

NÖVÉNYI DEHIDROGENÁZ-RENDSZEREK MÉRÉSE TRIFENILTETRAZOLIUMKLORIDDAL (TTC). I. AZ INKUBÁCIÓS IDŐ MEGVÁLASZTÁSA*

JÁMBOR BÉLA és DÉVAY MÁRTA

A légzésben fontos szerepet játszó dehidrogenázok aktivitásának gyors és egyszerű mérése az anyagcserevizsgálatok szempontjából lényeges segítséget jelent. Sok idevágó metodikai munka látott napvilágot, ezek legtöbbjét állati szövetek vizsgálatára dolgozták ki és növényi anyagokra nem mindig alkalmazhatók. E módszerek legtöbbje az alábbi három elv egyikét követi:

1. Az oxigénfogyasztás mérése a WARBURG-technikával.
2. A metilénkék elszíntelenedési idejének mérése (THUNBERG-módszer).
3. A próbához adott szubsztrát fogyasztásának analitikai követése.

A WARBURG-módszer költséges berendezést igényel és kivitele bonyolult, a THUNBERG-módszer aránylag egyszerű, de sok hibaforrással terhelt, a szubsztrátfogyás követése pedig hosszadalmas analitikai munkát igényel, ezért szériavizsgálatokra aligha felel meg. Ezen okok miatt az utóbbi években egyre több közlemény jelent meg a THUNBERG-módszer olyan változatát ajánlva, melyben indikátorként MK helyett tetrazoliumsók szerepelnek.

Jelen közlemény célja a TTC-vel való dehidrogenázaktivitás-mérési módszer kritikai vizsgálata, és az ennek kapcsán kapott eredményeink összefoglaló ismertetése. A tetrazoliiumvegyületek fentebb említett előnyei — s nem kis mértékben divatbajövetelük — miatt sok kutató foglalkozik a módszer kidolgozásával. E módszereket állati (1, 2, 3, 4, 8, 9, 15, 19, 21), növényi anyagokra (6, 12, 16, 18), valamint mikroorganizmusokra (5, 10, 11, 14) dolgozták ki. Az egyes módszerek között lényeges különbség van több szempontból: *a*) A vizsgálandó anyag inkubálása történhet szövet, illetve sejtszuspenzió alakjában (1, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 16, 17, 19), vagy homogénálva (1, 6, 8, 9, 15, 18, 19, 21). Néha a homogenizátumból készült kivonatot vagy tiszta mitokondrium preparátumot használnak. *b*) Indikátorként leginkább a TTC van elterjedve, más tetrazoliumsó hatásáról csak kevés kutató számol be (4, 6, 9, 15). *c*) Az eredményeket általában kvantitatív alakban adják meg (extinkció, gamma-formazán), néha csak keresztekkel jelzett félkvantitatív adatokkal is megelégszenek (1, 16, 17). *d*) Az inkubációs idő 5 perc és 4 óra

* A Magyar Biológiai Társaság I. Vándorgyűlésén elhangzott előadás.

között változik, teljesen függetlenül attól, hogy milyen anyagot vizsgálnak.

e) Az eredmények általában a szubsztrátos és a hozzáadott szubsztrát nélkül kapott kontroll értékek különbségeiből adódnak, egyes kutatók azonban az endogén szubsztrát esetleges jelenlétével sem törődnek (3, 10, 11, 12, 19). Ez utóbbi eljárást leginkább azzal indokolják, hogy az általuk vizsgált objektum nem tartalmazott endogén szubsztrátot. f) Egyes szerzők csak az „összdehidrogenázaktivitás” mint valamely szummáris mutató megállapítását tűzték ki célul (1, 3, 10, 11, 12), ezek közül két kutató (3, 12) semmiféle szubsztrátot nem ad a rendszerhez, mások (4, 5, 6, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21) különféle szubsztrátokkal kapott értékeket kontroll nélkül használva tekintik a megfelelő dehidrogenázok aktivitásának. Ezek közül a legtöbben csak 1—1 dehidrogenázra korlátozták vizsgálataikat. A legtöbb kutató a borostyánkősavdehidrogenáz meghatározását dolgozta ki (4, 6, 8, 15, 16, 17, 18, 21). Többféle dehidrogenáz egymás melletti mérésére is találunk utalásokat (5, 9, 15, 18). g) A módszereket kidolgozó szerzők legtöbbször egyes kísérleti feltételeknek a végeredményre gyakorolt hatását vizsgálta. Így nyomkövették a reakciók időbeli lefutását (4, 9, 14, 15, 18, 19), az enzim mennyiség (4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 19, 21), a levegő jelenlétének (9, 12, 15, 21), az infiltrációnak (12, 17), az indikátor koncentrációjának (9, 10, 11, 12, 18) és az alkalmazott puffer minőségének (11, 17) hatását. h) A TTC-vel kapott eredményeket más H-acceptorok mérési adataival is összehasonlították (6, 9, 18, 21), valamint egyes esetekben megállapították a tetrazoliumvegyületek gátló hatását is (9, 12). i) A tetrazoliumos módszert szemben a MK módszerrel „aerób” módszernek tekintik és az inkubálást minden esetben levegő jelenlétében végzik, csak egyesek (6, 9, 12, 15, 21) ajánlják az anaerób körülményeket. Az aerób inkubálás azonban igen helytelen, mert lehetőséget ad a terminális oxidáz-rendszerek működésére és ezáltal a dehidrogenázok által szállított hidrogénért a TTC-vel való versengésre, mely tény meghamisíthatja a mérési eredményeket. Az aerób inkubálás kizárólag anaerób légzéstípusú biológiai objektum esetén jogosult. A legtöbb esetben az aerób módon végzett inkubálás az eredményt felére, harmadára csökkentheti (12, 15, 21).

