



SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI
ÉS LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI INTÉZET



TEHÉNTÉJ KIMUTATÁSA MOLEKULÁRIS ESZKÖZÖKKEL BORBÓL

TDK dolgozat

Készítette: Csősz György
IV. évfolyam, állatorvos hallgató

Témavezető: dr. Maróti- Agóts Ákos
adjunktus

2014

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzés	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1.	A tejelválasztás strukturális alapjai	4
2.2.	Szomatikus sejtek.....	5
2.3.	Mitokondriumok.....	7
2.4.	A bor tejjel történő derítése	9
2.5.	Tartálykocsik tisztítása	12
3.	Anyag	14
3.1.	Kazein.....	14
3.2.	Tej.....	14
3.3.	Bor	14
4.	Módszer	15
4.1.	PCR	15
4.2.	Real-time PCR.....	17
4.3.	SYBR® Green.....	18
5.	Saját vizsgálat.....	20
5.1.	Primer tervezés	20
5.2.	DNS tisztítás, fluorometria	21
5.3.	Hagyományos PCR, gélelektroforézis.	23
5.4.	Real time PCR, SYBR® Green technikával	24
6.	6. Eredmények.....	28
6.1.	A DNS tisztítás eredményei	28
6.2.	Hagyományos PCR eredmények.....	28
6.3.	SYBR® Green PCR eredmények.....	29
7.	Következtetés	35
8.	Összefoglalás.....	37
9.	Summary	38
10.	Köszönetnyilvánítás	39
11.	Irodalomjegyzék.....	40

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban az élelmiszerlánc-biztonság kiemelt fontosságú az állatorvosi feladatok közül. A borhamisítás ellenőrzése, bár szintén ide tartozik, mégsem kimondott állatorvos-szakértői munka, habár egyes esetekben az állati eredetű termékek, a tej-higiénia ide sorol bizonyos feladatokat.

A borhamisításnak sok formája létezik, az egyik legkonkrétabb eset, mikor szintetikusán állítják elő a „bort”, és nem megfelelő jelöléssel hozzák forgalomba. A mi esetünkben gyenge minőségű, olcsó, mediterrán eredetű szőlőbort kevernek magyar borokkal, és a nagy mennyiségű kevert bort magyar borként hozzák forgalomba.

Ez a keverés, házasítás tulajdonképpen lehetne törvényes is a megfelelő „Az Európai Unió különböző országaiból származó borok keveréke”- megjelöléssel. A gyakorlatban az eredet-megjelölés sokszor hiányos, a borcímkézési előírásoknak nem tesznek maradéktalanul eleget, esetleg magyar borként tüntetik fel a keverék borokat, amivel a magyar szőlő- és bortermelők érdekei jelentősen sérülnek. Ezen tételek nyomon követése fontos nemzetgazdasági érdek.

Ilyen esetekben az ügy azért vonatkozhat állatorvosokra, mert a tartálykocsik, amelyek visszarúként a mediterrán eredetű bort hozzák, Magyarországról tejet szállítanak.

A tartálytisztítás alaposságának függvénye, hogy a tartálykocsiban, amelyben a tejet exportálták, a leeresztést követően maradhat-e tej. Ennek a lehetséges „szennyeződésnek” kimutatása céljából kezdtük meg kísérleteinket.

Egy másik, borba kerülő tej által felvetett probléma, a lehetséges allergének előírt feltűntetésének hiányossága az élelmiszereken. A borhamisításhoz és az allergének kimutatásához kapcsolódóan felmerül a kérdés, hogy a bor tejjel történő derítését követően egyszerű molekuláris eszközökkel kimutatható-e a tejmaradványanyag a borból.

Vizsgálatunk célja tehát az esetleges tehéntej maradványanyag vagy szennyeződés kimutatása borból egyszerű molekuláris eszközökkel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A tejelválasztás strukturális alapjai

2.1.1. A mirigyszekréció típusai

Az exokrin mirigyekben a szekréció három módját figyelhetjük meg. Ezek sorban: merokrin, apokrin és holokrin. A mirigyeket e három sejtszintű szekréciós stratégia szerint osztályozzák.

A merokrin szekréció során a kiválasztandó molekulák membránnal borított granulumok formájában vándorolnak a sejtmembránhoz, majd exocitózissal választódnak ki a mirigyvégkamrába. A szekréció ezen típusa nem jelent a sejt számára citoplazma, illetve membránvesztést, ugyanis a szekréciós granulum membránja az exocitózis során fúzionál a citoplazma-membránnal.

Az apokrin szekréció során a szekretálandó (zsírtermészetű) molekulák először apróbb, majd összeolvadva, egyre nagyobb cseppekként vándorolnak a citoplazma-membránhoz, mikor eléri a sejt apikális régióját, a sejtmembránt a mirigyvégkamrába boltosítják, majd a szekrétum a sejtmembrán részlettel, valamint egy vékony citoplazma réteggel együtt leszakad a mirigyhámsejtről (RHÖLICH, 2006). A tulajdonképpeni szekrétumon kívül más citoplazma komponensek is távozhatnak a sejtől (VÍGH & KONDICS, 1984). A folyamat membrán- és citoplazma veszteséggel jár.

A holokrin szekréció során a sejtek teljes egésze váladékká alakul át. Jellemző holokrin szekréció figyelhető meg a faggyúmirigyekben, ahol a sejtek a folyamatos osztódás során a lumen felé tolódnak, majd a belső részen helyezkedő sejtek elzsírosodnak, apoptózissal elhalnak, végül kenőcsös váladékká alakulnak át.

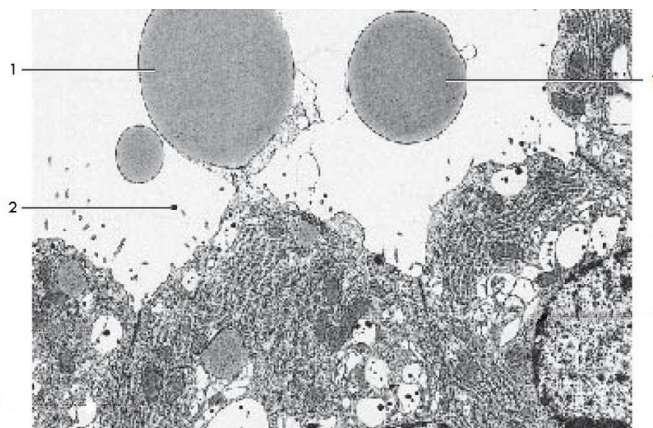
2.1.2. Az apokrin verejtékmirigy

Az emlőmirigy sejttani és fejlődéstani szempontból módosult apokrin verejtékmirigynek tekinthető. Az apokrin verejtékmirigyek, melyeket illatmirigyeknek is nevezünk, regionálisan fordulnak elő a testfelületen, megtalálhatók perianálisan, periumbilicalisan, hímviváriumokban a praeputium, a scrotum tájékán, nőiváriumokban a pératájékon. Az illatmirigyeknek az egyedek felismerésében, azonosításában, valamint feromontermelésen keresztül, szexuális folyamatokban van szerepük. Jellemző rájuk a növekedéskorban történő megnagyobbodás, és szekréciófokozódás.

A legújabb ultrastrukturális kutatások elképzelhetőnek tartják, hogy az apokrin verejtékmirigyben az exokrin mirigyszekréció mindhárom ismert típusa előfordul.

2.1.3. A tejmirigy

A laktáló emlőmirigyben szekréciót folytató mirigyhámsejtek által kiválasztott tej komponensei eltérő módon kerülnek a lumenbe (1. ábra). Az endoplazmatikus retikulumban képződő proteinkomponensek membránnal borított granulumokként, vagy más kifejezéssel élve vakuolumokban vándorolnak az apikális membránhoz, ahol exocitózissal ürülnek. A proteinkomponensek tehát merokrin módon ürülnek.



1. ábra: Szekréció a tejmirigyben (forrás: Kuehnelt W., *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*, 2003.) Magyarázat: 1: membránnal borított zsírcseppek, 2: fehérje-granulumok

A mirigyszekréta lipidkomponensei cseppek formájában, a sejtek apikális membránját kidomborítva, sejtmembrán-, és citoplazma részlettel együtt kerülnek a mirigyvégkamrába. A lipidkomponensek tehát apokrin szekrécióval kerülnek a tejbe (RHÖLICH, 2006). Az apokrin szekréció jól megfigyelhető szövettani metszetekben, a lipidcseppek kioldódnak a fixáláskor, mely jellegzetessé teszi a mirigyhámsejtek szerkezetét. A sejtek eltérő magassága is a lipidcseppek leválására utal (GUZSAL, 1981).

2.2. Szomatikus sejtek

A tejben az apró mikroorganizmusokon (vírusok, baktériumok, gombák) és az apokrin szekréció eredményeként, membránnal burkolt zsírgolyócskákon kívül más típusú részecskék is találhatóak. A felsoroltakon kívül, a tejben jelen lévő sejtes elemeket testi, vagy szomatikus sejteknek nevezzük (SIMON et al., 2000). A szomatikus sejtszám általánosan elismert indikátora a tőgy egészségének, a tej minőségének és technológiai használhatóságának (PICCINI et al., 2006). A laktáció alatt a tőgy különböző szöveteiből folyamatosan történik sejtkivándorlás, sejtleválás. Szomatikus sejteket az egyébként egészséges tőgyű, betegség tüneteit nem mutató tehénből fejt tejben is találhatunk jellemző mennyiségben, illetve összetételben. A tehén megbetegedése, de különösen a tőgyet érintő betegségek esetén a szomatikus sejtek száma megnő, közöttük bizonyos sejttípusok jellemzőek lehetnek valamely betegségre (SIMON et al., 2000). A megemelkedett szomatikus sejtszámú tehenek kevesebb tejet termel-

nek, mint egészséges társaik, ami a tejiparban jelentős gazdasági veszteséget jelent. A szubklinikai mastitishez kapcsolódó anyagi veszteségek mintegy 70%-a tőgyszövet gyulladásos betegségeihez kapcsolódó tejtermelés-visszaesésből adódik (HASHEMZADEH-CIGARI et al, 2014).

2.2.1. A szomatikus sejtek eredete

A tehéntejben megjelenő szomatikus sejtek részben a vérből, részben a tőgy valamely szövetéből származhatnak. Az egészséges tőgyből fejt tejből kimutatható szomatikus sejtek mintegy kétharmadát tőgyszövet eredetű sejtek alkotják.

2.2.2. Tőgyszöveti sejtek

Egészséges állatból, illetve egészséges tőgyből fejt tej esetén a tőgyszöveti sejtek lehetnek laphám, hengerhám és mirigyhámsejtek. A laphámsejtek a tőgy bőréről és a bimbócsatorna hámból származhatnak. A hengerhámsejtek a tejmedence falának hámból származnak, a tejben tojásdad vagy háromszög alakúak, 10-30 µm nagyságúak. A mirigyhámsejtek alakja kerek, méretük elérheti az 50 µm-t.

Gyulladásos folyamatokra, tőgygümőkór, brucellózis esetén jellemzőek az óriássejtek (típusosan Langhans-féle óriássejtek), melyek akár 100 µm nagyságúak is lehetnek, sejtmagjaik citoplazmájukat koszorúszerűen veszik körül. A tőgy gyulladásos állapotaiban degenerált sejtek, sejttörmelék megjelenésével is számolhatunk.

2.2.3. Vérsejtek

A vérből mind fehér, és vörösvérsejtek is juthatnak a tejbe. A fehérvérsejtek közül előfordulhatnak neutrofil-, eozinofil-, és bazofil granulociták, limfociták és monociták. Gyulladásos folyamatoknál főleg a neutrofil granulociták száma nő meg a tejben (SIMON et al., 2000). A mikrobiális fertőzést követően a neutrophil granulociták száma órák alatt drámaian megnövekedhet, ezzel a szomatikus sejtszámot kevesebb, mint 10^5 sejt/ml-ről 10^6 sejt/ml-t is meghaladó értékre emelhetik (TEN NAPEJ et al. 2009). Monocitaszám-növekedést általában frissfejős vagy öregfejős tehenek esetében, illetve tejpangás idején figyelhetjük meg a tejben.

2.2.4. A tej szomatikus sejtszámának alakulása a laktáció szakaszai szerint

A laktáció kezdetén, a főcstejtermelés szakaszában a szomatikus sejtek száma meghaladhatja a milliós nagyságrendet is milliliterenként. A kolosztrumtermelés abbamaradásával párhuzamosan meredek sejtszámcsökkenés következik be, ekkor a tej szomatikus sejtszáma 300.000-400.000/ml (ideális esetben akár 20.000/ml körüli) értékre áll be. A laktáció vége felé, az öregfejős szakaszban a tejbe áramló sejtek abszolút száma nem változik ugyan, a mil-

liliterenként mérhető szomatikus sejtszám mégis megemelkedik a csökkenő leadott tejmenyiség következtében (SIMON et al., 2000).

2.3. Mitokondriumok

2.3.1. A mitokondriumok morfológiája

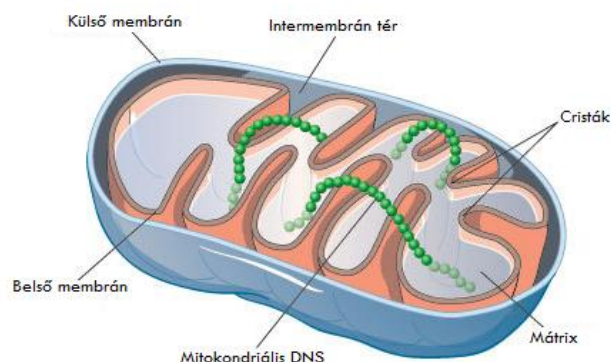
A mitokondrium kifejezés Benda-tól származik, a görög mitos szó fonalat, a chondron szó szemcsét jelent. Így a mitochondrium szó a mikroszkopban látható kétdimenziós struktúrára utaló, „fonalas szemcse”-ként fordítható magyarra.

