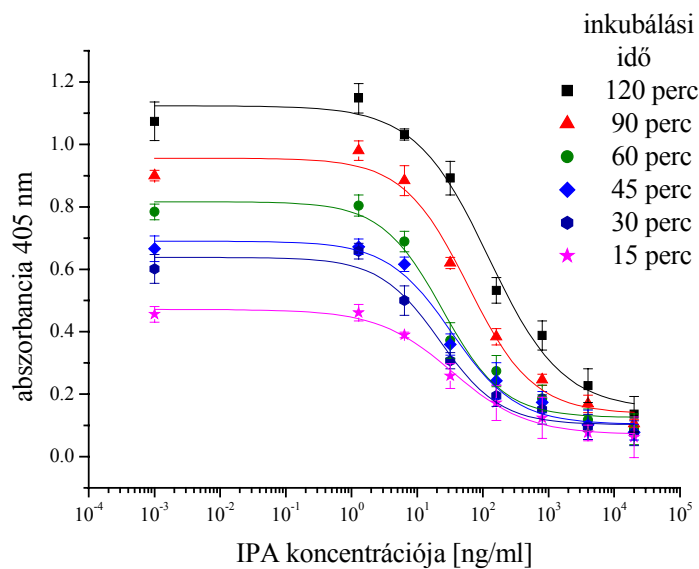
Az adott feltételek melletti optimális hosszúságú inkubáció megállapítása céljából a következő kísérleteket 6 különböző hosszúságú inkubálási idő mellett végeztem el (inkubációs idő hossza 15 perctől 120 percig terjedt). A különböző inkubációs idők mellett felvett standard görbék a 35. ábrán láthatók (a standard görbéket mindkét célvegyület esetén haptén-homológ rendszerben mértem), az egyes görbékhez tartozó IC_{50} értékeket a XIX. táblázat tartalmazza.

Az eredmények azt mutatják, hogy mindkét rendszerben 45 perces inkubációs idő szükséges az optimális jel eléréséhez, 60 percnél hosszabb inkubálás azonban már magasabb IC_{50} értékeket eredményez, azaz az érzékenység csökken. E jelenség valószínű magyarázata, hogy haptén-homológ rendszerben, az antitestek kötődése kezdetben kinetikusan kontrolált, így az oldatban levő szabad citokinin gyorsabban tud kötődni a szérum antitestekhez, mint a

szilárd fázishoz kötött érzékenyítő antigén, később azonban termodinamikailag kontrolálttá válik a reakció.



(a)



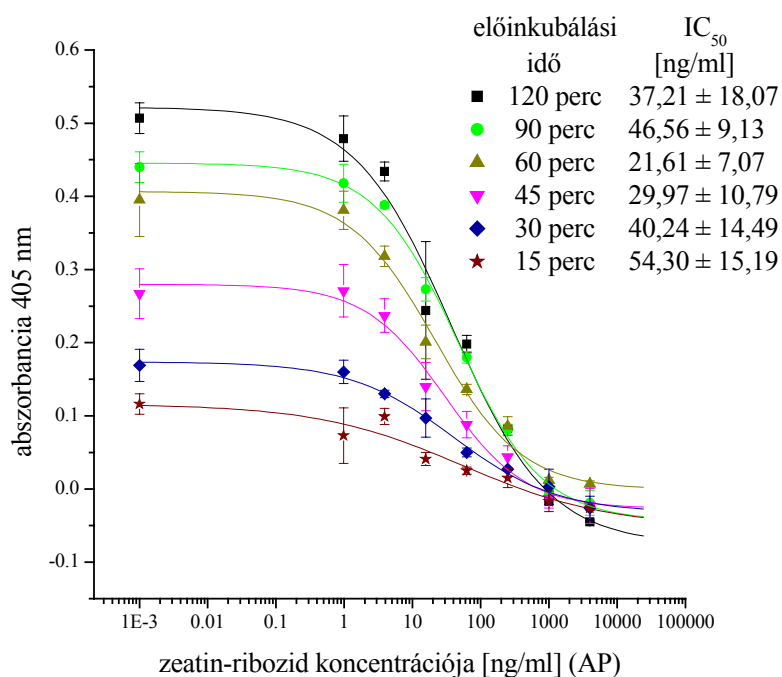
(b)

35. ábra Inkubációs idő hatása a zeatin-ribozid (a), illetve az IPA (b) rendszerre