Az ismertetett, és az eddig megjelent módszertani munkák — véleményünk szerint — nem tisztázták megnyugtatóan az alábbi kérdéseket: 1. A sok endogén szubsztrátot tartalmazó objektum esetében nem vették figyelembe megfelelő módon az endogén szubsztrát jelenléte okozta dehidrogenázaktivitás értékét: még egy tetszés szerinti inkubálási idő után kapott kontrollérték levonása sem biztosítja a megfelelő eredményt.

2. Nem tanulmányozták eléggé az inkubációs oldatnak az ép szövetekbe való bejutását. Amint arról már más helyen beszámoltunk (7), kb. 6 órai inkubálás szükséges ahhoz, hogy az inkubáló folyadék az 1—2 mm-es szövetdarabokba behatoljon. Így az általában szokásos rövid, 1—2 órás inkubáció esetében az oldat penetrációja korlátozó tényezőként befolyásolja az eredményt.

3. Nem hasonlították össze növények esetében megfelelő módon az ép szövetek és homogenált anyag aktivitását, annak eldöntésére, hogy a meghatározás mennyire használható homogenált anyagban.

4. Növényi anyagokban a kísérleti feltételek hatását amúgy is csak kevesen tanulmányozták és azok is csak mozaikszerűen, egyes kérdésekre szorítkoztak (6, 12, 18), vagy pedig csak félkvantitatív eredményeket közöltek (16, 17).

Az említett kérdések tisztázásával azt kívántuk elérni, hogy módszert javasolhassunk a különböző növényi dehidrogenázok egymás melletti meghatározásához, mely gyors, pontos és szériavizsgálatokra alkalmas.

Kísérleti rész

1. *A kísérletekhez felhasznált anyagok* : A mérésekhez felhasznált vegyszerek p. a. minőségűek voltak.

Kísérleti objektumként Express-borsó (*Pisum sativum*, var. express) 3 napos csíranövénykéinek a gyökérsúcstól számított 3–8 mm közötti darabkája szolgált. A csíráztatás sötétben, 27 C°-on történt. A csírázás egyenletessé tételére a maghéjat 6 órás duzzasztás után eltávolítottuk. A felhasználásra kerülő 5 mm-es gyökérdarabkákat külön e célra szerkesztett készülékkel vágtuk le oly módon, hogy először eltávolították a gyökerek első 3 mm-es darabkáját és ezután vágtuk a kísérletek alapjául szolgáló gyökérdarabkákat. Kísérleteink egy részét ugyanezekből a gyökérdarabkákból nyert homogenizátummal végeztük. A homogenizálás finom kvarehomokkal, porcellánmozsárban történt. Összehasonlítául egyes esetekben boltból vásárolt (különböző minőségű) pékélesztőt is használtunk.

2. *Módszerek* :

a) Ép szövetek, illetve sejtek vizsgálata esetén a vizsgálati anyagból 100 mg-ot lemértünk és egy, a következő inkubáló oldatot tartalmazó kémcsőbe tettük :

2 ml 0,20 M foszfát vagy veronál-acetát puffer, pH = 7,5

0,5 ml 0,1 M szubsztrát, pH = 7,5-ig semlegesítve

0,5 ml 0,01 M TTC

2,0 ml desztillált víz

Gyökérdarabok vizsgálata esetén a baktériumos fertőzés lehetőségének csökkentésére azokat a meghatározások előtt 20 percig folyóvízben mostuk.