A mitokondriumok alakja változatos. Szemcse, pálcika, illetve fonalas képlet formájában tűnnek elő. Elektronmikroszkóppal könnyen felismerhetőek jellegzetes szerkezetük miatt. A citoplazmában általában egyenletesen oszlanak meg, azonban azokban a sejtekben, ahol a lezajló folyamatok energiaigénye jellemzően nagy, gyakran csoportosulva figyelhetők meg az energiaigényes folyamatok színterének közelében. Nagyságuk viszonylag széles intervallumban változik, átlagos átmérőjük 0,5-1 μm , hosszuk 3-10 μm .

A mitokondriumok száma az azokat tartalmazó sejt állapotától, típusától függ. A kis limfocitákban például kevés van, sok található a metabolikusan aktív sejtekben, mint a májsejtekben (a májsejtekben akár 1000-1500 is lehet), harántcsíkolt izomrostokban, az aktív mirigysejtekben (TÚRY, 1990). A laktáló emlőmirigy mirigyhámsejtjei is nagy mennyiségű mitokondriumot tartalmaznak, melyek az energiát szolgáltatják a megnövekedett anyagcsere szinten tartásához. (GUZSAL, 1981).

2.3.2. A mitokondriumok szerkezete

A mitokondriumok külső, belső membránból, a két membrán közti intermembrán térből, valamint a belső membrán által határolt mátrixból állnak (ld. 2. ábra). Mindkét membrán unit-membrán szerkezetű, a plazmamembránnál vékonyabb, 5-6 nm vastagságú. A külső membrán sima felületű. Különlegessége a rendkívül sok csatornaképző porin fehérje, amely a membránt szokatlanul áteresztővé teszi (SZEBERÉNYI, 2011).



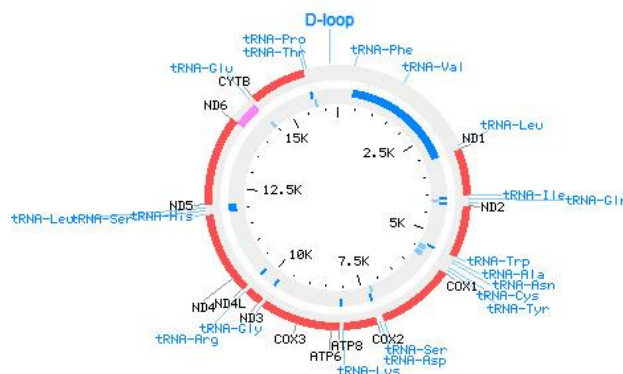
2. ábra: A mitokondrium szerkezete (forrás: www.glogster.com)

Az intermembrán tér összetétele a külső membrán permeabilitásából fakadóan nagyjából azonos a citoszoléval. Kivételt képeznek ez alól a nagyméretű fehérjék, melyek előfordulása az intermembrán térre jellemző (SZEBERÉNYI, 2011). A belső membránon a mátrix felé betüremkedések, redők figyelhetők meg. Ezek a betüremkedések szerkezete, száma az adott mitokondriumokat tartalmazó sejtekre jellemző (TÚRY, 1990). A belső membrán impermeabilitásával biztosít lehetőséget a biológiai oxidáció utolsó szakaszának, a terminális oxidációnak lezajlására, mely a szervezet energiatermelésének nagy részét adja. A belső membrán által határolt kocsonyás állományú mátrix több száz enzimet tartalmaz, melyek különböző anyagcsere utakat katalizálnak (pl zsírsavoxidáció, citrátciklus). A mátrixban található a mitokondrium saját genetikai apparátusa is, melynek részei a kör alakú mitokondriális DNS (mtDNS), a riboszómák, az mRNS-ek, a tRNS-ek, illetve az előbbieket működtető enzimrendszer (SZEBERÉNYI, 2011).

2.3.3. A mitokondriális genom

A mtDNS (3. ábra) a sejtmagban található DNS-től nem csak megjelenésében, hanem bázisösszetételében, és sűrűségében is jelentősen különbözik, valamint jóval kevesebb genetikai információt hordoz (egy emberi sejtmag $5,6 \times 10^9$ bázispárt, a mtDNS $1,66 \times 10^4$ bázispárt tartalmaz) (TÚRY, 1990). A mitokondriális genom kettős szálú, kör alakú molekula, melynek két láncát guanin- és citozintartalmuk alapján különböztetik meg. A DNS 93%-a kódoló szekvencia, az ismétlődő szakaszok ritkák benne, rendkívül rövid intronokat tartalmaz. A mitokondriális örökítőanyaghoz nem kapcsolódnak hisztonok, nincs excíziós reparációs rendszere sem, így sokféle mutáció kialakulására nyílik lehetőség (RASKÓ, 2004). A mitokondriális genetika összetettségét a mtDNS- eredetű betegségek extrém heterogenitása is bizonyítja (DEBROSSE & PARIK 2012). E betegségek jelentős részét az anyai mtDNS pontmutációi okozzák, melyek gyakorisága bizonyítottan összefügg az anyai korrall (REBOLLEDO-JARAMILLO et al 2014).

Az utódok mtDNS-e ugyanis az anyai csíresejt-vonalakból kerül az utódokba (SHOUBRIDGE & WAI 2007).



3. ábra: A mitokondriális genom felépítése(NCBI GENBANK)

A mtDNS a sejtszervecske fehérjéinek mindössze 5-10%- át termeli, mely fehérjék rendkívüli jelentőséggel bírnak a mitokondrium működésében. Ezek nagy része a légzési lánc elemeinek, kisebb része a belső membrán strukturális fehérjéinek felelnek meg. Érdekes megfigyelés, hogy a mitokondrium sosem szintetizál komplett enzimeket, csupán néhány alegységből álló részleteket. Azt az mRNS-t, mely a mitoriboszómáknak is nevezett mitokondriális riboszómákon történő fehérjeszintézisben a kodon szerepét tölti be, a mitokondriális DNS kódolja (TÚRY, 1990).

2.3.4. A mitokondriumok szerepe

Az endoszinbionta elmélet szerint, egymillió évvel ezelőtt a primitív anaerob eukarióta sejthez aerob prokarióta baktérium csatlakozott. Az eukarióta sejt a baktériumot nem fagocitálta, hanem szimbiózis alakult ki a két sejt között, amely lehetővé tette a biológiai oxidáció befejező részének tekinthető oxidatív foszforilációt (TÚRY, 1990). Az evolúció során a növényi fotoszintézis melléktermékeként keletkező oxigén kezdetben toxikusan hatott a sejtekre. Így az eukarióta sejtek többféle mechanizmust is kifejlesztettek a védekezésre (pl. peroxiszómák). A leghatásosabb azonban a mitokondriális oxidáció volt, mely nem csak az oxigén semlegesítését tette lehetővé, hanem azt a sejt előnyére fordítva az anaerob glikolízis során nyerhető energia többszörösét biztosító folyamat jöhetett létre (RHÖLICH, 2006). Az elmélet magyarázhatja az önálló, kör alakú, bakteriálisra emlékeztető mtDNS-t, a mitokondriális membránok eltérő szerkezetét (TÚRY, 1990).

2.4. A bor tejjel történő derítése

A borok zavarosságának megszüntetését, illetve tisztítását derítésnek nevezzük. Lényege abban rejlik, hogy a borhoz olyan anyagokat adunk, melyek flokkulációra (pelyhesedésre) és leülepedésre alkalmasak, miközben kémiaiilag kötik a bor zavarosságát okozó szuszpendált

vagy kolloid részecskéket. Derítés során a bor megtisztul, illetve stabilizálódik, valamint esztétikailag is értékesebbé válik (SOMLYAY, 2001). A folyamat során nem csak a látható mérettartományba tartozó részecskék eliminálódnak a borból, hanem a potenciális zavarosító molekulák, és ionok száma is jelentősen csökken.

2.4.1. A zavarosság kémiai háttere

Potenciális zavarosító részecskéknak nevezzük az olyan apró molekulákat, ionokat, kolloid oldatot alkotó anyagokat, melyek méretükből fakadóan még nem teszik zavarossá a bort, azonban később a bor érésével összefüggő fizikai-kémiai változások során nagyobb molekulákká alakulnak, így megzavarosíthatják akár az addig tisztának tűnő bort is. A kolloidok külön figyelmet érdemelnek, mert méretük legnagyobb a potenciális zavaró részecskék között, így ezekből nagyon gyorsan alakulhat ki szabad szemmel is látható zavarosodás.

A borban sokféle kolloid anyag előfordulásával számolhatunk. Ezek többsége hidrofíl, azonban előfordulnak hidrofób kolloidok (pl. egyes fémsók) is. A kolloidok között töltés szerint is különbséget tehetünk, hiszen negatív és pozitív töltésű részecskék is találhatóak közöttük. A bor érése során akár a részecskék töltése is változhat. A kolloid részecskék némelyét hidrátburok veszi körül, e burok is megszűnhet a bor alakulása során. A töltések megváltozása, illetve a hidrátburok szétesése az ellenkező töltésű molekulák kapcsolódásához vezet, a molekulák szemmel látható mérettartományba növekednek, a bor zavarosságát okozzák. A töltésváltozást és a hidrátburok szétesését a bor természetes fejlődésének különböző folyamatai okozzák, ilyen például az alkoholtartalom növekedése, a fenolos anyagok összetételének változása, a kémhatás változása, oxidáció.

Az úgy nevezett thermolabilis fehérjék a bor savas pH-ján pozitív elektromos töltéssel rendelkeznek, így negatív töltésű anyagokkal képesek zavarosságot alkotni, ebből kifolyólag a thermolabilis fehérjék kivonására negatív töltésű részecskéket tartalmazó derítőszer (pl. a bentonit anionja) használható eredményesen. A borok természetes érési folyamatai során a polifenolok idővel kölcsönhatásba lépnek a thermolabilis fehérjékkel. A pozitív töltésű hidrofíl fehérjerészecskékből negatív töltésű, hidrofób micella lesz. A borban lévő fémionok semlegesítik a micellákat, így azok kicsapódnak, a bor üledékessé, zavarossá válik. Minél több a borban a semlegesítésre képes fém kation, annál gyorsabb ez a folyamat, viszont a kationok hiányában nem megy végbe.

2.4.2. Derítőszerek

A legrégebben használt derítőszerek kémiaiilag a fehérjék csoportjába tartoznak. E fehérjék oldatát a borhoz keverve a borban előforduló kolloid, illetve makroszkópos méretű lebegő

anyagainak köszönhetően beindul a flokkuláció, amennyiben a derítőszer illetve a bor zavarosító, valamint potenciálisan zavarosító összetevői ellentétes elektromos töltéssel rendelkeznek. A fehérje típusú derítőszer a bor polifenoljaival hasonlóan reagálnak, mint a borban előforduló természetes fehérje típusú anyagok. A derítés eredményességét fokozandóan, szokás a bor polifenol-tartalmát mesterségesen növelni például csersav hozzáadásával a derítés során. Ez az első olvasásra illogikus technika azért lehet sikeres, ugyanis a flokkuláció intenzívebbé válik, több csapadék képződik, mely nagy belső felületén rengeteg makroszkópos, mikroszkópos és szubmikroszkópos részecskét köt meg. Szintén az adszorpciós felület növelésének okából hatásos a pozitív és a negatív elektromos töltésű részecskéket tartalmazó derítőoldatok párhuzamos használata.

A derítést a pincészetekben próbaderítés előzi meg. A próbaderítés célja a megfelelő derítőszer mennyiségi és minőségi meghatározása. Az ideális derítőszerrel keletkező csapadék sűrűsége a borénál jelenősen nagyobb, így nem lebeg a borban a csapadék, hanem a tartály aljára süllyed. A flokkuláció annál tökéletesebb, minél messzebb van a derítésre használt anyag izoelektromos pontja a bor pH értékétől, ugyanis annál nagyobb a derítőanyag molekulái között az ionizált részecskék aránya. A borászatban használt derítőszer összetételükben, kémiai szerkezetükben, hatásukban jelentősen különböznek egymástól. A derítőszeret technológiai elvek alapján a következő négy kategóriába oszthatjuk: ásványi derítőszer (legjelentősebb a bentonit), fehérjetartalmú derítőszer, kálium-vas(II)-cianid (sárgavérlúgsó) illetve egyéb derítőszer (EPERJESI et al., 1998).

2.4.3. Fehérjetartalmú derítőszer

Fehérjetartalmú derítőszer régóta használatosak a borászatban. Pozitív elektromos töltésükből adódóan a bor természetes negatív töltésű zavarosító részecskéivel, valamint a borhoz mesterségesen hozzáadott tanninnal (népiesen csersav) csapadékképzésre alkalmazhatóak. A fehérjetartalmú derítőszerhez tartozik a zselatin, a vizahólyag, a tojásfehérje, a főlözött tej és a kazein (SOMLYAY, 2001).

Zselatin: a borászatban derítéshez leggyakrabban használt fehérjetartalmú szer. A zselatin a kollagénekhez tartozik, vizes közegben erőteljesen duzzad, tulajdonképpen tisztított enyv. Kémiailag nem teljesen leírt keverékanyag. Alkalmas a bor természetes cserzőanyagainak kicsapására, a képzett pelyhes csapadék pedig a szuszpendált részecskék adszorbeálására. Tanninnal, vagy újabban kovasavszollal kombinálva is használják, főleg a természetesen alacsony cserzőanyag koncentrációjú fehérborokban.

Vizahólyag: bortechnológia-történetileg jelentős derítőszer a viza (*Huso huso*) úszóhólyagja, mely évtizedekkel ezelőtt elterjedt derítőszer volt a borászatban. A vizahólyagot közvetlenül palackozás előtt alkalmazták. Napjainkban a vizahólyag igen ritkán használt derítőszer.