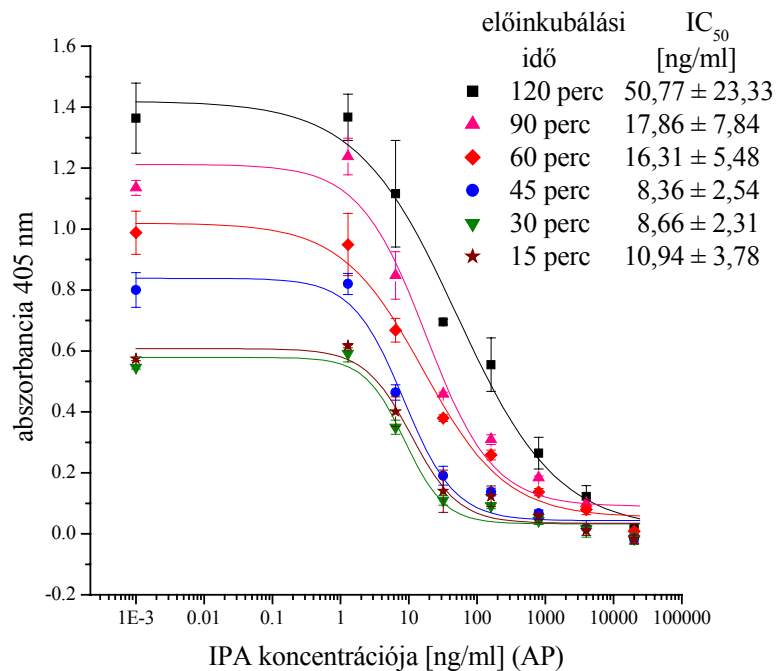
XIX. táblázat Az inkubációs idő hatása az érzékenységre

inkubációs idő [perc]	IC ₅₀ [ng/ml]	
	ZR	IPA
15	15,8 ± 5,5	22,5 ± 6,74
30	18,9 ± 2,8	17,1 ± 4,65
45	25,5 ± 5,4	25,1 ± 5,39
60	32,3 ± 4,6	19,2 ± 3,91
90	54,3 ± 12,7	48,2 ± 10,9
120	77,4 ± 26,1	111,6 ± 20,4

A várakozásoknak megfelelően a rendszer érzékenységére befolyással bír a szérumban szabad antigénnel (mintával) történő előzetes inkubációja, az előinkubáció (preinkubáció) (36. ábra), hiszen ilyenkor a mintában lévő célvegyületnek hosszabb ideje van egyensúly kialakítására a szelektív antitestekkel, mint a szilárd fázison rögzített antigénnek. Az ELISA rendszerekben a 15-45 perces, az érzékenyített lemezen történő immunreakciót megelőző preinkubáció az IC₅₀ érték 50 %-os csökkenését eredményezi. A preinkubáció tehát érzékenyebb detektálást, mérést tesz lehetővé, azonban hosszabb mérést valamint a preinkubációs idő szigorú ellenőrzését igényli.



(a)



(b)

36. ábra Preinkubációs idő hatása a zeatin-ribozid (a), illetve az IPA (b) rendszerre

4.2.2.8. A kifejlesztett ELISA rendszer növényi mintákon való alkalmazása

Vizsgált növényminták:

1. **SR₁**: *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana dohányfajta (CTKm kontrollja)
2. **CTKm**: a CaMVp35S *ipt* gént tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (pMP9 ORK) törzssel transzformált dohányvonal. (A CaMVp35S promóter konstitutív kifejeződést biztosító átírási kezdőszekvencia, mely szabályozza az *ipt* gén expresszióját. Az *ipt* gén egy izopentenil-transzferáz aktivitású enzimet kódol, ami a citokininiek bioszintézisének kulcslépését katalizálja; a CTKm dohányvonal tehát citokinin-túlermelő transzgenikus dohányvonal.)
3. **PS** (paraquat szenzitív): *Nicotiana tabacum* cv. Samsun dohányfajta (a PT kontrollja)
4. **PT**: paraquattartalmú táptalajon szelektált és regenerált dohányvonal. (A paraquat a növényben szuperoxid szabadgyökképződést okozó gyomirtó szer hatóanyag. A paraquattoleráns dohánynövények ellenállóbbak a szabadgyökök által előidézett ún. oxidatív stressznek. Oxidatív stressz (a szabadgyökök gyors, robbanásszerű felszaporodása) figyelhető meg különböző kórokozók fertőzését követően, a növényt ért sebzések során, valamint ha a növényt valamilyen abiotikus stresszhatás éri (szárazság, túllöntözés, hideg stressz, fagyás, nehézfém mérgezés). A PT dohányok

általános stressz ellenállóságot mutatnak; ezen túl juvenilisebbek is, mint a kontroll (PS) dohányvonal – ezt igazoltuk a magasabb citokinintartalommal.)