A kémcsöveket ezután (rendszerint 40–50 db-ot egyszerre) vakuumexikátorba helyeztük. Az inkubálófolyadékunk a szövetekbe való hatolását háromszoros infiltrációval könnyítettük meg. A harmadik evakuálás után az exikátort N₂ gázzal töltöttük fel. A nitrogénnel töltött exikátort 37 C°-os termosztátba helyeztük fénymentes körülmények közé. A 15 óra inkubációs

idő leteltével a kémcsövekben levő oldathoz 10 ml frissen desztillált acetont adtunk és bedugaszolás után, sötétben kb 24 órát állni hagytuk. Ez alatt az idő alatt a szövetekből a keletkezett formazán teljesen kioldódik. Az oldat tisztájában a formazán mennyiségét S_{50} -es szűrővel Pulfrich-féle fotométerrel határoztuk meg. Az értékelés tiszta formazánnal készült standardgörbe alapján történt.

Kontrollként hasonló körülmények között végzett, de külön szubsztrát hozzáadása nélkül készült próba szolgált.

b) Ha a vizsgálatokat homogenizátummal kívántuk végezni, úgy a vizsgálati anyagot finom kvarchomokkal dörzsöltük el híg pufferben. A továbbiakban ugyanúgy járunk el, mint ép szövetdarabok használata esetén, azzal a különbséggel, hogy inkubációs időként maximálisan 6 órát alkalmazunk.

Meg kell jegyeznünk, hogy a fenti módszerünk tulajdonképpen nem maga a kiindulási eljárás volt, hanem éppen ellenkezőleg, kísérleti munkánk során alakult ki. Az áttekinthetőség és a rövideg kedvéért a továbbiakban már csak azokat a kísérleteinket említjük, melyek már a kidolgozott módszer kritikai értékelését szolgálták. A grafikonokon és táblázatokon feltüntetett eredmények általában 4—5 paralell mérés átlagai. A megfigyelt jelenségek reprodukálhatóságát többszörös ismétléssel ellenőriztük. Az ismétlések során csak az adatok abszolút értéke változott, a görbék tendenciája, a megfigyelt törvényszerűségek minden esetben jól reprodukálhatók voltak.

3. *Az inkubációs idő hatása:* E kérdés tanulmányozására végzett kísérleteinket az 1. ábra foglalja össze. Jól látható, hogy az ép és homogenizált anyag redukációs görbéjének időbeli lefutása egymástól nagy mértékben eltér.

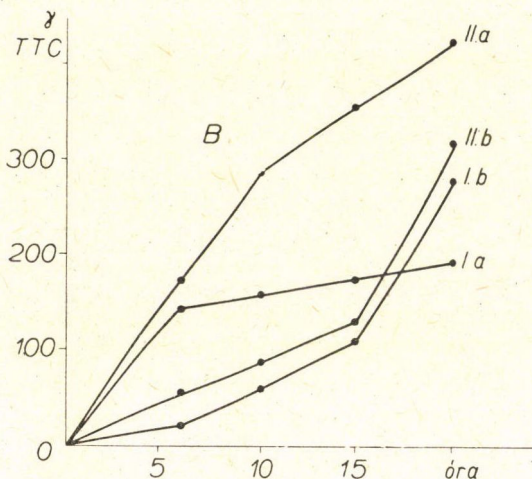
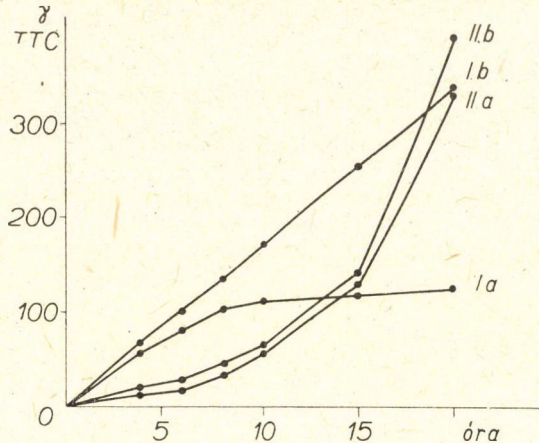
A szubsztrát hozzáadása nélkül ép szövetdarabokkal végzett kísérletekben a redukció időgörbéje az inkubáció 10-ik órája után ellaposodik, sőt csaknem vízszintessé lesz. Ez a jelenség arra utal, hogy az endogén szubsztrátok valószínűleg ennyi idő alatt kifognak. Ezt a lehetőséget bizonyítja az is, hogy szubsztrát hozzáadása esetén a görbe csaknem egyenesen folytatódik tovább és csak 15—20 óra után kezd ellaposodni (élesztőnél). Ez utóbbi ellaposodásnak többféle oka lehet: 1. A hozzáadott szubsztrát kifogyása; 2. TTC kifogyása; 3. Csökken a dehidrogenáz aktivitás. 4. A felhalmozódott oxidációs termékek gátolják a további enzimműködést. 5. A kiváló formazán gátolja további TTC mennyiségeknek a redukció helyére való jutását. Legvalószínűbbnek az utolsó feltételezés látszik, egyértelműen Lindenmann (11) megállapításával. A keletkezett formazán mennyiségéből könnyen lehet következtetni arra, hogy minden valószínűség szerint sem a szubsztrát, sem pedig a TTC nem fogyhatott ki, illetve nem korlátozó tényező. Az enzimaktivitás csökkenése sem valószínű, tekintettel arra, hogy tapasztalataink szerint ellaposodás csak nagy enzimaktivitás esetén fordul elő, amikor tehát sok formazán válik ki a sejtekben.