Tojásfehérje: vörösbor-derítésre használják, ugyanis a legjobban kíméli a vörösbor festékegyesanyagait. Hatóanyagai az albumin és a globulin, melyek a zselatinhoz hasonló módon derítik a bort.

Fölözött tehéntej: manapság nagyon ritkán alkalmazott derítőszer. Fő hatóanyagai a kazein és az albumin. A kazein legfőképpen a bor savaival, az albumin a cserzőanyagokkal képez csapadékot. A fölözött tehéntej használata hibás borok javítására használható.

Kazein: tejből kivont fehérje, Derítőszerként ritkán alkalmazzák, azonban erős színtelenítő hatása van a borokra nézve. Világosítja a túl sötét árnyalatú fehérborokat, eltávolítja a polifenolokat, növeli a bor esztétikai értékét (EPERJESI et al., 1998).

2.5. Tartálykocsik tisztítása

2.5.1. „Cleaning in place”

A tej szállítására szolgáló tartálykocsikat gépi, zárt rendszű, kör-áramoltatásos rendszer segítségével tisztítják. A tartályokat, a tej leadását követően, a lehető leggyorsabban és legalaposabban ki kell mosni, valamint fertőtleníteni.

A gépkocsik tartályait a tej átvételi helyén rögtön tisztogatják a helyben az e célra létesített programozott automatikus cirkulációs egységgel (CIP= cleaning in place). Ez a rendszer speciálisan csak a tartálykocsik tisztítására szolgál, különbözik az egyéb mosóberendezésektől (MÁRKUS GY., 2014).

2.5.2. A CIP rendszer felépítése

A CIP rendszer részei a következők: öblítőtartály, bekeverő tartály, vegyszeradagoló, tisztítószertartály, nagy nyomású centrifügál szivattyú, hőcserélő, víztöltő cső, tartozik hozzá egy automata szelepekkel ellátott csővezeték, mely mosófejben végződik.

Az öblítő tartály hideg vizet tartalmaz, valamint úszós szeleppel van ellátva. A bekeverő tartály a mosóoldat (sav-, vagy lúgoldat) előkészítésére, valamint töménységének utánállítására ad lehetőséget. A tisztítószer tartályok, (lúg, savtartály) savas, illetve lúgos tisztítószereket tartalmaznak. A lúgtartályból ciklikus lúgos mosás történik, a savtartályból savas mosás alkalmazható a tartálykocsiban képződött tejkő eltávolításának érdekében. A cirkuláris tisztítás megvalósulása érdekében a szivattyúnak, a csővezetéknek, és a mosófejnek zárt rend-

szert kell képezni az aktuálisan tisztítandó tartállyal. A rendszer egy vezérlő szekrénnel programozható (MÁRKUS GY., 2014).

2.5.3. *A mosás folyamata*

Első lépés az előöblítés: A durva szennyeződések; tejmaradék eltávolítása hideg vagy meleg víz használatával. Második lépés a tisztítás váltakozva lúgtartalmú és savtartalmú mosóoldatokkal. Az alkalmazott lúgos természetű anyagok főként a vízben nem jól oldódó fehérjék és zsírok oldására, a savas természetűek pedig a tejkövet alkotó szerves és szervetlen anyagok feloldására szolgálnak. A lúgos és savas mosás között öblítik a tartálykocsit. Harmadik lépés az oldott szennyeződések kiöblítése. Negyedik lépés a fertőtlenítés forró vízzel, vagy vegyszeresen, a mikroorganizmusok elölése érdekében. Utolsó lépés az utóöblítés: A fertőtlenítőszeresek maradékainak eltávolítása. Fontos, hogy az utóöblítés ivóvíz minőségű vízzel történjen (MOLNÁR N., 2014.).

3. Anyag

3.1. Kazein

Kísérleteinkhez tehéntejből tisztított Kazeint (Sigma-Aldrich, Hannover, Germany) használtunk. Annak ellenére, hogy a kazein tej eredetű fehérje (a legjelentősebb a tejben) elvileg nem tartalmaz mtDNS-t. Kísérleteink során a kazeint egyfajta negatív kontrolként szerettük volna használni.

3.2. Tej

Kereskedelmi forgalomban kapható, ultramagas hőmérsékleten hőkezelt (UHT), 3,5%-os zsírtartalmú tejet (Mizo, Bonafarm Budapest) használtunk. Azért a teljes zsírtartalmú tejet választottuk, mert a legközelebb áll a természetes tejhez, nem vonták ki belőle zsírtartalmának még egy részét sem. A zsírszegény tejekkel kapcsolatban az a probléma merülhet fel, hogy zsírtartalmukkal mitokondrium-tartalmuk is csökkenhet, ugyanis azok a zsírcseppekkel együtt találhatóak a szekréciós membránban. A hőkezelés DNS károsító hatása nem jelentett számkra gondot, a mitokondriális örökítőanyag nagyfokú ellenálló-képessége (dupla szálú DNS) és az alkalmazott primerek rövid specifikus termékei miatt.

3.3. Bor

Vörösbor-, és fehérbor mintákat kaptunk a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Borászati és Alkoholos Italok Igazgatóságától (NÉBIH-BAI). A minták olyan, nem nevesített kereskedő áruját szállító tartálykocsikból származtak, melyek tej exportálása után, mediterrán eredetű borral feltöltve érkeztek Magyarországra.

Negatív kontroll borokként a Rajnai Rizling 2013 (Apátsági Pincészet, Pannonhalma), Flört 2013 (Takler, Szekszárd), Száraz cuvée 2013 (Feind Borház, Balatonfőkajár) használtuk.

4. Módszer

4.1. PCR

4.1.1. Felfedezése, alkalmazási területei

A polimeráz láncreakció, vagy angol neve (Polimerase Chain Reaction) alapján képzett mozaikszóval: a PCR felfedezése Kary Banks Mullis nevéhez kötődik. A PCR reakciót felfedezése óta a molekuláris biológia különböző területein sikerrel alkalmazták: módosított DNS előállítás (irányított mutáció), klónozás, duplaszálú cDNS előállítás (reverz transzkripció PCR), DNS szekvenáláshoz minta előkészítése (asszimmetrikus PCR), genetikai betegségek kimutatása, fertőző ágensek (baktériumok, vírusok) kimutatása a betegtől vett mintából, vírusvariánsok megkülönböztetése, sejtpreparátumok in situ vizsgálata, rokoni viszonyok felderítése, evolúciós vizsgálatok, igazságügyi genetikai vizsgálatok.

4.1.2. Alapelv

A DNS dependes polimeráz reakció többszöri megismétlésével két megfelelő oligonukleotid szekvencia jelenlétében a célzott DNS szekvencia megsokszorozható. Ehhez szükség van kettős szálú cél DNS-re (DNS targetre), két oligonukleotid primerre, melyek a DNS különböző szálaival hibridizálódnak, valamint DNS-polimeráz enzimre.

4.1.3. A PCR reakció folyamata

Denaturálás: a reakció első lépéseként a kettősszálú DNS-t denaturálni kell 95°C-on. A denaturálás, a fehérjék denaturálásával ellentétben itt azt jelenti, hogy az emelkedett hőmérsékleten a két szál közötti kötések felbomlanak, DNS kettős spirálja szétválak.

Hibridizáció vagy anelláció: második lépésként a target DNS-sel komplementer oligonukleotid szekvenciák a különvált target szálakkal történő hibridizálása következik. A kapcsolatok létrejöttéhez az elegyet le kell hűteni az oligonukleotid primerek olvadáspontjánál alacsonyabb hőmérsékletre, valamint azokat nagy feleslegben kell alkalmazni.

Szintézis, vagy extenzió: a folyamathoz szükségesek dNTP-k (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok), melyek a szintetizálódó DNS építőkövei, valamint DNS polimeráz enzim, mely katalizálja a reakciót. A szintézishez szükséges a reakcióelegy felmelegítése 70-80°C-közé, ugyan is a PCR-hez használt DNS polimeráznak ezen a hőmérsékleten legnagyobb a nukleotid átviteli száma. A PCR folytatása az imént leírt három lépés ciklikus ismétléséből áll. Az egységes hosszúságú termékek száma exponenciálisan növekszik (DOMBRÁDI, 2012).

4.1.4. Kétlépéses PCR

A kétlépéses PCR alkalmazásával a hibridizáció és a szintézis fázisa egy lépésben valósul meg. Ehhez arra van szükség, hogy a hőstabil enzim nukleotid átviteli száma a hibridizációhoz szükséges, alacsonyabb hőmérsékleten is elérje a gyakorlati alkalmazhatóság küszöbértékét. Igaz, hogy polimerizáció folyamata valamivel lassabb lesz, viszont alacsonyabb hőmérsékleten kevesebb hibát ejt az enzim, a két lépés összevonásából nyert idővel pedig kompenzálódik az idővesztés (WUNDERLICH, 2014).

4.1.5. Taq polimeráz

A folyamatban szereplő enzim minősége kulcsfontosságú a reakció gördülékenysége szempontjából. Egy, az amerikai Yellow Stone Nemzeti Park gejzirjeiből származó, thermofil Archaeobaktérium, a *Thermus aquaticus* hőstabil, DNS dependens DNS polimeráz enzimének (Taq polimeráz) hőmérsékleti optimuma 70-80°C. Ezen hőmérsékleti tartományban az enzim átviteli száma 150 nukleotid/ sec. A Taq polimeráz hőstabilitása lehetővé teszi a PCR egyszerű automatizálását, ugyanis az enzimet elég egyszer a reakcióelegyhez adni, nem kell folyton pótolni azt a folyamat során. (DOMBRÁDI, 2012)

4.1.6. Primertervezés

A megfelelő primerek megtervezése és használata a sikeres PCR legfontosabb feltétele. Lényeges, hogy a target DNS szekvencia a tervezett amplifikáció által megkívánt mértékben legyen specifikus (pl. faj-, fajta- változat-, genotípus-, vagy egyed-specifikus). Nagy mennyiségű genetikai információ áll rendelkezésünkre, mely letölthető internetes adatbázisokból (pl. NCBI GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov). Ilyen szekvenciák alapján lehetséges, primertervező szoftverek (pl. Primer Designer 4, Sci Ed Central, Morrisville NC, USA) segítségével megtervezni a primereket. Egymással komplementer primerpár nem megfelelő az amplifikációhoz. Fontos, hogy a primerek 16-30 nukleotid hosszúságúak legyenek, ennél rövidebb primerek nem specifikus kötések létrejöttét eredményezhetik, a 30 bázisnál hosszabb primerek azon felül, hogy specifikusságuk nem nagyobb, túl magas hőmérsékleten hibridizálódnak a target DNS-hez. A guanin-citozin (G-C) kötések három hidrogénhidat tartalmaznak, így stabilabbak az adenin-timin (A-T) kötések két hidrogénhídjával szemben. Ennek következtében a primerekben a guanin, citozin bázisok aránya 50-60 % között optimális, ez alatt nem stabil a target-kötés, felette pedig erős a nem-specifikus kötődés. Azonos okból előnyös, ha a primerek 3' végén az első 1-2 bázis G vagy C, ugyanis a stabilabb kötés miatt megbízhatóbb lesz az elongáció. A G-C:A-T arány határozza meg a primer olvadáspontját (azt a hőmér-

sékletet, mikor a komplementer DNS-szekvenciával alkotott kötések felbomlanak) is, mely a PCR reakció hőmérsékleti profiljának megtervezése szempontjából lényeges (DEZSŐ, 2007).

4.1.7. *Optimalizálás*

Minden PCR reakcióban tökéletes protokoll nem áll rendelkezésünkre, így a reakció megkezdésekor optimalizálni kell a körülményeket. A PCR hatékonyságát az alábbi faktorok befolyásolják.

A dNTP oldatok mennyisége, tisztasága: a másolás hűsége érdekében szuboptimális mennyiségű, nagy tisztaságú dNTP oldatokra van szükség.

A target DNS mennyisége: elvileg 1 DNS kettős hélix is elég, ilyenkor azonban legyen magasabb a reakció ciklusszáma, szükség esetén ismételt láncreakció sorozat kivitelezendő.

A reakcióközeg optimalizálandó tulajdonságai: Mg^{2+} -ion koncentráció (mely a Taq polimeráz optimális működését biztosítja) enzimmennyiség, pH, adalékanyagok koncentrációi (pl formamid, DMSO, glicerín, KCl $(NH_4)_2SO_4$, zselatin).

Tisztaság: fontos a szennyezések, kontamináció elkerülése, hiszen azok akár a szennyező DNS felszaporítását eredményezhetik (DOMBRÁDI, 2012).

4.1.8. *A PCR kiértékelése*

A PCR reakció hagyományos kiértékelése agaróz- vagy poliakrilamid gélelektroforézis, melyek során a DNS fragmentumok fluoreszcens interkalálódó vegyületek és UV fény segítségével detektálhatóak. Az elektroforézis segítségével a DNS fragmentumok hosszukból adódóan, tömegük szerint választhatóak el egymástól. (RADVÁNSZKY et al. 2006).

4.2. **Real-time PCR**

4.2.1. *A real-time PCR fogalma*

A 90-es években olyan rendszerek kerültek kifejlesztésre, melyek fluorometria mérés alkalmazásával tették lehetővé a PCR amplifikáció valós idejű nyomon követését. Az erre a célra kifejlesztett eszközök lehetővé tették a PCR reakciók kiértékelését a reakciócsövek ki nyitása, és a PCR végtermékkel történő további manipulálás nélkül (RADVÁNSZKY et al. 2006).

4.2.2. *A real-time PCR működési elve*

A Real Time rendszerek specialitása, hogy indikátor szerepű hozzáadott vegyületek fluoreszcencia jeleit gyűjtik be a reakció alatt folyamatosan, ciklusról ciklusra. A kvantitatív real-time PCR (QPCR) pedig a fluoreszcencia-jelek számbeli értékekké alakítását jelenti.