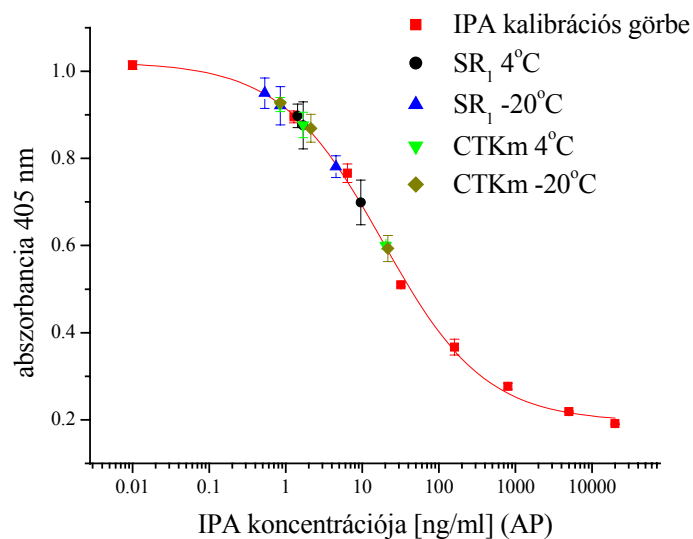
5. **LXXIV:** *Lycopersicon esculentum* cv. Linia XXIV paradicsomfajta (a 22R₀ és a 35R₀ kontrollja)
6. **22R₀, 35R₀:** A tumefaciens T 37 (pTiT37) törzse által indukált tumorokból regenerált, *ipt* gént hordozó paradicsom növények.

Az optimalizált ELISA rendszer – alkalikus foszfatáz jelzőenzim alkalmazása mellett – lehetővé tette különböző kontroll, illetve genetikailag módosított (emelkedett citokininszintű) növényi minták hormonszintjeinek meghatározását (37. ábra). A kifejlesztett ELISA rendszereket használtam a fentebb jellemzett növények, citokinintartalmának meghatározására. Az ELISA tesztek megelőzően 8-10 hetes, üvegházban nevelt növények leveleinek metanolos extrakciójára került sor. A kb. 20-25 g tömegű leveleket 250 ml 80 %-os metanolban extraháltam, majd centrifugáltuk és rotációs vákuumbepárlóban 37 °C-on 40 ml-re pároltam. Mivel a valós citokininszint ismeretlen volt, a mintákat a mérést megelőzően három koncentrációra hígítottam (1:5, 1:10 és 1:20). A hígítási faktor különösen fontos volt a ZR-szint meghatározásakor, mivel ezen hormon koncentrációja gyakran meghaladja az ELISA rendszer felső kimutatási határát. Hígítatlan mintákban gyakran a mátrixhatás következtében a detektálás során túlbecsülhetjük a minta hormonszintjét. Az 1:10-es illetve az 1:20-as mintahígítás felülmérést eredményezett, mivel a mért értékek a szigmoid görbe felső platóján helyezkedtek el, ennek megfelelően nem hígított mintákban a számított koncentráció magasabb, mint a tényleges érték. Az elvégzett kísérletek tanulsága szerint, növényi minták citokinin tartalmának meghatározása 1:5 mintahígítást tesz szükségessé. Az ELISA teszteken történő méréseket mintánként (18 minta) hármas ismétlésben végeztem.

Különböző dohány- és paradicsomnövényekben mért citokinin koncentrációkat a XX. táblázat tartalmazza. A megfelelő kontrollértékekkel összehasonlítva növekedett ZR- szintet mértem CTKm, PT, 22R₀ és 35R₀ vonalakban, amely bizonyította a fentebb leírt, növényi genom citokinin szintézist irányító régiójában történt módosítást. A mért koncentrációk azt mutatják, hogy a citokininszintek szignifikánsan különbözőek (nagyobbak) a CTKm növényekben, mint az SR1, kontroll növényekben. A IPA hormon mennyisége minden mintában sokkal alacsonyabb volt, mint a ZR szintje (három esetben a detekció alsó határát sem érte el). A genetikailag módosított dohánynövények közül csak a CTKm mutánsban volt emelkedett IPA koncentráció mérhető. Az extrakció és az ELISA teszt közötti időben a mintákat egy éjszakán keresztül különböző hőmérsékleten tároltam. A mért eredmények azt