Az ábrán az is látható, hogy a görbék lefutása élesztő és borsógyökér (tehát két teljesen eltérő biológiai objektum) esetében rendkívül hasonló. Ép szövetek, illetve sejtek használata esetén a szubsztrátok hozzáadása mindkét esetben 5—6 órai inkubálás után kezd észrevehetővé válni. Ez egyben azt is jelenti, hogy ennél rövidebb inkubációs időt nem érdemes alkalmazni, mivel a szubsztrátos és kontrollmérés eltérése olyan kicsi, hogy az eredmény pontatlanná válik. Ennél rövidebb idő alatt az inkubációs oldat nem képes a szövetek belsejét telíteni (7). Az időgörbék elemzése alapján megállapítható, hogy pontos eredmények elérésére inkubációs időként minden esetben olyan időt kell választanunk, mikor a szubsztrát nélkül felvett kontrollgörbe már csaknem vízszintes, és viszonylag nagy különbség mutatható ki a kontrollgörbe és a szubsztrát jelenlétében felvett időgörbe között. Ez az idő jelen esetben 10 óra után, 15 órás inkubációnál mutatkozik. Nyilvánvaló, hogy a helyes aktivitásértéket úgy kaphatjuk meg, ha a kívánt szubsztráttal és anélkül felvett időgörbe 10 óra utáni szakaszai közötti szög tangensét tekintjük az aktivitás kifejezőjének. Nem követünk el nagy hibát, ha ehelyett egy bizonyos időpontban, pl. 15 órában kapott két érték különbségét tekintjük az aktivitás mértékének, ui. ez arányos a fent említett szög tangensével. Ez az eljárás azonban csak akkor jogosult, ha az összes vizsgálati anyagok azonos endogén szubsztrát tartalommal rendelkeznek. Ha a vizsgálandó anyagban az átlagosnál lényegesen több vagy kevesebb endogén szubsztrát-tartalom van, a számított eredmények annál hibásabbak lesznek, minél távolabb van a két görbe metszéspontja az 5—10 órától. Új, eddig nem tanulmányozott anyag esetében ezért ajánlatos az időgörbék lefutását, a pontos inkubációs idő megállapítása miatt felvenni. Erre csak akkor van szükség, ha a különböző endogén szubsztráttartalmú anyagokon mért aktivitás értékeket egymással is össze akarjuk hasonlítani. Természetes, hogy az endogén szubsztráttartalom kisebbfokú eltérése, továbbá a hozzáadott szubsztrát mellett felvett időgörbe említett ellaposodása kétségtelenül befolyásolják az eredményt. Ez a hiba viszont elenyésző kicsi ahhoz képest, amit abban az esetben követünk el, ha az endogén szubsztrát elfogyásánál rövidebb inkubációs időt alkalmazunk. Az 1. ábrán világosan látható, hogy rövid (pl. 2 órás) inkubáció esetén a szubsztrát hozzáadásával kapott érték és a kontroll érték között nincs különbség, ami alapján esetleg arra a helytelen következtetésre juthatnánk, hogy a vizsgált anyagnak nincs dehidrogenáz aktivitása.

Meg kell még jegyeznünk, hogy kísérleteinkben nem csak egy, hanem egyszerre két szubsztrátot is alkalmaztunk. Ezt azzal a megfontolással tettük, hogy lehetőleg a maximális formazánképződést kapjuk, s így a mutatózó törvényszerűségek még szembetűnőbbek legyenek.