A real-time PCR napjainkban egy jól bevált eljárás a gének expressziójának számszerűsítésére, mutációk detektálására. Alkalmazásával a PCR termékek mennyisége, fluoreszcencia mérés alapján detektálható, a reakció minden ciklusában. A PCR termékek detektálására különböző módszerek alkalmazhatók. A legelterjedtebbek a célszekvenciákhoz specifikus kötődésen alapuló hibridizációs próbák (TaqMan®, Molecular Beacon, Scorpion, stb.). A real-time PCR egy másik, szintén igen elterjedt megközelítése olyan fluoreszcens festékek alkalmazása, melyek a kettős szálú PCR termékhez nem-specifikusan kötődnek (DORAK 2006). Ilyen duplaszálú DNS-hez kötődő festékek például a SYBR® Green I, YO-PRO-1, BEBO, SYTO9, EvaGreen (RADVÁNSZKY et al. 2006). Mindkét módszer megfelelően gyors és érzékeny lehet, habár a detektálás elve és a reakció optimalizálása eltérő (DORAK 2006).

4.3. SYBR® Green

4.3.1. A SYBR® Green technika működési elve

A SYBR® Green festék, egy olyan fluoreszcens molekula, mely kötődni képes a kettős spirál szerkezetű DNS-hez (ld. 4. ábra). A festék által kibocsátott fluoreszcencia mennyisége arányos az adott reakcióban pillanatnyilag jelen lévő duplaszálú DNS-sel. Egy PCR reakcióban, ahol a kiindulási target DNS mennyisége minimális, a PCR terméként képződött duplaszálú DNS az egyetlen, amely jelentős mennyiségben detektálható. Az első ciklusokban a SYBR® Green festék által kibocsátott fluoreszcencia jel általában túl gyenge ahhoz, hogy detektálni lehessen. A PCR reakció exponenciális fázisában a fluoreszcencia (a PCR termék mennyiségével arányos módon) minden ciklusban megduplázódik. A fluoreszcencia precíz ciklusonkénti duplázódása fontos indikátora a jól optimalizált real-time PCR reakciónak. 30-35 fázis után a fluoreszcencia eléri a platóját, nem növekszik tovább. A fluoreszcencia növekedésének abbamaradása azt jelzi, hogy a PCR reakció is plató fázisba került (DORAK, 2006).



4. ábra: SYBR® Green festék működése
(http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm)

A dupla szálú DNS-sel komplexet képző SYBR® Green festékmolekulák 497 nm-en gerjeszthetők, az ekkor kibocsátott fluoreszcencia-jel a DNS-be interkalálódott festékmolekulák esetén 100-szorosa a szabad festékmolekulák mérhető fluoreszcenciájának. A SYBR® Green

festéket alkalmazó real-time PCR pontatlanságát okozhatja a primer-dimerek és a nem specifikus amplifikációs termékek képződése, az aspecikus detektálás miatt ugyan is ezek nem különböztethetőek meg a specifikus PCR termékektől.

4.3.2. *Oladási görbe analízis*

Az optimalizálás eredményessége oladási görbe analízissel ellenőrizhető. Az analízis lényege, hogy a PCR reakció végén a reakcióelegyet 60°C-ról lassan 95°C-ra melegítik, közben mérik az elegy fluoreszcenciáját (DOMBRÁDI 2012). A DNS fragmentumok olvadáspontja az a hőmérséklet, melyet elérve a duplaszálú DNS-ek szimpla szálú DNS-sé denaturálódnak, ekkor a SYBR® Green festékmolekulák disszociálnak azokról. Az egyes DNS molekulák olvadáspontja nagyban függ a láncok hosszától, illetve azok bázisösszetételétől, főként guanin-citozin tartalmától (RADVANSZKY 2006). A DNS-SYBR® Green komplexek felbomlása a fluoreszcencia meredek csökkenésével jár. Ezek a fluoreszcencia csökkenések detektálhatóak. A primer-dimerek, illetve nem specifikus amplifikációs termékek olvadáspontja különbözik a specifikus termékektől, így azok jelenlétekor az oladási görbében több meredek fluoreszcencia csökkenés lesz megfigyelhető. Ezzel szemben ideális esetben egy jelentős fluoreszcencia csökkenés lesz detektálható, mely megfelel a specifikus PCR termék olvadáspontjának.

Az esetek egy részében azonban a melegítés során az egyes termékek nem különíthetőek el egyértelműen egymástól, ugyanis olvadáspontjuk hasonló. Ilyenkor az oladási görbe analízis kiegészítendő gélelektroforézissel, ahol molekulatömeg alapján elválaszthatóak egymástól a különböző termékek (DOMBRÁDI, 2012.)

5. Saját vizsgálat

5.1. Primer tervezés

5.1.1. Primerek rövid termékhez a mitokondrium CYTB szakaszából

Szarvasmarha mtDNS (mtDNS) citokróom B (CYTB) fehérjét kódoló szakaszára a Primer Designer 4- szoftverrel terveztünk primereket. Target szekvencia választásunkat a gén fajspecifitása, valamint fajon belüli álladósága indokolja. A BoCy10 primerpár tagjai 20 nukleotid hosszúságúak, a forward (F) primer szekvenciája GCTCCAACAACCCAACAGGA, a reverse (R) primeré GATGTGAGGGGGTGTGTTGA. A BoCy11 primerpár tagjai is 20 nukleotid hosszúságúak, az BoCy11F primer szekvenciája GGAACAGGCTGAACCGTGTA, a BoCy11R primeré CCGGCTGCTAATACAGGGAG. A két tervezett primerpár tulajdonságai az 1., illetve 2. táblázatban láthatók. A BoCy10 primerpár specifikus terméke 194 bázispár hosszúságú, a BoCy11 primerpár specifikus terméke pedig 248 bázispár hosszúságú. A rövid termékek lényegesek az esetlegesen töredezett mtDNS érzékeny detektálása szempontjából. A specifikus PCR-termékek tulajdonságai a 3. táblázatban szerepelnek.

1. táblázat: BoCy10 primerpár tulajdonságai

Primer	BoCy10 Forward	BoCy10 Reverse
Szekvencia	GCTCCAACAACCCAACAGGA	GATGTGAGGGGGTGTGTTGA
Hossz	20 nukleotid	20 nukleotid
Pozíció mtDNS-en	15124	15317 C
G-C %	55%	55%
Olvadáspont	74°C	72°C

2. táblázat: BoCy11 primerpár tulajdonságai

Primer	BoCy11 Forward	BoCy11 Reverse
Szekvencia	GGAACAGGCTGAACCGTGTA	CCGGCTGCTAATACAGGGAG
Hossz	20 nukleotid	20 nukleotid
Pozíció mtDNS-en	6053	6300 C
G-C %	55%	60%
Olvadáspont	72°C	73°C

3. táblázat: A primerpárok specifikus PCR termékei

Primer	BoCy10	BoCy11
Célmolekula	16338 bázispár, cirkuláris, mtDNS	
Hossz	194 bázispár	248 bázispár
G-C %	48%	46%
Hibridizációs hőmérséklet	52°C	52°C

Primerpáraink specificitása megfelelően nagy, ugyanis a BLAST (NCBI, Basic Local Alignment Search Tool) keresőben egyedül szarvasmarha mtDNS-re kötődhetnek. A BoCy11F primer ugyan kötődhet egy dél-amerikai, nyílméregbékafélék családjába tartozó békafaj (*Ranitomeya vanzolinii*) (5. ábra) mtDNS-éhez. Ez nem jelent problémát, mivel a BoCy11R primer nem kötődik a béka-genomhoz.



5. ábra: *Ranitomeya vanzolinii* (Mark Pepper fotója)

5.1.2. Primerpár szarvasmarha mtDNS D-hurok (D-loop) hipervariábilis régiójához

Ezeket a primereket a hagyományos PCR-reakcióhoz használtuk. A DLP01F primer szekvenciája: AATACCAACGGCCGGCACAAT, a DLP01R primer szekvenciája GCTGGTGCTCAAGATGCAGTTA. A primerpár specifikus terméke 887 bázispár hosszú, a mitokondriális genom citokrom B-t és tRNS-Phe-t (fenilalanint szállító tRNS-t) kódoló szakaszai között elhelyezkedő D-loop szakasz másolata.

5.2. DNS tisztítás, fluorometria.

5.2.1. DNS kivonása borral hígított tejből

A kísérlet során négytagú hígítási sort készítettünk, olyan módon, hogy a hígítási sor tagjaiban a tej borral való hígításának mértéke rendre 10-szeres, 100-szoros, 1.000-szeres és 10.000-szeres volt. A sorokat vörös- és fehérborból is elkészítettük.

A második folyamat a DNS kivonása volt a hígítási sor tagjaiból. A Sigma-Aldrich (Hannover, Germany) cég által gyártott GenElute Blood Genomic DNA Kit-tel dolgoztunk, mely eredetileg a DNS vérből való kivonásához készült, ám tapasztalatok szerint a kit-tel más min-tákból is megbízhatóan tisztítható DNS.

A kit protokollja szerint dolgoztunk. 20 µl Proteinase K enzimoldatokhoz mértünk 200-200 µl-t a hígítási sor tagjaiból, melyeket előzőleg vortex segítségével kevertünk. Ez után következett a gyárilag elkészített Lysis Solution C melyből 200 µl-t adtunk a preparátumokhoz, majd vortexes keverés következett. A csöveket ezután 15 percig 55 fokon melegítettük termosztátban (Thermo Block TBD-120, Biosan, Riga, Lithuania). A melegítés után a csöveket vortexszel kevertük, majd 200 µl etanolt mértünk hozzájuk, ismét vortex segítségével kevertük. A melegítés alatt előkészítettük az oszlopokat, melyek az elúciót végeztük. A gyári

Column Preparation Solution-ból 500-500 µl-t mértünk az oszlopokra, majd azokat 12000 G-vel egy percig centrifugáltuk (Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Germany). A centrifugálás után az oszlopok gyűjtőcsöveit ürítettük. A melegített Eppendorf csövekben lévő 620 µl-nyi oldatot ráértük az oszlopokra, majd azokat 6500 G-vel centrifugáltuk 1 percig. A gyűjtőcsövek tartalmát a centrifugálás után elöntöttük. Következett az oszlopok nedvesítése 500 µl gyári Prewash Solution-nal, amelyet ráértünk az oszlopokra, majd ismét centrifugáltuk 6500 G-vel 1 percig. A gyűjtőcsövekben lévő folyadékot ismét elöntöttem. Az előmosást a mosás követte a gyári Wash Solution-nal, melyből 500-500 µl-t pipettáztunk az oszlopokra, melyeket ezután 3 percig centrifugáltuk maximális fordulatszámon. A gyűjtőcsövekből elöntöttük a folyadékot, majd az oszlopok szárítása érdekében még egyszer 3 percig centrifugáltunk maximális fordulatszámon. Az első elúció megkezdése előtt az eddig használt gyűjtőcsövekből az oszlopokat óvatosan új, feliratozott 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük. Az oszlopok közepére 200-200 µl gyári Elution Solution-t pipettáztunk, 5 percig hagytuk a mintákat szobahőmérsékleten, majd a centrifugába helyeztük azokat, ahol 1 percig 6500 G-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után az első eluátumot tartalmazó Eppendorf csöveket lezártuk, az oszlopokat új feliratozott Eppendorf csövekbe helyeztük, egy második elúció végrehajtásának céljából. A második elúciót az elsővel azonos módon hajtottuk végre.

5.2.2. Tejből tisztított DNS hígítása

A laborban már rendelkezésünkre állt egy előzőleg tejből kivont DNS minta, melyet az előző pontban leírt módszerrel készítettünk. A mintából hígítási sort készítettünk UP- vízzel, a hígítási sor tagjaiban a minta hígításának mértéke rendre 10-szeres, 100-szoros, 1.000-szeres, 10.000-szeres volt.

5.2.3. Fluorometria

A méréshez Quibit 2.0 típusú fluorométert (Invitrogen, Carlsbrand CA, USA) használtunk. A leírás szerint készítettük el a munkaidőanyagot, amely gyári Quibit érzékeny reagens (Qubit® dsDNA HS-High Sensitivity, Invitrogen, Eugene) és Quibit puffer 1:199 arányú keveréke. A fluorométert DNS-mérésre állítottuk, majd elkészítettük a kalibráláshoz szükséges 2 standard oldatot, melyek 10-10 µl Quibit Standard 1-, illetve Quibit Standard 2- koncentrátumot, valamint 190-190 µl munkaidőanyagot tartalmaztak. A standard oldatokkal kalibráltuk a fluorométert. Ezután következett a mérés, mely során a munkaidőanyagból 180 µl-t, az egyes mintákból pedig 20-20 µl-t pipettáztunk Quibit csövekbe. A csöveket fluorometráltuk.

5.3. Hagyományos PCR, gélelektroforézis.

5.3.1. PCR reakcióelegy összeállítása

A PCR-automatába kerülő csövek mindegyikének azonos arányban kell tartalmaznia a reakcióelegy összetevőiből, így először a reakció végbemeneteléséhez szükséges Master Mix-et állítottuk össze, mely az amplifikálandó DNS mintákon kívül tartalmazza a reakció összes komponensét. Mi a 13 mintánkhöz 14 mintára elegendő mennyiséget mértünk össze. Az így elkészült Master Mixet vortexeltük és centrifugáltuk, hogy ne maradjanak cseppek a cső belső falán, illetve buborék az elegyben. A következő művelet a Master Mix szétmérése 13 Eppendorf csőbe.