mutatják, hogy a tárolási hőmérséklet (4 °C, illetve -20 °C) nem befolyásolja lényegesen a mért értékeket. Az irodalomban leírt folyadékkromatográfia-tömegspektroszkópiás (LC-MS), natív, valamint transzgenikus dohánynövényekkel [95] történő validálási kísérletek azt mutatják (a cikkben szerzői szintén az *Agrobacterium tumefaciens* baktérium tumor-indukáló plazmidján található izopentenil-transzferáz (*ipt*) génnel transzformáltak. A különbség az volt, hogy a gén expresszióját (kifejeződését) szabályozó promoter más volt. Tetraciklin antibiotikummal indukálható promóterhez kapcsolták az *ipt* gént (*tet-ipt*). Mi a karfiol mozaik vírus 35S fehérjéjének promoterét használtuk (*CaMV35S-ipt*), ez szabályozta a beépített gén kifejeződését. A cikkben publikált adatok: *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin dohányfajta kontrollja esetén ZR: 5,98 ng/g friss tömeg, IPA: 0,61 ng/g friss tömeg; *ipt* génnel transzformált növény: ZR: 35,2 ng/g friss tömeg, IPA: 0,82 ng/g friss tömeg.), hogy a kifejlesztett ELISA módszerrel mért értékek a várt tartományba esnek.

A fenti adatok alátámasztják azt a feltételezést, hogy a növények emelkedett citokininszintje, illetve annak hatására a növények fiziológiai állapotában bekövetkező változás, fontos szerepet játszik a növény káros hatásokkal szembeni ellenállóképességében. A korábbiakban említett PT és CTKm dohány, valamint a 22R0 és 25R0 paradicsom vonalak számos abiotikus stresszel és azoknak megfelelő nekrotikus patogénekkal, így hő- és hidegkezeléssel, vegyületekkel (HgCl₂, paraquat herbicid, illetve *Fusarium* toxinok), valamint *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans* és dohány nekrotízis vírus (TNV) fertőzéssel szemben növekedett ellenálló képességet mutatnak [96, 97]. A citokininszint emelkedésével párhuzamosan jelentkező ellenállóképesség-javulás legvalószínűbb oka a magasabb antioxidáns kapacitás, valamint a stabilabb membránlipid felépítés [98]. Az optimalizált immunanalitikai módszerrel elért eredmények világosan mutatják, hogy a növekedett stressz rezisztencia szoros összefüggésben áll a növényi citokininszinttel.



37. ábra IPA kalibrációs görbe növényi minták IPA koncentrációjának feltüntetésével

XX. táblázat Növényi minták mért ZR és IPA koncentrációi

	Vonal	ZR [ng/g friss tömeg]	IPA [ng/g friss tömeg]
dohány	SR1 ^a (kontrol)	24,87 ± 2,14	n.d. ^c
	SR1 ^b (kontrol)	25,87 ± 2,12	n.d. ^c
	CTKm ^a	73,23 ± 1,45	7,95 ± 1,76
	CTKm ^b	57,68 ± 2,68	10,65 ± 1,82
	PS (kontrol) PT	5,92 ± 1,31 17,32 ± 3,39	1,08 ± 0,24 n.d. ^c
paradicsom	L XXIV (kontrol)	29,46 ± 6,39	2,48 ± 0,53
	22R ₀	52,16 ± 11,46	3,79 ± 0,81
	35R ₀	69,66 ± 15,20	2,79 ± 0,58

^a 4 C^o-on tárolt minta

^b -20 C^o-on tárolt minta

^c n.d.: nem detektálható a hormon mennyisége

5. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Trifluralin ELISA

A kísérletek eredményeképpen egy érzékeny, ppb tartományba eső trifluralinkoncentráció meghatározására alkalmas ELISA rendszert sikerült kifejleszteni (LOD: 0,85 ng/ml). Az optimalizált rendszer előnyeként, pozitív tulajdonságaként említhető meg, hogy a dinitro-anilin herbicidesaládon belül is nagyfokú specificitást mutat, a pH változtatást, változást széles, 4,6 – 9,4 pH tartományban tolerálni képes, a szerves oldószerek tekintetében a minta metanoltartalmát 5, etanol-, acetonitril-, aceton-, DMSO-, DMF-tartalmát 2 (V/V) %-ig jól tűri. A rendszert SPME GC-MS technikával folytatott mérések során 1 – 10 ng/ml koncentrációtartományban validáltam, valamint alkalmazhatóságát vizsgáltam különböző felszíni víz- és zöldséglé mintákon, amely vizsgálatok pozitív eredményeket mutatnak, a módszer alkalmas a vizsgált zöldséglevelek, különösképpen a sárgarépalé trifluralintartalmának MRL szintű meghatározására.