Az 1. ábrából még az is megállapítható, hogy homogenált objektum használata esetén a görbék lefutása lényegesen megváltozik: 1. A dehidrogenáz-aktivitás az inkubáció kezdetén csak tört része annak, ami ép szöveteknél

mutatkozik. 2. A görbék lefutása exponenciális jellegű, még hozzáadott szubsztrát jelenlétében is. 3. Szubsztrát hozzáadására csak az inkubáció első pár órájában mutatkozik többlet a formazánképződésben, a további inkubáció során a két görbe párhuzamosan fut. Az előbbieket tekintetében ismételt

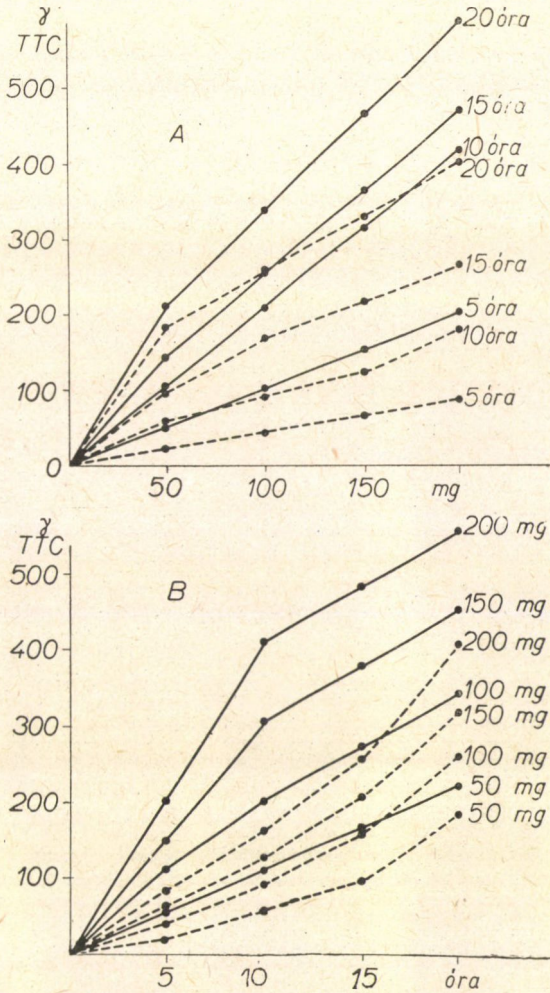


I. ábra. Az inkubációs idő hatása. 200 mg borsógyökér (A), illetőleg élesztő (B), ép (a), és homogenizált állapotban (b). A görbéket szubsztrát (I) jelenlétében és szubsztrát hozzáadás nélkül (II) is felvettük. Szubsztrátként 10^{-2} M glutaminsav és 10^{-2} M borostyánkősav keverékét használtuk. Abszcissa: inkubációs idő órákban, ordinata a redukált TTC mennyisége 200—200 mg anyagban

azonosan viselkedik az élesztő és a borsógyökér. A homogenizátumok ilyen különleges viselkedésére más helyen térünk ki.

4. A baktériumos fertőzés hatása. Az előzőekben megállapítottuk, hogy kb. 15 órás inkubáció szükséges ahhoz, hogy valamennyire is reális és helyes

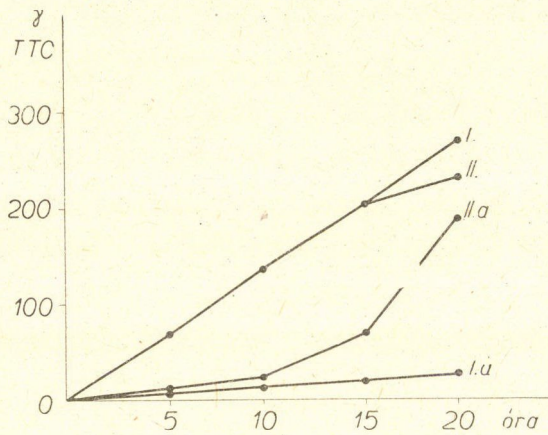
értéket kapjunk. Ez a hosszú inkubációs idő azonban felveti a baktériumos fertőzés kérdését, ez viszont — a mikroorganizmusok közismerten nagy dehidrogenázaktivitása miatt — a mérés eredményét erősen meghamisítja. A mikroorganizmusok nagyfokú elszaporodásától annál is inkább lehet tar-



2. ábra. A baktériumos fertőzés hatása az időgörbe lefutására. Különböző mennyiségű, nem sterilen kezelt borsógyökér különböző ideig tartó inkubációja alatt a gyökérben (folytonos vonal), és az oldatban (szaggatott vonal) keletkezett formazán mennyisége gammákban. Abszcissa: inkubátum mennyisége mg-ban (A) és az inkubációs idő órában (B), ordinata: a keletkezett formazán mennyisége gammában

tani, mert az inkubálás körülményei (hőfok, pH, szubsztrátok) rendkívül kedvezőek. Ezért lehetőleg baktériummentes inkubációs körülményekre kell törekednünk. Ez utóbbit két módon érhetjük el: 1. A baktériumok szaporodását gátló vegyületek hozzáadásával az inkubáló elegyhez. Tekintettel arra,