4. táblázat: Minta felsorolása

Sorszám	Minta jele	Minta
1	T	Tehéntej
2	T10	Tehéntej 10x-es vizes hígítása
3	T100	Tehéntej 100x-es vizes hígítása
4	T1000	Tehéntej 1000x-es vizes hígítása
5	T10000	Tehéntej 10000x-es vizes hígítása
6	TH1	Tehéntejből tisztított DNS 10x-es vizes hígítása
7	TH2	Tehéntejből tisztított DNS 100x-es vizes hígítása
8	TH3	Tehéntejből tisztított DNS 1000x-es vizes hígítása
9	TH4	Tehéntejből tisztított DNS 10000x-es vizes hígítása
10	TB1	Fehérborral 10x-esre hígított tehéntej
11	TB2	Fehérborral 100x-osra hígított tehéntej
12	TB3	Fehérborral 1.000x-esre hígított tehéntej
13	TB4	Fehérborral 10.000x-esre hígított tehéntej

5. táblázat: A hagyományos PCR reakció összetevői

Összetevők	Mennyiség [μl]
Ultrapure water (UP)	12,5
Dezoxi nukleotid trifoszfátok (dNTP)	2,5
Puffer (KCl tartalmú)	2,5
Magnézium- klorid oldat	2,0
Primer-mix (5μmol/μl)	2,0
Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)	1,0
Taq-polimeráz (Fermentas, Dream Taq)	0,5
DNS templát	2

A Master mix homogenitásának következtében, minden csőbe 12,5 μl ultrapure water (UP), 2,5 μl dNTP, 2,5 μl (KCl tartalmú) puffer, 2,0 μl magnézium-klorid oldat, 2,0 μl DLP Primer-mix, 1,0 μl BSA, 0,5 μl Taq polimeráz, valamint 2 μl DNS templát került. Így minden cső 23 μl reakcióelegyet tartalmazott az sokszorozandó DNS-ek hozzáadása előtt. Az amplifikálandó DNS molekulákat tartalmazó mintákból 2-2 μl került a 23 μl Master Mixet tartalmazó PCR csövekbe, így azok a PCR automatába helyezés előtt egyenként 25- 25 μl-t tartalmaztak. A 13 PCR-mintát a 4. táblázatban soroljuk fel. Az egy PCR csőbe kerülő összetevőket az 5. táblázatban tüntettük fel.

5.3.2. PCR körülmények

A mintákat behelyeztük az automatába (ABI 2700 Applied Biosystems, Foster City CA, USA) majd szarvasmarha mtDNS amplifikálására optimalizált PCR programmal indítottuk el. A reakció kezdő lépésében a minták 1 perc 45 másodpercig denaturálódnak, majd következik az amplifikáció 35 ciklusa. A ciklus első, denaturációs lépése 96°C-on 50 másodperc, a hibridizáció 55°C-on 50 másodperc, a ciklus befejező extenziós lépése 72°C-on 70 másodperc. A reakció végén a végső extenziós lépés 15 perc 72°C-on.

5.3.3. Gélelektroforézis

A PCR program lejárta után a mintákat horizontális, 2,5%-os agarózgél-elektroforézissel futtattuk (Clever Scientific ELFO kádban, nanoPAC-300 tápegység). A futtatott gélekről fényképeket készítettünk digitális fényképezőgép alapú dokumentációs rendszerrel (GLITE 900BW, Pacific Image Electronics, Taiwan)

5.4. Real time PCR, SYBR® Green technikával

5.4.1. Tehéntej vizes hígítási sorából tisztított DNS mintákból összeállított PCR reakció

6. táblázat: vizes hígítási sorból származó minták

Sorszám	Minta	Primer-mix
1	NTC (No Template Control)	BoCy10
2	NTC	BoCy11
3	Tehéntej	BoCy10
4	Tehéntej	BoCy10
5	Tehéntej	BoCy11
6	Tehéntej	BoCy11
7	Tehéntej 10x-es vizes hígítása	BoCy10
8	Tehéntej 10x-es vizes hígítása	BoCy10
9	Tehéntej 10x-es vizes hígítása	BoCy11
10	Tehéntej 10x-es vizes hígítása	BoCy11
11	Tehéntej 100x-os vizes hígítása	BoCy10
12	Tehéntej 100x-os vizes hígítása	BoCy10
13	Tehéntej 100x-os vizes hígítása	BoCy11
14	Tehéntej 100x-os vizes hígítása	BoCy11
15	Tehéntej 1.000x-es vizes hígítása	BoCy10
16	Tehéntej 1.000x-es vizes hígítása	BoCy10
17	Tehéntej 1.000x-es vizes hígítása	BoCy11
18	Tehéntej 1.000x-es vizes hígítása	BoCy11
19	Tehéntej 10.000x-es vizes hígítása	BoCy10
20	Tehéntej 10.000x-es vizes hígítása	BoCy10
21	Tehéntej 10.000x-es vizes hígítása	BoCy11
22	Tehéntej 10.000x-es vizes hígítása	BoCy11

22 PCR-cső 20 µl-nyi mennyiséget tartalmazott a reakcióelegyből. A real-time PCR preparátumok összemérésekor a hagyományos PCR reakcióeleggyel (ld. 5.3.1.) megegyező elven dolgoztunk. A csövekbe kerülő 10 µl SYBR® Green Master Mix (Maxima SYBR®

Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific, USA) gyárilag előkészített. A mintákba kerülő 2 µl-nyi primer-mixek töménysége 5 µmol/µl. A minták 6 µl UP-t tartalmaztak, az NTC (No Template Control) mintákat, azok ugyanis DNS templátot nem, viszont UP-ból 8 µl-t tartalmaztak. Az NTC mintákon kívül a többi minta 2 µl-t tartalmazott az amplifikálandó DNS templátokból. A PCR reakcióelegyeket a 6. táblázatban tüntettük fel. A kész mintákat beraktuk a real-time PCR automatába. (StepOne™, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) amplifikálás céljából.

5.4.2. Tehéntej vörösboros, illetve fehérboros hígítási soraiból összeállított PCR reakció

A vizes hígítási sorral megegyező módon állítottunk össze a 20 µl-es mintákat a vörösboros, és fehérboros tehéntej-hígítási sorokból tisztított DNS mintákból, majd azok amplifikációját a StepOne™ real-time PCR automatával végeztük. Az alábbi, 7. táblázat mintáinak amplifikálását tehát duplán elvégeztük, az első plate-en a fehérboros hígítási sorból, a másodikon a vörösboros hígítási sorból származó mintákkal.

7. táblázat: boros hígítási sorokból származó minták

Sorszám	Minta	Primer mix
1	NTC (No Template Control)	BoCy10
2	NTC	BoCy11
3	Tehéntej	BoCy10
4	Tehéntej	BoCy10
5	Tehéntej	BoCy11
6	Tehéntej	BoCy11
7	Tehéntej 10x-es boros hígítása	BoCy10
8	Tehéntej 10x-es boros hígítása	BoCy10
9	Tehéntej 10x-es boros hígítása	BoCy11
10	Tehéntej 10x-es boros hígítása	BoCy11
11	Tehéntej 100x-os boros hígítása	BoCy10
12	Tehéntej 100x-os boros hígítása	BoCy10
13	Tehéntej 100x-os boros hígítása	BoCy11
14	Tehéntej 100x-os boros s hígítása	BoCy11
15	Tehéntej 1.000x-es boros hígítása	BoCy10
16	Tehéntej 1.000x-es boros hígítása	BoCy10
17	Tehéntej 1.000x-es boros hígítása	BoCy11
18	Tehéntej 1.000x-es boros hígítása	BoCy11
19	Tehéntej 10.000x-es boros hígítása	BoCy10
20	Tehéntej 10.000x-es boros hígítása	BoCy10
21	Tehéntej 10.000x-es boros hígítása	BoCy11
22	Tehéntej 10.000x-es boros hígítása	BoCy11

5.4.3. Vörösborra, fehérborra, kazeinre tervezett PCR reakció

Kísérletünkhöz tartálykocsiból származó vörösborból és fehérborból tisztított mintákat használtuk, valamint a gyárilag tisztított kazeint. Az előző reakciókkal megegyező módon készítettük el a 20 µl-es reakcióelegyeket a PCR csövekben. A mintákat a 8. táblázatban tüntettük fel.

8. táblázat: Vörösborra, fehérborra, kazeinre tervezett mintasor

Sorszám	Minta	Primer mix
1	NTC (No Template Control)	BoCy10
2	NTC	BoCy10
3	NTC	BoCy11
4	NTC	BoCy11
5	Fehérbor	BoCy10
6	Fehérbor	BoCy10
7	Fehérbor	BoCy11
8	Fehérbor	BoCy11
9	Vörösbor	BoCy10
10	Vörösbor	BoCy10
11	Vörösbor	BoCy11
12	Vörösbor	BoCy11
13	Kazein 10x-es vizes hígítása	BoCy10
14	Kazein 10x-es vizes hígítása	BoCy10
15	Kazein 10x-es vizes hígítása	BoCy11
16	Kazein 10x-es vizes hígítása	BoCy11

5.4.4. 10.000-szeres boros hígítások ismételt vizsgálata

Az előző reakciókkal megegyező módon készítettük el a 20 µl reakcióelegyet tartalmazó PCR csöveket a reakcióhoz. A mintákat a 9. táblázatban tüntettük fel

9. táblázat: 10.000-szeres boros hígítások ismételt vizsgálatára összeállított mintasor

Sorszám	Minta	Primer mix
1	NTC (No Template Control)	BoCy10
2	NTC	BoCy10
3	NTC	BoCy11
4	NTC	BoCy11
5	Tehéntej	BoCy10
6	Tehéntej	BoCy10
7	Tehéntej	BoCy11
8	Tehéntej	BoCy11
9	Tehéntej 1.000x-es fehérboros hígítása	BoCy10
10	Tehéntej 1.000x-es fehérboros hígítása	BoCy10
11	Tehéntej 1.000x-es fehérboros hígítása	BoCy11
12	Tehéntej 1.000x-es fehérboros hígítása	BoCy11
13	Tehéntej 1.000x-es vörösboros hígítása	BoCy10
14	Tehéntej 1.000x-es vörösboros hígítása	BoCy10
15	Tehéntej 1.000x-es vörösboros hígítása	BoCy11
16	Tehéntej 1.000x-es vörösboros hígítása	BoCy11
17	Tehéntej 10.000x-es fehérboros hígítása	BoCy10
18	Tehéntej 10.000x-es fehérboros hígítása	BoCy10
19	Tehéntej 10.000x-es fehérboros hígítása	BoCy11
20	Tehéntej 10.000x-es fehérboros hígítása	BoCy11
21	Tehéntej 10.000x-es vörösboros hígítása	BoCy10
22	Tehéntej 10.000x-es vörösboros hígítása	BoCy10
23	Tehéntej 10.000x-es vörösboros hígítása	BoCy11
24	Tehéntej 10.000x-es vörösboros hígítása	BoCy11

5.4.5. Negatív kontroll-borok PCR reakciója

Mintáink ebben a reakcióban, a feltételezéseink szerint tejet nem tartalmazó, palackozott, kereskedelmi forgalomban kapható borokból származtak. Az előző reakciókkal megegyező módon készítettük el a 20 µl reakcióelegyet tartalmazó PCR csöveket a reakcióhoz. A mintákat a 10. táblázatban tüntettük fel.

10. táblázat: negatív kontroll borokból készített mintasor

Sorszám	Minta	Primer mix
1	NTC (No Template Control)	BoCy10
2	NTC	BoCy10
3	NTC	BoCy11
4	NTC	BoCy11
5	Tehéntej	BoCy10
6	Tehéntej	BoCy10
7	Tehéntej	BoCy11
8	Tehéntej	BoCy11
9	Fehérbor 1	BoCy10
10	Fehérbor 1	BoCy10
11	Fehérbor 1	BoCy11
12	Fehérbor1	BoCy11
13	Fehérbor 2	BoCy10
14	Fehérbor 2	BoCy10
15	Fehérbor 2	BoCy11
16	Fehérbor 2	BoCy11
17	Vörösbor	BoCy10
18	Vörösbor	BoCy10
19	Vörösbor	BoCy11
20	Vörösbor	BoCy11

5.4.6. Az SYRB® Green real-time PCR reakciók hőmérsékleti profilja

Kétlépéses PCR technikát alkalmaztunk, a hibridizáció és szintézis fázisait egy lépésbe vontuk össze. A reakció kezdő szakaszában a minták 10 percig denaturálódtak 95°C-on, majd következett az amplifikáció 40 ciklusa. A ciklus első, denaturációs lépése 95°C-on 15 másodperc, második lépésként a hibridizáció és elongáció 52°C-on 1 perc. Az amplifikációs ciklus második lépésében a StepOne™ automata fluoreszcenciát is mért. A reakció végén egy utolsó 95°C-os, 15 másodperces lépést egy 60°C-os, 1 perces lépés követett. A PCR reakciót az olvadási görbe fázisa tette teljessé, a minták lassan 95 °C-ra, melegedtek, közben 0,3°C-onként fluoreszcencia-detektálás történt.

6. 6. Eredmények

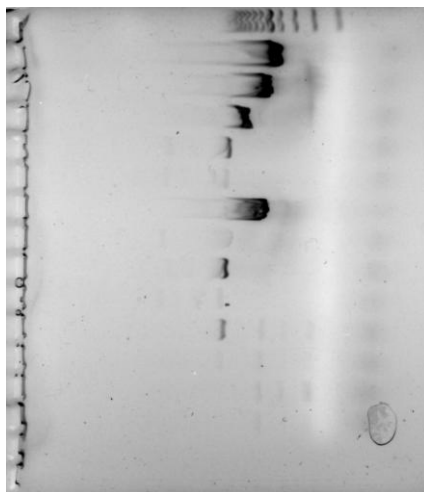
6.1. A DNS tisztítás eredményei

A DNS-tisztítás fluorometriával mért eredményei a 11. táblázatban láthatóak.