2. Növényi hormon ELISA

A citokinin ELISA fejlesztés során a két célhormon (zeatin-ribozid, IPA) kimutatására alkalmas, érzékeny, – s az inkubációs idő rövidítését célzó kísérletek eredményeképpen – gyors rendszereket sikerült kifejleszteni; zeatin-ribozid rendszerben IC_{50} érték optimális rendszerparaméterek mellett 19 ng/ml, IPA rendszerben 18 ng/ml. A trifluralin ELISA-hoz hasonlóan jó eredmények mondhatók el a rendszerek pH-toleranciájáról (pH 4,6 – 9,2 tartományban), vízoldható szerves oldószer-toleranciájáról – a metanolt és az etanolt mindkét rendszer 8 (V/V) %-ig, az acetont, acetonitrilt, DMF-et és DMSO-t 2 (V/V) %-ig képes az IC_{50} érték növekedése nélkül elviselni –, valamint hormoncsaládon belüli specifikusságáról – a két citokinin egymás mellett, keresztreakció nélkül, kvantitatív módon meghatározható. A kiindulási torma peroxidáz jelzőenzim alkalikus foszfatázra való cserélésével sikeresnek bizonyult – a korábban fellépő – mátrix hatás kiküszöbölése, s így a valódi növényi minták citokininkoncentrációjának meghatározása.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Matolcsy, Gy. (1985) *Az a bizonyos 35 százalék*, Magvető Könyvkiadó, Budapest.
2. Matolcsy, Gy.; Nádasy, M., Andriská, V. (1988) *Pesticide Chemistry*, (Antus, S.né., Székács, A., Szerk.), Elsevier, Amsterdam.
3. Loch, J., Nosticzius, Á. (1983) *Alkalmazott kémia - Agrokémia és növényvédelmi kémia*, Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest.
4. Székács, A. (1999) A növényvédő szerek kockázatai, *Magyar Tudomány* **1**, 38-39.
5. Hammock, B.D., Gee, S.J. (1995) Impact of emerging technologies on immunochemical methods for environmental analysis. In: "ACS Symposium Series", Vol **586**, "Immunoanalysis of Agrochemicals", (Nelson, J.O., Karu, A.E., Wong, R.B., Szerk.), 1-19., *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, Washington, D.C.
6. Kaufman, B.M., Clower, Jr. M. (1991) Immunoassay of pesticides, *Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 239-247.
7. Van Emon, J.M. (1990) Immunoassay methods, EPA evaluation. In: *Immunoassays for trace chemical analysis*, 58-64.
8. Hammock, B.D., Gee, S.J., Harrison, R.O., Jung, F., Goodrow, M.H., Li, Q.X., Lucas, A., Székács, A., Sundaram, K.M.S. (1991) Immunochemical technology in environmental analysis: Addressing critical problems. In: "ACS Symposium Series", Vol **442**, "Immunochemical Methods for Environmental Analysis", (Van Emon, J., Mumma, R.O., Szerk.), 112-139., *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, Washington, D.C.
9. Jung, F.; Székács, A., Hammock, B.D. (1990) An immunochemical approach to the detection of aminotriazoles using selective amino group protection by chromophores. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 129-136.
10. Székács, A., Hammock, B.D. (1992) Indirekt enzimátikus immunoassay rendszer amino-triazolok kimutatására. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **98**, 430-438.
11. Székács, A., Hammock, B.D. (1992) Application of enzyme-linked immunoassay (ELISA) systems for environmental monitoring. In: *EUROENVIRONMENT '92*, May 10-14, Budapest, P-9/9.
12. Le, M.H., Székács, A., Tőkés, G., Ferguson, B.S. (1995) Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical (ELISA) method. *J. Environ. Sci. Health B*, **30**, 459-464.
13. Székács, A., Hammock, B.D. (1995) Development of an enzyme-linked linked immunosorbent assay for the detection of the triazole fungicide, myclobutanil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2083-2091.
14. Székács, A., Jung, F., Hammock, B.D. (1995) Chemical modification of haptens: Selective amino group protection by chromophores for an immunoassay for aminotriazoles. In: "New Frontiers in Agrochemical Immunoassay", (Kurtz, D.A., Skerritt, J.H., Stanker, L., Szerk.), 67-77.; *Amer. Org. of Anal. Chem.*, Washington, D.C.
15. Székács, A. (1996) Immunoassay rendszerek növényvédőszermaradékok, mikotoxinok és növényi szteroidok kimutatására. *Biokémia*, **XX**, 66-72.
16. Székács, A., Cairoli, S., Le, H. M., Pagani (1996) Comparative studies on enzyme-immunoassays (ELISA) for the triazol fungicides tetraconazole and myclobutanil. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, **31**, 293-301.
17. Tijssen, P. (1985) *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Elsevier, Amsterdam.
18. Hammock, B.D., Gee, S.J., Harrison, R.O., Jung, F., Goodrow, M., Li, Q-X., Lucas, A., Székács, A., Sundaram, A. (1990) Immunochemical technology in environmental analysis: Addressing critical problems. In: *Immunochemical methods for environmental analysis* (Van Emon, J., Mumma, R., Eds.), *Amer. Chem. Soc., Symp. Ser.* **442**, Chapter 11, 112-139.
19. *Növényvédő szerek és termelésnövelő anyagok I-II.* (1999), Földművelési Minisztérium, Budapest.
20. Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R. (1996) Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutat Res.*, **371**, 15-21.
21. Ebert, E., Leist, K.H., Hack, R., Ehling, G. (1992) Toxicology and hazard potential of trifluralin. *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 1031-1044.
22. Francis, P.C., Emmerson, J.L., Adams, E.R., Owen, N.V. (1991) Oncogenicity study of trifluralin in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol.*, **29**, 549-555.
23. Schultz, I.R., Hayton, W.L. (1994) Body size and the toxicokinetics of trifluralin in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **129**, 138-145.
24. Byrd, R.A., Markham, J.K., Emmerson, J.L. (1995) Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits. I. Trifluralin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **26**, 181-190.
25. Rawlings, N.C., Cook, S.J., Waldbillig, D. (1998) Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and