hogy az ilyen anyagok rendszerint az enzimműködés gátlásával hatnak, ezt a módot el kellett vetnünk, nehogy a hozzáadott baktérioszztatikus anyag mérési eredményeinket meghamisítsa. 2. A második út lényegesen járhatóbbnak mutatkozott, vagyis az, hogy a baktériumszámot már a kiindulásnál a lehető legminimálisabbra csökkentjük. Ezt úgy oldottuk meg, hogy a vizsgálandó szövetdarabokat inkubálás előtt 20 percig folyóvízben mostuk, a szubsztrátot, puffert és desztillált vizet pedig hővel sterilizáltuk. Ha a gyökérdarabok előzetes mosását elhagytuk, a gyökérdarabok között már az inkubáció első óráiban piros felhő jelent meg, jelezve a nagymértékben szaporodó baktériumok jelenlétét. A felhő egyre nagyobbodott, míg 10–15 órás inkubáció után a teljes oldat intenzív piros lett. Először arra gondoltunk, hogy ez



3. ábra. Az objektum előkezelésének hatása (sterilizálás) az időgörbe alakulására. 100 mg borsógyökér a szövegben említett előkezeléssel (I) és előkezelés nélkül (II). Inkubálva 10^{-2} M succinát jelenlétében. Ia és IIa az oldatban keletkezett formazán mennyiségét jelzi

valami módon, a szövetekből az oldatba kijutó enzim működésének eredménye, vagy esetleg a szövetek felületéről kerül az oldatba. A kezdetben mosás nélkül felhasznált gyökereknél az eredmények nagy szórása a kérdés behatóbb vizsgálatát tette szükségessé. Hogy a baktériumok szaporodását jobban elősegítsük, a továbbiakban az inkubálást aerób körülmények között végeztük.

Először, a helyzet áttekintése céljából különböző mennyiségű borsógyökér inkubálása mellett mértük az endogén és exogén formazán mennyiségét. Ezekben a vizsgálatokban minden előzetes tisztasági rendszabályt mellőztünk, tehát a gyökérdarabokat nem mostuk és az oldatokat nem sterilizáltuk. Az eredményeket a 2. ábra mutatja a bemért mennyiség (A) és az inkubációs idő (B) függvényében. A 3. ábrán viszont a félsterilen, illetve anélkül végzett párhuzamos kísérlet eredménye látható. Az ábrákból igen szembetűnő, hogy a baktériumok elszaporodása folytán az inkubáció 20-ik órájában az oldat formazántartalma csaknem eléri a gyökerekét. A félsterilen

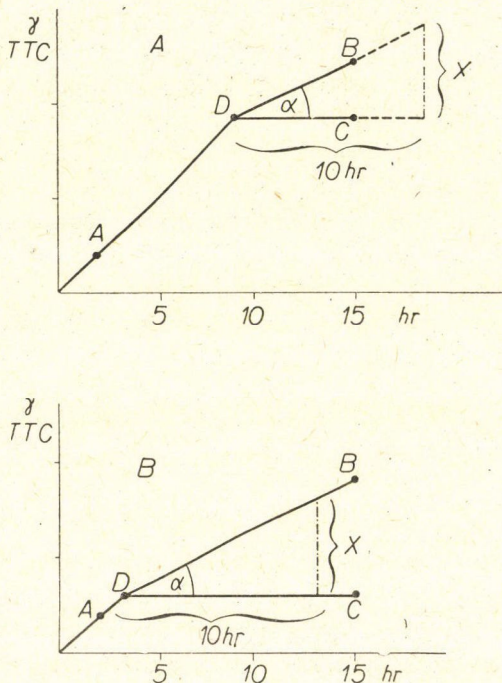
végzett kísérletekben viszont az oldat formazánkoncentrációja a gyökérének csak mintegy 12%-a. Javasolt, aránylag egyszerű rendszabályaink tehát biztosítják a baktériumos fertőzés elkerülését, olyan mértékben, hogy az a mérés végeredményét már számbavehetően nem befolyásolja. Az ábrákból az is könnyen megállapítható, hogy a baktériumok jelenléte nemcsak az exogén formazán képzésével okoz zavart, hanem azzal is, hogy a vizsgált szövetdarabok felületére tapadva gátolják a TTC-nek a szövetekbe való bejutását. Ennek következtében aztán mind az enzimmennyiség, mind pedig az időfüggvényként felvett görbék a szabályos egyenes lefutás helyett ellaposodnak. Ez az ellaposodás a mennyiségi görbéknél azt eredményezi, hogy a felvett görbe nem a O pontban metszi az ordinátát, hanem feljebb, azt a benyomást keltve, hogy a keletkezett formazán mennyisége nemcsak egyedül a bemért anyag mennyiségétől függ, hanem még egy másik tényezőtől is, mely az egész görbét „feljebb” tolja. Az időgörbéknél, mint említettük a TTC behatolásának gátoltsága okozza az ellaposodást. Mindkét zavaró jelenség elmarad, ha félszterilen dolgozunk, mint ahogy azt már az előbbieken is kifejtettük. Érdekes még megjegyezni, hogy az oldat (exogén) formazántartalmának változása a baktériumok ismert szaporodási görbéjével analóg lefutású. Ez a jelenség különösen a 3-ik ábrán látható jól. A kb. 10 óráig tartó lag-fázis után a formazánképződés görbéje is átmegy a logaritmikus szakaszba.