11. táblázat: DNS-tisztítás eredményei

Minta jelzése	Minta leírása	Mért koncentráció [ng/ml]
TB1	Tej- bor hígítás, 1:10	10,7
TB2	Tej- bor hígítás, 1:100	8,2
TB3	Tej- bor hígítás, 1:1000	7,7
TB4	Tej- bor hígítás, 1:10000	6,1
T	Tejből tisztított DNS	640
TH1	Tejből tisztított DNS hígítása 1:10	55,7
TH2	Tejből tisztított DNS hígítása 1:100	7,6
TH3	Tejből tisztított DNS hígítása 1:1000	Nem mérhető
TH4	Tejből tisztított DNS hígítása 1:10000	Nem mérhető
TH5	Tejből tisztított DNS hígítása 1:100000	Nem mérhető
F	Fehérborból tisztított DNS	19,6

6.2. Hagyományos PCR eredmények



6. ábra: Hagyományos PCR termékek az agarózgélén

A 6. ábrán a hagyományos PCR reakció termékei láthatóak agarózgél-elektroforézissel futtatva. A termékek az 1-10 minták reakciójából képződtek. A tej DNS, valamint a tej 10-szeres, 100-szoros, 1.000-szeres vizes hígításainál, a tejből tisztított DNS hígítási soránál a 10-szeres, 1000-szeres hígításoknál, valamint a tej 10-szeres fehérboros hígításánál jól látható, erős jel figyelhető meg. A tej 10.000-szeres hígításánál, a tej DNS 100-szoros és 10.000-szeres hígításainál gyenge jel figyelhető meg a gélen. A 11-13 minták, tehát a boros hígítási sor 100-szoros, 1000-szeres és 10.000-szeres tagjainál jel nem figyelhető meg.

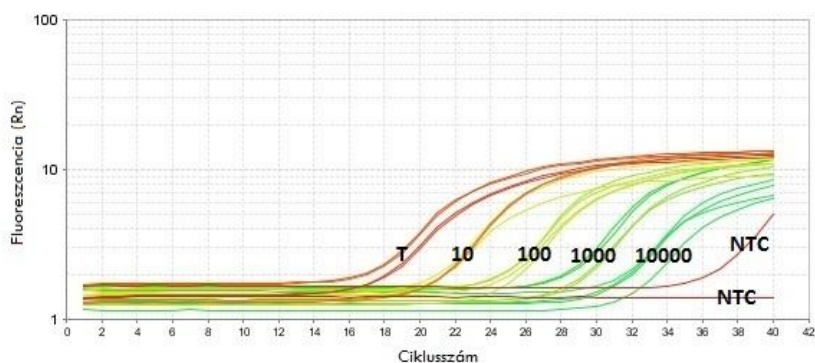
A termékék molekulatömegét jelző létra szerint a 4, 5, 7, 8, 9, 10. termékek molekulatömegei a kb 900 bázispár hosszú nukleinsavnak felelnek meg, így megegyeznek a primerek specifikus PCR termékének hosszával (887 bázispár). A többi futott termékről elmondható,

hogy bár azok is gyaníthatóan specifikus termékek, valószínűleg a házilag készített brómfenolkék festék és a termékek nagy mennyisége módosította az elektroforézis eredményét.

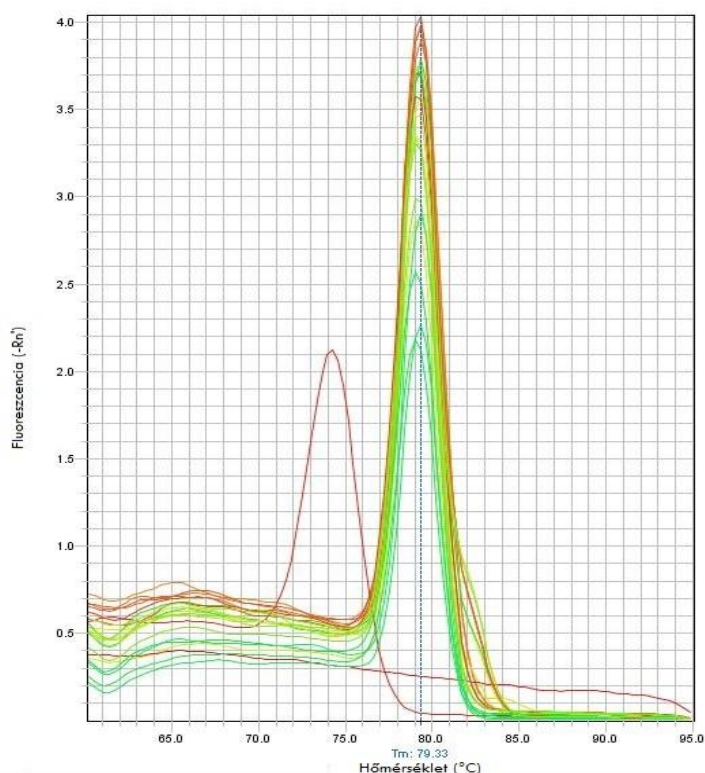
6.3. SYBR® Green PCR eredmények

6.3.1. Tehéntej vizes hígítási sorából tisztított minták PCR reakciója

A 6. táblázatban feltüntetett mintákat indítottuk a StepOne™ automatában. Az eredmények jól mutatják a DNS koncentrációjának csökkenését, ugyan is a nagyobb hígításokból, a reakció egyre későbbi ciklusában érte el a termék mennyisége az exponenciális növekedést.



7. ábra: Vizes hígítási sor amplifikációs grafikonja (Rn= Normalizált riporter szignál, T= tej, 10, 100, 1000, 10000=hígítások mértéke, NTC= No Template Control)



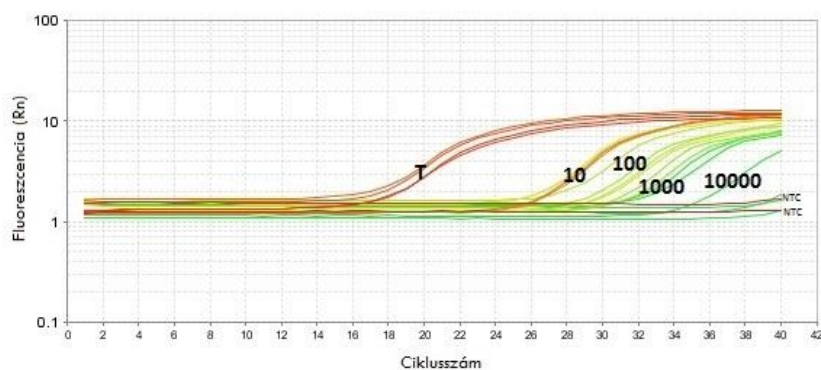
8. ábra: Vizes hígítási sor olvadási görbéi (-Rn'=negatív derivált riporter szignál, Tm=olvadáspont)

A 7. ábra jól mutatja, hogy a hígítatlan tejben már a 18. ciklusban exponenciálissá válik a reakció, (vörös görbék, T-jelzéssel), ugyan ez a legnagyobb, 10.000-szeres hígításnál (türkiz

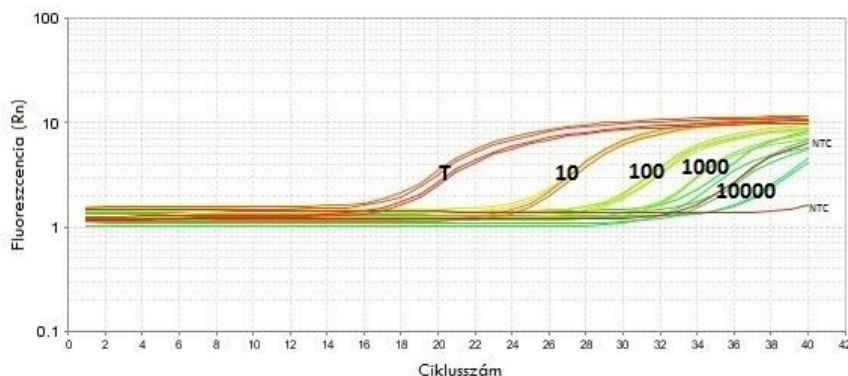
görbék 10.000- jelzéssel) csak a 32 ciklus környékén figyelhető meg. A 10.000-szeres hígításnál töményebb mintákból mért fluoreszcencia-görbék (10, 100, 1000, jelzésekkel) pedig rendre a tej és a leghígabb minta közti ciklusokban válnak exponenciálissá. A negatív kontroll-görbék(No Templat Control= NTC jelzésű vörös görbék) közül csak a BoCy11 es primerpár esetén tapasztalható fluoreszcencia növekedés a 36. ciklus környékén. Ez azért nem vezet ellentmondásos eredményre, mert az olvadási görbék (8.ábra) szerint a NTC-termékeket kivéve, a termékek olvadáspontja 79,03°C-79,33°C között mozgott, mely megfelel a primerek specifikus termékeinek olvadáspontjának. A BoCy11 primerpár NTC reakciójának terméke pedig 74,26°C-os olvadásponttal el is különül a többi mintától.

6.3.2. Tehéntej boros hígítási soraiból tisztított DNS minták PCR reakciója

Az 7. táblázatban feltüntetett minták amplifikálását indítottuk el.



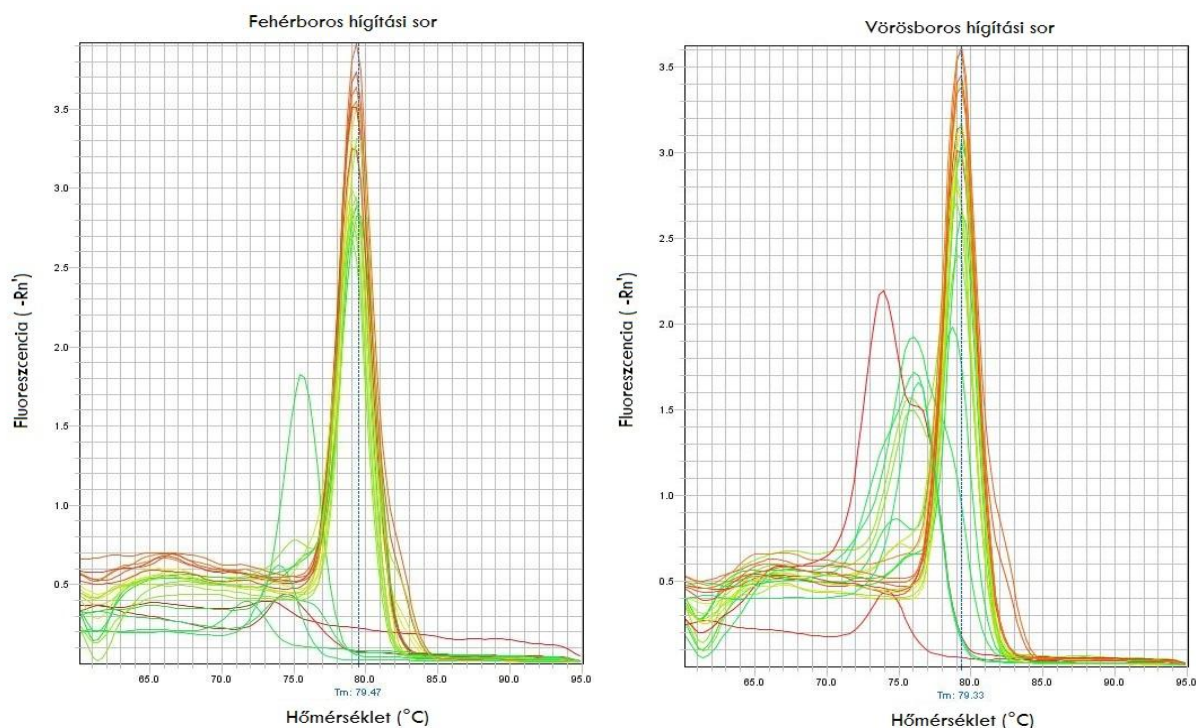
9. ábra: Fehérboros hígítási sor amplifikációs grafikonja (T= tej, 10, 100, 1000, 10000=hígítások mértéke, NTC= No Template Control)



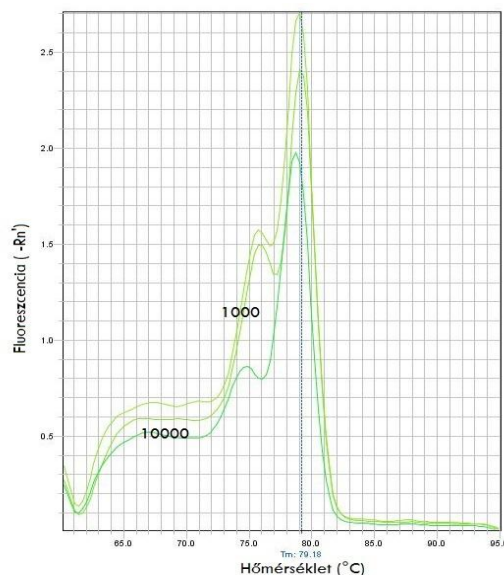
10. ábra: Vörösboros hígítási sor amplifikációs grafikonja (T= tej, 10, 100, 1000, 10000=hígítások mértéke, NTC= No Template Control)

A fehér- illetve vörösboros hígítási sorból tisztított minták amplifikációs grafikonjai az 9. és 10. ábrákon láthatóak. A tömény tejből tisztított minták amplifikációja ezekben a reakciókban is a 18 ciklusnál egyértelműen exponenciális. A boros hígítási sorok grafikonjai vizeshez viszonyítva később, a vörösbornál a 24., a fehérbornál a 26. ciklus környékén válnak exponenciálissá. A boros hígítási sor tagjainak grafikonjai nem válnak el olyan szépen egymástól, mint a vizes sor esetében. A vörösbornál a 10-szeres és 100-szoros hígítások grafikonjai jól

láthatóan elkülönültek, a fehérbornál azonban már ez sem mondható el. Az olvadási görbék (11. ábra) szerint a tömény tej, illetve a 10-szerestől az 1.000-szeres hígításokig a specifikus 79,03°C-79,47°C olvadáspontú termék amplifikálódott, míg a 10.000-szeres hígítások (egy vörösboros minta kivételével) és az NTC-k esetében alacsonyabb olvadáspontú, nem specifikus termékek amplifikálódtak.