- reproductive endocrine system in ewes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **54**, 21-36.
26. Blakley, B.R., Yole, M.J., Brousseau, P., Boermans, H., Fournier, M. (1998) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, trifluralin and triallate herbicides on immune function. *Vet. Hum. Toxicol.*, **40**, 5-10.
 27. Chan, M.M., Grogl, M., Callahan, H., Fong, D. (1995) Efficacy of the herbicide trifluralin against four P-glycoprotein-expressing strains of Leishmania. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1609-1611.
 28. Camper, N. D., Stralka, K., Skipper, H.D. (1980) Aerobic and anaerobic degradation of profluralin and trifluralin. *J. Environ. Sci. Health B*, **15**, 457-473.
 29. Schoen, S.R., Winterlin, W.L. (1987) The effects of various soil factors and amendments on the degradation of pesticide mixtures. *J. Environ. Sci. Health*, **22**, 347-377.
 30. Grover, R., Wolt, J.D., Cessna, A.J., Schiefer, H.B. (1997) Environmental fate of trifluralin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **153**, 1-64.
 31. Kim, J.H., Feagley, S.E. (1998) Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor, and metribuzin in a commerce soil. *J. Environ. Sci. Health B*, **33**, 529-546.
 32. Malterre, F., Pierre, J.G., Schiavon, M. (1998) Trifluralin transfer from top soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **39**, 98-103.
 33. Smith, A.E., Hayden, B.J. (1982) Field persistence studies with triallate and trifluralin both singly and in combination with chloramben. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 240-242.
 34. Jensen, K.I., Kimball, E.R. (1980) Persistence of dinitramine and trifluralin in Nova Scotia, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**, 238-243.
 35. Golab, T., Occolowitz, J.L. (1979) Soil degradation of trifluralin: mass spectrometry of products and potential products. *Biomed. Mass. Spectrom.*, **6**, 1-9.
 36. Zayed, S.M., Mostafa, I.Y., Farghaly, M.M., Attaby, H.S., Adam, Y.M., Mahdy, F.M. (1983) Microbial degradation of trifluralin by *Aspergillus carneus*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma viride*. *J. Environ. Sci. Health*, **18**, 253-267.
 37. Nilles, G.P., Zabik, M.J. (1974) Photochemistry of bioactive compounds. Multiphase photodegradation of basalin. *J. Agric. Food. Chem.*, **22**, 684-688.
 38. Tomlin, C.D.S. (Ed.) (1997) in: *The Pesticide Manual*, 11th Ed., British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1248-1250.
 39. Aizawa, H., (1989) *Metabolic Maps of Pesticides*, Tokyo, Japan.
 40. Helling, C.S. (1976) Dinitroaniline herbicides in soils. *J. Environ. Qual.*, **5**, 1-15.
 41. Pedersen, H.J., Kudsk, P., Helweg, A. (1995) Adsorption and ED50 Values of Five Soil-Applied Herbicides, *Pestic.Sci.*, **44**, 131-136.
 42. Leitis, E., Crosby, D.G. (1974) Photodecomposition of trifluralin. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 842-848.
 43. Roberts, T., Hutson, D.H., Lee, P.W., Nicholls, P.H., Plimmer, J.R. (1998) In: *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, Vol 1, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 280-290.
 44. Aizawa, H. (1989) In: Coulston, F., Korte F. (Eds), *Metabolic Maps of Pesticides*, Vol. 2, Academic Press, San Diego, 42.
 45. Traore, S., Aaron, J.J. (1989) Analysis of trifluralin and other dinitroaniline herbicide residues by zero-and derivative ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, **114**, 609-613.
 46. West, S.D., Weston, J.H., Day, E.W., (1988) Gas chromatographic determination of residue levels of the herbicides trifluralin, benefin, ethalfluralin, and isopropalin in soil with confirmation by mass selective detection. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, **71**, 1082-1085.
 47. de Wit, J.S., Parker, C.E., Tomer, K.B., Jorgenson, J.W. (1988) Separation and identification of trifluralin metabolites by open-tubular liquid chromatography/negative chemical ionization mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **17**, 47-53.
 48. Wotherspoon, D., Hindle, R. (1988) Determination of N-nitrosodipropylamine in trifluralin emulsifiable concentrates using minicolumn cleanup and gas chromatography with thermal energy analyzer. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, **71**, 333-336.
 49. Gudéhn, A., Kolmodin-Hedman, B. (1987) Sampling and determination of fenitrothion, dimethoate, mevinphos, linuron, metoxuron and trifluralin from air. *J. Chromatogr.*, **387**, 420-427.
 50. D'Amato, A., Semeraro, I., Bicchi, C. (1993) Simultaneous determination of linuron and trifluralin residues in carrots and their pulp by liquid chromatography and gas chromatography. *JAOAC Int*, **76**, 657-662.
 51. Yu, T.C., Johnson, E.R., Montgomery, M.L. (1979) Simultaneous extraction and analysis of trifluralin and nitrofen residues in crucifers. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1413-1414.
 52. Downer, G.B., Hall, M., Mallen, D.N.B. (1976) Determination of benefin and trifluralin residues by quantitative gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1223-1225.