Mindezek alapján tehát bizonyítottnak vehetjük, hogy az említett zavarok, melyeket a baktériumok okoznak, előírásunk szerint eljárva, elkerülhetők.

A kísérleti eredmények értékelése

Munkánk során felmerült annak szükségessége, hogy többféle dehidrogenáz aktivitásának egyidejű meghatározására alkalmas módszert dolgozzunk ki, illetőleg növényi anyagokra tegyünk alkalmazhatóvá. A dehidrogenázaktivitás meghatározása TTC-vel eddig csak főleg állati szövet-homogenizátumokra, illetőleg baktériumszuszpenziókra volt kidolgozva. A módszer alapos kritikai vizsgálatát sem végezték el. Az eddig ismertetett módszerek elhanyagolják az endogén szubsztrátok jelenlétét. Módszerünk az eddig leírtakkal szemben lehetővé teszi különböző dehidrogenázok egymás melletti meghatározását szériavizsgálatokra alkalmas gyorsasággal. Kiküszöböli az endogén szubsztrát által okozott és az eddigi irodalomban kellően nem méltányolt hatását a hosszú inkubációs idő útján. Az endogén szubsztrát okozta zavaró hatást azonban nem küszöbölhetjük ki teljesen azáltal, ha a leírt módszer szerint 15 órás inkubáció végén meghatározzuk a szubsztrátos és kontrollminta formazántartalmát s a kettő különbségét tekintjük az aktivitás mértékének. Ez az eljárás mód csak akkor alkalmazható, ha biztosak vagyunk abban, hogy az összehasonlítandó objektumok endogén szubsztráttartalma közel azonos. Ha ezt a hibalehetőséget is ki akarjuk küszöbölni, vizsgálati

anyagoként teljes időgörbét kell felvennünk, hogy a két görbének (szubsztrátos és kontroll) egymással, illetve a kontroll vízszintes részével alkotott szöveget, és annak iránytangensét megállapíthassuk. Gyakorlatilag elegendő lényegében három érték meghatározása, melyek segítségével megszerkeszt-hetjük a két időgörbe megközelítő lefutását (4. ábra). A két időgörbe, ahogy azt az 1. ábrán is láthattuk, lényegileg három részből áll. A szubsztrátos és a kontroll görbe az endogén szubsztrát elfogyásáig együtt fut, ezután a kontroll csaknem vízszintes lesz, a szubsztrátos pedig az enzim aktivitásának megfelelően



4. ábra. Az időgörbék sematikus megszerkesztése három érték alapján. (A) sok, (B) kevés endogén szubsztrát tartalom esetén

különböző hajlásszögű. Az egyenesek megszerkesztéséhez három érték elegendő. Az A pont rövid inkubáció után meghatározott kontrollérték, a görbének még abban a szakaszában, mikor az endogén szubsztrát nem fogyott ki (a kontroll és szubsztrátos görbe értéke itt még csaknem azonos), B pont a 15 órás inkubációval kapott szubsztrátos érték, a C pedig ugyanebben az időben mért kontrollérték. E három pont birtokában a szerkesztés úgy történik, hogy a koordináta-rendszer O pontjából az A ponton keresztül húzott egyenes és a C ponton keresztül húzott, az X tengellyel párhuzamos vízszintes metszéspontjában levő D pont lesz a két görbe elválási pontja, melynek

abszcissza értéke az endogén szubsztrát kifogyásának idejét jelzi. Mivel az a pont sok endogén szubsztrát esetén pl. 9 órára esik, kevésnél pedig pl. 3 órára, világos, hogy az inkubáció 15-ik órájában mért értékek mást és mást jelentenek, holott a dehidrogenázaktivitás esetleg egyenlő lehet, mint az a példaképpen megszerkesztett ábrán is látható. Ezért a továbbiakban egységesen úgy járunk el, hogy az aktivitás mértékének a két görbe szétválása után a 10. órában talált különbséget tekintjük (x), mely így arányos lesz az α -szög tangensével.

Az a körülmény, hogy a kontroll görbéje az endogén szubsztrát kifogyása után nem teljesen vízszintes, a szerkesztéssel kapott eredményt alig befolyásolja.