11. ábra: Fehérboros-, és vörösboros minták olvadási görbéi (Tm= olvadáspont)



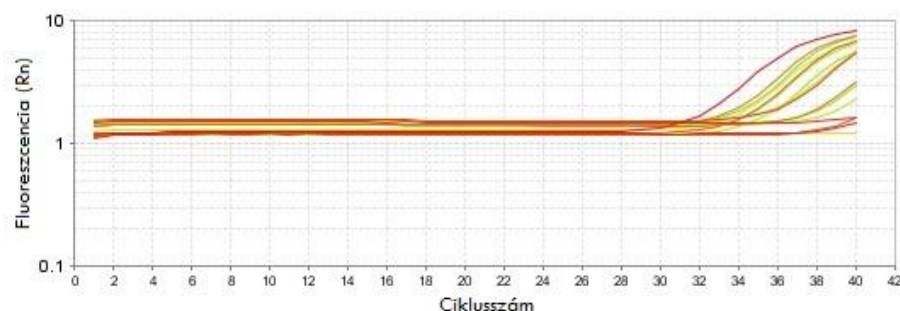
12. ábra : 1.000-szeres, 10.000-szeres vörösboros hígítású minták olvadási görbéi (1000, 10000= hígítások mértéke, Tm= olvadáspont)

Az egyetlen 10.000-szeres vörösboros hígítás, melyből specifikus (78,73°C olvadáspontú) termék amplifikálódott, a BoCy10 primerpárból készített mixet tartalmazta. Egyes vörösboros minták (2 db 1.000x-es, 1db 10.000szeres BoCy10 primer-mixszel amplifikálódott) olvadási

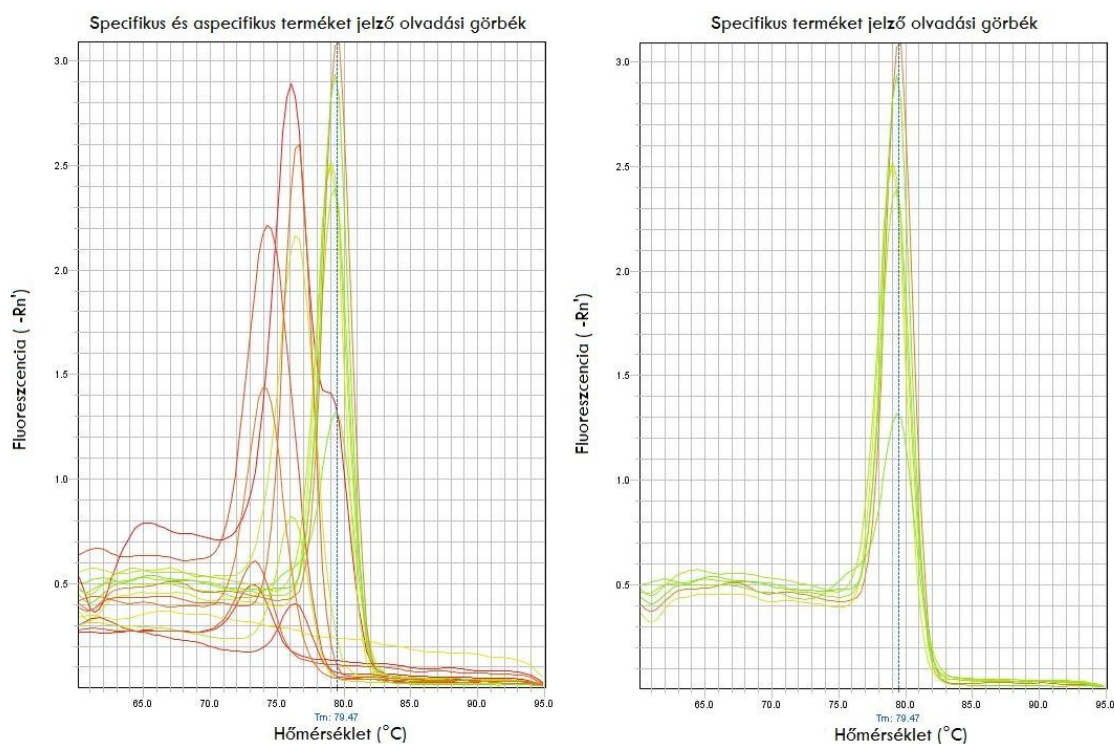
görbén egyszerre figyelhető meg a különböző csúcsokként megjelenő, specifikus, illetve nem specifikus termékek képződése (ld 12. ábra).

6.3.3. Tartálykocsiból származó borminták, és kazeinminták PCR reakciója

A 8. táblázatban feltüntetett minták PCR reakcióját indítottuk el. Az amplifikációs grafikonon (13. ábra) az egyes minták görbéi az amplifikáció ciklusai szerint nem különülnek el egymástól, később, a 31.-34. ciklusokban válnak exponenciálissá.



13. ábra: Borminták, és kazein tartalmú minták amplifikációs grafikonja

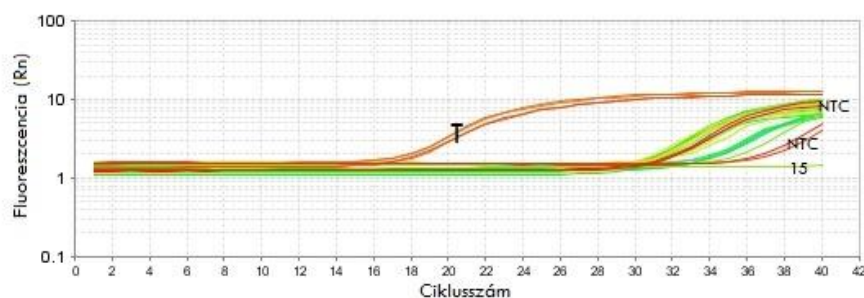


14. ábra: borminták, kazein tartalmú minták olvadási görbéi (T_m = olvadáspont)

Az olvadási görbék (14. ábra) szerint specifikus (79,02°C-79,47°C olvadáspontú) termékek keletkeztek egy BoCy11-es primer-mixszel amplifikálódott fehérbormintából, egy BoCy10-es primer mixszel amplifikálódott vörösbormintából, valamint a mind a négy kazeinmintából. Az említett 6 minta olvadási görbéit a 14. ábra 2. grafikonjaként külön is feltüntettem. A többi mintából nem specifikus (66,63°C-76,48°C olvadáspontú) termékek amplifikálódtak.

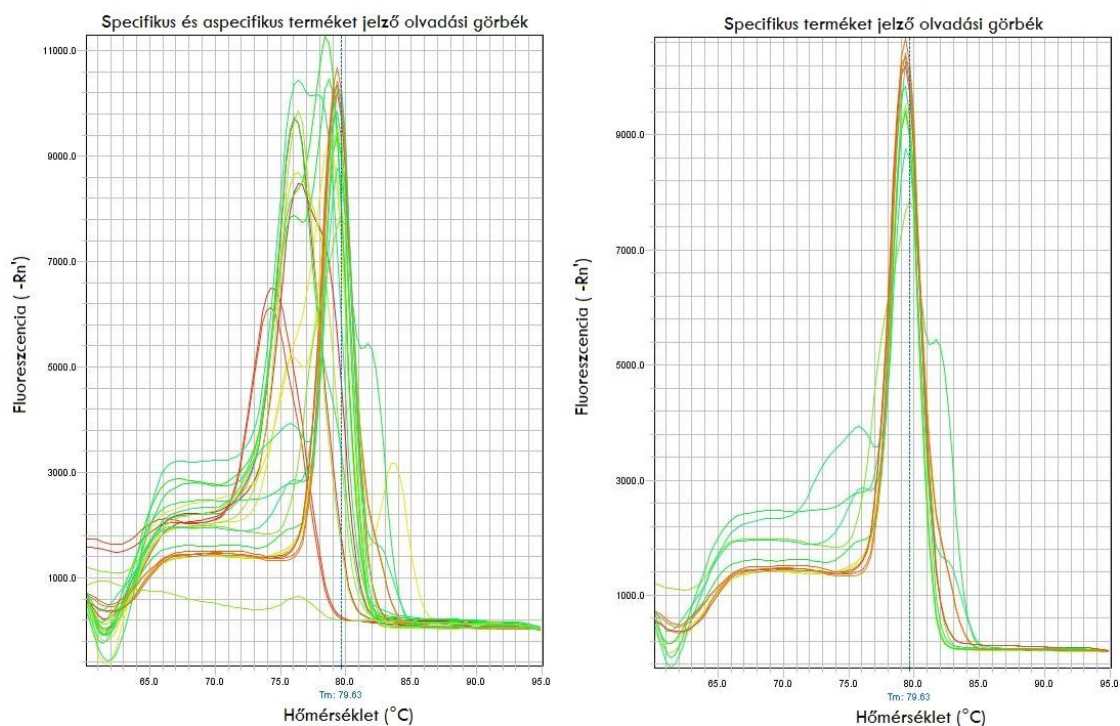
6.3.4. A 10.000-szeres boros hígítások ismételt vizsgálata céljából indított PCR reakció

A 9. táblázatban feltüntetett minták PCR reakcióját indítottuk el. Az amplifikációs grafikon (15. ábra) szerint a tejből származó minták T-jelzésű, vörös görbéi pozitív kontrollként a 18. ciklusban egyértelműen exponenciális szakaszba kerülnek. A többi minta amplifikációja csak a 32.-37. ciklusban válik exponenciálissá, sőt az egyik BoCyl 1-es primer-mixszel indított 1.000-szeres vörösboros hígításból (15. minta) nem is detektálható amplifikáció.



15. ábra: 10.000-szeres hígítások ismételt vizsgálatának amplifikációs grafikonja
(Az NTC jelzés a vörös görbékre vonatkozik)(T= tej, 15= 15. minta, NTC= No Template Control)

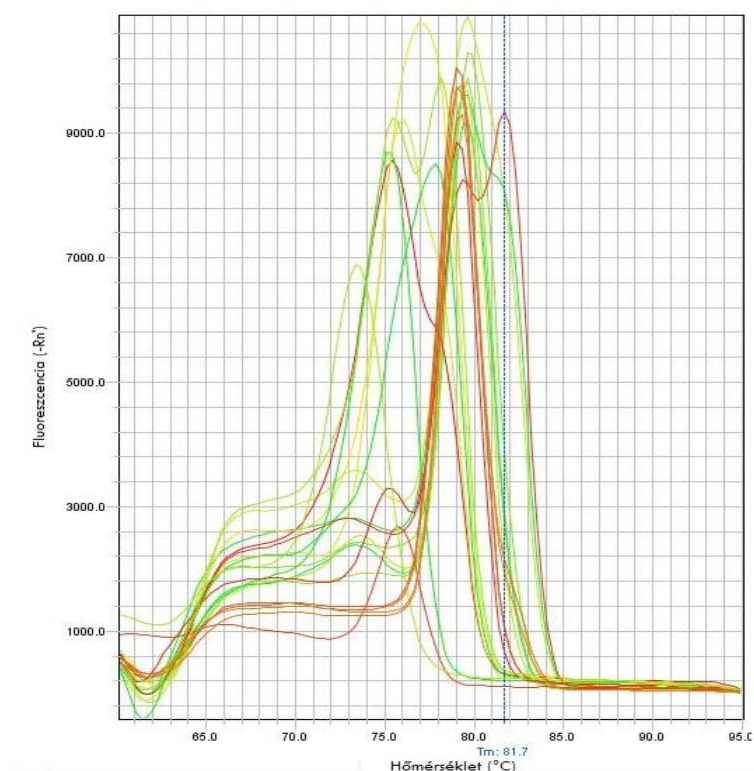
Az olvadási görbék (16. ábra) szerint a tejből származó mintáknál, Az 1.000-szeres fehérboros hígítás minden mintájánál, az egyik 1.000-szeres vörösbor, és a 10.000-szeres boros hígításoknál pedig csak a BoCyl 1 primer-mixet tartalmazó mintáknál detektálható specifikus (78,73°C-79,63°C olvadáspontú) termék.



16. ábra 10.000-szeres hígítások ismételt vizsgálatának olvadási görbéi (Tm= olvadáspont)

6.3.5. Negatív kontroll-borminták PCR reakciója

A 10. táblázatban feltüntetett minták amplifikálását indítottuk meg. A tejes minták amplifikációs görbéi már a 18. ciklusban exponenciálisak, a termékek olvadáspont ($79,17^{\circ}\text{C}$) alapján specifikusak. Későbbi, a 30. ciklusban exponenciálissá váló amplifikációs görbével rendelkező, specifikus olvadáspontú ($79,47^{\circ}\text{C}$ - $79,76^{\circ}\text{C}$) termék sokszorozódott mindhárom bor BoCy11 primer-mixes mintáiból. A BoCy10 primer-mixet tartalmazó bormintákból specifikusnak nem tekinthető termék amplifikálódott. Az amplifikációs grafikon a fent leírtakon felül nem informatív, az olvadási görbéken (17. ábra) viszont jól megfigyelhető a változatos olvadáspontú, nem specifikus termékek jelenléte.



17. ábra: negatív kontroll-borok olvadáspont görbéi (T_m =olvadáspont)

7. Következtetés

A tej szekréciója során több módon is kerülhetnek mitokondriumok a szekrétumba, ebből következően a tejben a mitokondriális genom is mindig fellelhető lesz. A mtDNS tehát a tej indikátor molekulája, jó választás lehet egyes elegyekben akár fajspecifikus-tejtartalom kimutatására is. Esetünkben a tehéntej-maradvány, tehéntej-szennyeződés kimutatását a tartálykocsiból származó borokból, a tartályok tisztításának alapossága nagyban befolyásolja.