53. Hall, M., Mallen, D.N. (1976) Separation of benefin and trifluralin by gas chromatography using a liquid crystal column. *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 451-452.
54. Smith, A.E. (1974) A multi-residue extraction procedure for the gas chromatographic determination of the herbicides dichlobenil, dinitramine, triallate and trifluralin in soils. *Chromatogr.*, **97**, 103-106.
55. Koons, J.R., Day, E.W. (1972) Separation of benefin and trifluralin by gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 176-180.
56. Riggle, B. (1991) Development of a preliminary enzyme-linked immunosorbent assay for the herbicide trifluralin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**, 404-409.
57. Láng, F. (szerk.) (1977) *Biológiai stúdium*, Tankönyvkiadó, Budapest.
58. Szalai, I. (1974) *Növényélettan*, Tankönyvkiadó, Budapest.
59. Pethő, M. (1993) *Mezőgazdasági növények élettana*, Akadémiai Kiadó, Budapest.
60. Koshimizu, K., Iwamura, H. (1986) Cytokinins, in: *Chemistry of plant hormones* (Takahashi, N., Szerk.) 153-199., CRC Press, Boca Raton, FL.
61. Szirtes, V. (1984) Hormonális szabályozás, levéltrágyázás I. 38-71., Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
62. Letham, D.S., Palni, L.M.S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. rev. Plant Physiol.*, **34**, 164-197.
63. Taya, Y., Tanaka, Y., Nishimura, S. (1978) 5-AMP is a direct precursor of cytokinins in *Dictyostellium discoideum*, *Nature*, **271**, 545-547.
64. Chen, C-M., Kristopeit, S.M. (1981) Metabolism of cytokinin. Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5 nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant. Physiol.*, **67**, 494-498.
65. Palmer, M.V., Horgan, R., Wareing, P.F. (1981) Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Botany*, **32**, 1231-1241.
66. Pungor, E. (szerk.) (1993) *Analitikai kémia*, Egyetemi jegyzet, Tankönyvkiadó, Budapest.
67. Gergely, J. (1979) *Immunbiológia*, Medicina Könyvkiadó, Budapest.
68. László, F., Janáky T. (1986) *Radioimmunoassay*, Medicina Könyvkiadó, Budapest.
69. Nairn, R. C. (1976) *Fluorescent Protein Tracing*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 1-648.
70. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E. (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.*, **31**, 507-520.
71. Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
72. Engvall, E., Perlmann, P. (1972). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) . III. Quantitation specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, **109**, 129-135.
73. Szabó, A., Morvay, J. (1984) *Analitikai módszerek a klinikai kémiában* (A kémia újabb eredményei), Akadémiai Könyvkiadó, Budapest.
74. Miles, L.E.M., Hales, C.N. (1968). Labelled antibodies and immunological assay system. *Nature*, **219**, 186.
75. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. (1981) Spectrometric identification of organic compounds. 4th ed., Wiley & Sons.
76. J.Balla (1997) *A gázkromatográfia analitikai alkalmazásai*, Abigél Bt, Budapest.
77. Kooistra, D.A., Richards, J.H. (1978) Magnetic resonance studies of the binding site interactions between 19F-labeled nitrophenyl haptens and specific mouse myeloma immunoglobulin. *Biochemistry*, **17**, 345-351.
78. Benson, R.E., Cairn, T.L. (1948) Chemical reactions of caprolactam. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2115-2118.
79. Marvel, C.S., Wendell, W.M. Jr. (1957) Some derivatives of ϵ -caprolactam. *J. Org. Chem.*, **22**, 1065-1067.
80. Weiler, E. W. (1980) Radioimmunoassays for *trans*-Zeanin and Related Cytokinins, *Planta*, **149**, 149-155.
81. Weiler, E.W., Spanier, K. (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors, *Planta*, **153**, 326-327.
82. David, S., de Sennyey, G., Sotta, G. (1982) Simple, inexpensive routes to *E*-and *Z*-zeatin ribosides and derivatives useful for immunassay, *Tetrahedron Lett*, **23**, 1817-1820.
83. Erlanger, B.F., Seiser, S.M. (1964) Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 68-74.
84. Inouye, H., Fuchs, S., Sela, M., Littauer, U. Z. (1971) Anti-inosine antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 594-603.
85. Orchard, J., Collin, H.A., Hardwick, K., Issac, S. (1994) Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of withes' brooms on cocoa. *Plant Pathol.*, **43**, 65-72.
86. Rodbard, D. (1974) Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assay. *Clin. Chem.* **22**, 1255-1260.
87. Várnagy, L. (1995) *Növényvédelem és környezetvédelem*, Veszprémi Egyetem, 96-102.
88. FAO/WHO Codex Committee on Pesticide Residues, in: Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Vol. **2**, Pesticide Residues in Foods, FAO/WHO, Hague, the Netherlands,