A tehéntej borral való hígítása során a kapott elegyekben fluorometriával alacsonyabb DNS koncentrációt mértünk, mint az általunk hozzáadott tejet nem tartalmazó borban. Ha a fluorometria eredményeiben megbízunk, joggal feltételezhetjük, hogy a derítéskor keletkező pelyhes csapadékba kerül a rendszerben található DNS nagy része.

Hagyományos PCR alkalmazásával a tehéntej 10-szeres boros hígításában kaptunk specifikus, a szarvasmarha mtDNS jelenlétét igazoló terméket, tehát 10-es hígításból mutattuk ki a tehéntejet.

SYBR® Green real-time PCR-el történt vizsgálataink során a tej vizes hígítási sorából, az olvadási görbe analíziséből következően, 10.000-szeres hígítás esetén is értékelhető, specifikus jelet kaptunk. A boros hígítási sorokból 1.000-szeres hígításig megbízhatóan detektáltuk, 10.000-szeres hígítás esetén nem tudtuk megbízhatóan kimutatni a tejtartalmat. A vörösbor hígítási sorának amplifikációs görbéi hamarabb lesznek exponenciálisak, ebből arra következtetésre jutottunk, hogy több target DNS-t tartalmaznak a fehérbornál tapasztaltakkal szemben. A vörösboros hígításnál figyeltünk rá, hogy a mintát a keletkezett csapadék közeléből vegyük, így arra gondolunk, hogy a csapadék-képződéskor a DNS jelentős része is csapadékba kerül, így érdemes a vizsgálandó mintát a rendszer üledékes részéből venni. A kazein tartalmú minták reakciói során egyértelműen detektálható specifikus termék, így megállapítható, hogy a gyárilag tisztított szarvasmarha kazein tartalmaz mtDNS-t.

A tartálykocsiból származó borok esetében néhány mintából ugyan detektáltunk specifikus termékre utaló jelet, azonban ez alapján nem állíthatjuk, hogy biztonsággal meg tudjuk határozni a borok tej-maradékanyag tartalmát. Ezt véleményünk szerint a borban fellelhető mtDNS csekély mennyisége okozhatja, amelyre a tartálykocsik tisztításán felül a borok derítésének elvét képző csapadékképződés is magyarázatot nyújt. A felhasznált kontroll borok csak a reakció vége felé adtak specifikus termékre utaló jelet. Mindhárom bor redukív eljárással készült, amelyben gyakrabban szükséges a bor esztétikai értékének növelése, ezért a derítéshez használt kazein-készítmény mtDNS tartalma okozhatja a termék megjelenését.

A fent leírtak alapján, a real-time PCR jó molekuláris biológiai eszköznek bizonyult a tej-tartalom detektálásához, használható lehet szarvasmarha eredetű (és más fajokra jellemző) allergének élelmiszerekből való, gyors és érzékeny kimutatására.

8. Összefoglalás

A tejmirigyben a tej elválasztása során kerülhetnek mitokondriumok a tejbe. Fiziológiásan a tejszekréció természetes típusai folytán és a tejszöveti sejtek megújulása során, patológiásan az emelkedett szomatikus sejttartalom miatt. A szarvasmarha mitokondriumokat tartalmazó tehéntej többféle okból lehet a borban. Derítésre, azaz a borban lebegő vagy oldott anyagok kicsapására és a savak finomítására használható a borok kezelése során, de mint szennyeződés is kerülhet a borba. Szennyeződésként egy speciális borhamisítási módszer során, amikor hazánkba gyenge minőségű bor a külföldre tejet szállító kamionokban visszaruként érkezik. Az importált bor szintén gyenge minőségű magyar borral keverve kerül értékesítésre.

Dolgozatunkban arra kerestük a választ, hogy egyszerű molekuláris módszerekkel, milyen érzékenységgel vagyunk képesek kimutatni a tehéntejet borból.

Kísérleteinkben a kimutatandó célmolekula, a tehéntejben előforduló szarvasmarha mtDNS volt. Együttműködve a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Borászati és Alkoholos Italok Igazgatóságával, neves termelőktől származó tiszta magyar borokból és Olaszországból érkező tartálykocsikból származó borokból kaptunk mintákat.

Hagyományos PCR segítségével a tej 10-szeres boros hígításából, real-time PCR használatával pedig a tej 1.000-szeres boros hígításából mutattuk ki a target molekulára jellemző szekvenciát. Ezzel szemben tehéntej vizes hígítási sorából, mind hagyományos, mind real-time PCR alkalmazásával 10.000-szeres hígításokból is kimutatható a target szekvencia. Gyári szarvasmarha-kazeinben és kereskedelmi forgalomban kapható borokban is szarvasmarha mitokondriális DNS tartalomra utaló jeleket tapasztaltunk.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a mitokondriális DNS a tej indikátor molekulája, jó választás lehet egyes elegyekben a fajspecifikus tejtartalom kimutatására. A hígítási sorokban mért DNS koncentrációk alapján joggal gondolhatunk arra, hogy a bor derítése során a rendszerben jelen lévő DNS jelentős része a keletkező pelyhes csapadékba kerül. A real-time PCR a hagyományos PCR-nél mintegy 100-szor érzékenyebb módszer borból tejtartalom kimutatására. A gyárilag tisztított szarvasmarha-kazein tartalmaz mitokondriális DNS-t. A kontrol borokban kimutatott mtDNS azok derítéséből adódik. Módszerünk a tejallergiának élelmiszerekben való kimutathatóságához nagyban hozzájárulhat.

9. Summary

In mammary gland, during milk secretion, mitochondria can get in milk. Physiologically, due to the natural types of milk secretion and the renewal of the mammary gland's cells, pathologically, due to the elevated somatic cell content. Cow's milk (containing bovine mitochondria), appears in wine for various reasons. Milk could be used for the purification of wines, that is denaturation of floating, or dissolved particles, and refinement of acids, though milk could also get in wine as contamination. Milk contamination can appear as a result of special wine falsification method, when wine of poor quality from abroad comes to our homeland, in tank trucks, which were used for milk logistics in reverse direction before. Fakers mix and sell this quantity of wine with Hungarian wine having the same poor quality like the illegally imported one.

In our paper, we were looking for the answer, what degree of sensitivity could we detect cow's milk from wine using simple molecular methods.

Bovine mitochondrial DNA is the target molecule in our experiments. In cooperation with the National Food Chain Safety Office's Direction of Wine and Alcoholic Drinks, we examine clear wines from noted Hungarian producers, and also wines carried to Hungary in the mentioned tank trucks.

Using conventional PCR, we were able to detect the milk in 10x wine-dilution. Using real-time PCR we were able to detect milk in 1.000x wine-dilution. On the other hand, milk was detectable from 10.000x water-dilution, using both of our PCR methods. We found signs of bovine mitochondrial DNA content in factory-purified bovine casein and also in commercially available wines.

Our results suggest that the mitochondrial DNA is an indicator molecule of milk, and would be a good choice to detect species-specific milk content in some mixtures. Based on the measured DNA concentrations in the dilution series, we could conclude, that during the purification of wine, a significant portion of DNA got in the formed flaky precipitate. Real-time PCR is about 100 times more sensitive method for milk content detection from wine, than conventional PCR. Factory-purified bovine casein contains mitochondrial DNA. Mitochondrial DNA, detected in the commercially available wines arises from wine purification. Our method may contribute to detection of milk allergens in different foods.

10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Maróti-Agóts Ákos adjunktus úrnak, az iránymutatást, a sok közös munkát, a folyamatos lelkesítést, és rengeteg segítséget.

Köszönettel tartozom e tudományos diákköri dolgozat létrejöttéért az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet vezetőjének, Hullár István docens úrnak, az Állattenyésztési Osztály vezetőjének, Gáspárdy András docens úrnak, hogy bekapcsolódhattam az Osztályon folyó kutatásba. Köszönettel tartozom az Osztály többi munkatársának Legfőképpen Keindl Ágnesnek és Annus Kata doktornőnek a laboratóriumi segítségért.

Szeretném megköszönni Dr. Szita Gézának az élelmiszer-higiénia témakörében nyújtott segítségét valamint Forgách Petrának, a Járványtani és Mikrobiológiai tanszék adjunktusának aki labormunkákat segítette tanácsaival. Köszönöm Dr. Papp Tibornak, a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottság tagjának a gyors és készséges real-time PCR-hez nyújtott techinkai segítséget.

Sok köszönet illeti Barátossy Gábort, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Borászati és Alkoholos Italok Igazgatóságának igazgató helyettesét és Brózik Esztert, a Borászati és Alkoholos Italok Igazgatóságának munkatársát. Köszönöm nekik a dolgozat témáját, az élelmiszerlánc-biztonsággal és a borászattal kapcsolatos kérdésekben nyújtott segítséget.

Köszönöm Kerékgyártó Bencének, az Állattenyésztési osztályon tudományos diákköri munkát folytató bajtársamnak a közös munkát, és sok gyakorlati segítséget. Köszönöm Lengyel Péter és Németh Krisztián évfolyamtársaimnak és barátaimnak a korszakalkotó nyelvi gondolatokat, Mohácsi Péter Dániel barátomnak az informatikai háttérben nyújtott nélkülözhetetlen segítséget, Drozdík Attila tanár úrnak, borászattal is magas szinten foglalkozó, gimnáziumi kémia-mesteremnek a bortechnológiai kérdéseim készséges megválaszolását, valamint megtisztelő érdeklődését dolgozatom témája iránt. Köszönöm Aquinói Tamásnak, aki tiszta és logikus gondolkodásával segített a nehéz pillanatokban.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a türelmet és támogatást, ugyanis ezek nélkül dolgozatom nem jött volna létre.

11. Irodalomjegyzék

DEBROSSE S., PARIK S.: Neurologic disorders due to mitochondrial DNA mutations. *Seminars in Pediatric Neurology*, 2012. 19. 4. p. 194-202.

EPERJESI I., KÁLLAY M., MAGYAR I.: Borászat. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 1998

DEZSŐ P.: Kvantitatív PCR alkalmazása a gyógyszerkutatásban. Doktori értekezés, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki kar, 2007.

DOMBRÁNDI V. (szerk): Molekuláris biológiai módszerek. Debrecen, Debreceni Egyetemi Kiadó, 2012

DORAK M.T.(szerk): Real-time PCR. New York, Taylor & Francise group, 2006.

GUZSAL E.: Háziállatok szövettana. Budapest. Mezőgazdasági kiadó 1981.

HASHEMADZEL-CIGARI F., KHORVASH M., GHORBANI G.R., KADIVAR M., RIASI A., ZEBELI Q.: Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 2014. Published online. URL:

[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(14\)00688-2/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(14)00688-2/fulltext)

MÁRKUS GY.: Amit tudnom kell a beérkező nyerstej és tejszín átvételéről. (Elektronikus dokumentum) URL:

http://www.kepzesevolucioja.hu/dmdocuments/4ap/21_0513_tartalomelem_001_munkaanyag_100331.pdf, (Megtekintés dátuma: 2014. 10.02)

MOLNÁR N.: Tisztítás, fertőtlenítés mikrobiológiai aspektusai. (Elektronikus dokumentum) URL:

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:h8o2fqbyLzIJ:www.mtk.nyome.hu/~food/int-hu/mikro/segedletek/szoveg/IIlev/5.el%25F5ad%25E1s/tiszt%25EDt%25E1s.PPT+&cd=1&hl=hu&ct=clnk&gl=hu> (Megtekintés dátuma: 2014.10.02)

PICCINI R., MIARELLI M., FERRI B., TRIPALDI C., BELOTTI M., DAPRA V., ORLANDINI S., ZECCONI A.: Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. *The Journal of Dairy Research*, 2006. 73.2. 129-133

RADVANSZKY J., RESKO P., PALFFY R., BATOVA M.: Olvadásgörbe analízis a specifikus PCR végtermékek kiértékelésében. VMTDK dolgozat. Cornelius Egyetem, Természttudományi kar, Orvostudományi kar, Bratislava, Szlovákia 2006

RASKÓ, I.: Genetikai időutazás- Az emberi populációk eredetének nyomában Mindentudás Egyeteme 2004. IV. 68

REBOLLEDO-JARAMILLO B., SU M.S., STOLER N., MCELOHE J. A., DICKINS B., BLANKENBERG D., KORNELIUSSEN T.S., CHIAROMONTE F., NIELSEN R., HOLLAND M.M., PAUL I.M., NEKTUTENKO A., MAKOVA K. D.: Maternal effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceeding of the National academy of Sciences of the United States of America*, 2014 Published online. URL: <http://www.pnas.org/content/early/2014/10/08/1409328111.long>

RHÖLICH P.: Szövettan. Budapest, Semmelweis Kiadó 2006.

SHOUBRIDGE E.A., WAI T.: Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Current Topics in Developmental Biology*, 2007. 77. p. 87-111.

SIMON F., SZITA G., MERÉNYI I.: Tőgyegészség és tehéntejminőség. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 2000.

SOMLYAY I.: Gyakorlati borászat. Budapest, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, 2001.

TEN NAPEL J., HAAS Y., JOUNG G., LAM T.J.G.M., OUTWELTJES W., WINDING J.J.: Characterization soft distributions of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 2009. 92. 3. p. 1253-1264

SZEBERÉNYI J.: Molekuláris sejtbőlológia. Budapest-Pécs, Dialóg Campus Kiadó, 2011.

TÚRY E.: Az állatok sejtjei és szövetei I. Citológia, Budapest, A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft., 1990.

VÍGH H.B., KONDICS L.: Összehasonlító szövettan. Budapest, Tankönyvkiadó, 1984.

WUNDERLICH L.: Molekuláris biológiai technikák. Budapest, Typotex Kiadó 2014