2000.

89. European Economic Community, (1990) *Off. J. Eur. Comm.*, L350, 90/642/EEC.
90. US Code of Federal Regulations Tolerances and exemptions from tolerances for pesticide chemicals in food, 40CFR180.207, U.S. Government Printing Office, Washington DC, (1999) 361-362.
91. Holland, B., Welch, A.A., Unwin, I.D., Buss, D.H., Paul, A.A., Southgate, D.A.T. (1992) In: *The Composition of Foods*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
92. Vonk, C. R., Davelaar, E., Ribot, S. A. (1986) The role of cytokinins in relation to flower-bud blasting in *Iris* cv. Ideal: Cytokinin determination by improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Growth Regulation*, **4**, 65-74.
93. Barthe, G. A., Stewart, I. (1985) Enzyme immunoassay (EIA) of endogenous cytokinins in citrus. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 293-297.
94. Sotta, B., Pilate, G., Pelese, F., Sabbagh, I., Bonnet, M., Maldiney, R. (1987) An avidin-biotin solid phase ELISA for femtomole isopentanyladenine measurements in HPLC purified plant extracts. *Plant Physiol.*, **85**, 571-573.
95. Redig, P., Schmülling, T., Van Onckelen, H. (1996) Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by LC-tandem mass spectrometry. *Plant Physiol.* **112**, 141-148.
96. Barna, B., Ádám, A. L., Király, Z. (1993) Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften*, **80**, 420-422.
97. Barna, B., Ádám, A.L., Király, Z. (1997) Increased levels of cytokinin induce tolerance to necrotic diseases and various oxidative stress-causing agents in plants. *Phyton*, **37**, 25-30.
98. Barna, B., Gullner, G., Király, Z. (1995) Role of antioxidant systems and juvenility in tolerance of plants to diseases and abiotic stresses. *Acta Phytopath. Entom. Hung.*, **30**, 39-45.