A meghatározási módszert tehát aszerint választjuk meg, hogy a vizsgálandó probléma milyen pontosságot igényel. A legtöbb esetben több 100%-os aktivitáskülönbség megállapításáról van szó. Ez esetben kielégítő a munkánk elején leírt, két érték felvételén alapuló standard módszer. Ha nagyobb pontosság szükséges, illetve kisebb különbségeket kívánunk kimutatni, akkor esetleg a teljes időgörbék felvételére kell törekednünk. Ha pedig a TTC behatolás és a szubsztrát továbboxidálódásának egyelőre ismeretlen mértékű hatását is el akarjuk kerülni, akkor a lényegesen körülményesebb szubsztrátfogyás meghatározó analitikai módszerekhez kell folyamodnunk.

Meg kell még jegyeznünk, hogy a dolgozatban közöltek csak egy részét képezik módszertani vizsgálatainknak. Más kísérleti tényezők, így pl. a szubsztrát koncentrációjának, TTC koncentrációjának, az enzim mennyiségének hatása és az additivitás kérdése további dolgozat tárgyát képezi.

Összefoglalás

Vizsgálatokat végeztünk azoknak a kísérleti feltételeknek megállapítására, melyek mellett sok endogén szubsztráttartalmú növényi anyagban különböző dehidrogenázok aktivitása egymás mellett kielégítő pontossággal meghatározható. Vizsgálataink eredményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze :

1. A vizsgálandó anyag homogenálása az aktivitás-értékek nagyfokú csökkenését eredményezi s azonfelül az időgörbe lefutása és a szubsztrát hozzáadásának hatása tekintetében is nehézségek merültek fel, ezért a meghatározást ép szövettel, ill. sejtekkel célszerű végezni.

2. Sok endogén szubsztrátot tartalmazó növényi szövetek esetében a szubsztrát hatására és a kontrollként felvett szubsztrátnélküli reakció időgörbe első szakasza egymást fedi, tehát inkubációs időként néhány óra nem alkalmas.

3. A szubsztrát nélkül felvett görbe egy bizonyos inkubációs idő után ép szövetek használata esetén lelapul, valószínűleg az endogén szubsztrátok kifogyása következtében. A szubsztrát hozzáadása esetén felvett görbe

emelkedése tovább tart. A két görbe egymással alkotott szögének tangense arányos a vizsgált enzim aktivitásával.

4. A hosszú inkubációs idő alkalmazása esetén fellépő, a baktériumok szaporodása okozta hibalehetőség nagyrészt elkerülhető, ha a kiindulási baktériumszámot a kísérleti objektum alapos mosásával és az oldatok előzetes sterilizálásával a lehető legkisebbre csökkentjük.

5. Végezetül sémát közöltünk a különböző endogén szubsztrátartalommal rendelkező kísérleti objektumok esetében történő aktivitásmérések gyors elvégzésére és az eredmények értékelésére.

IRODALOM

1. BODIN J. H., LU K. H. and WEST L. W. : Reduction of triphenyltetrazolium chloride by mitotically active and blocked embryonic cells. *Biol. Bull.* 102. 16—21 (1952).
2. CASTELLANI A. : L'impiego dell'etanolo e del formazano nella determinazione della succinoidrogenasi sicondo Kun a Abood nei tessuti animali. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 30. 450—451 (1954).
3. CHIARIONI T. et FIACCADORI F. : Sulla dimostrazione quantitative dell'attivata deidrasica dei tessuti con il cloruro di trifetil-tetrazolo. *Arch. Sc. Biol. (Bologna)*, 38. 33—46 (1954).
5. FAHMY A. R. and WALSH E. O'F. : The quantitative determination of dehydrogenase activity in cell suspensions. *Biochem. J.* 51. 55—56 (1952).
4. DEFENDI V. and PEARSON B. : Quantitative estimation of succinic dehydrogenase activity in single microscopical tissue section. *J. Histochem. Cytochem.* 3. 61—69 (1955).
6. GLOCK E. and JENSEN C. O. : The colorimetric determination of plant succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 201. 271—278 (1953).
7. JÁMBOR B., ROBERTS L. W. és DÉVAY M. : Kísérleti feltételek hatása növényi szövetek TTC felvételére és redukciójára. Előadás. *Biol. Társaság.* 1957.
8. KUN E. and ABOOD L. G. : Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Science.* 109. 144—145 (1949).
9. LAGNADO J. R. and SOURKES T. L. : The enzymatic reduction of tetrazolium salts by amines. *Canad. J. Biochem. Biophys.* 34. 1095—1106. (1956).
10. LENHARD G. : Die Dehydrogenaseaktivität des Bodens als Mass für die Mikroorganismen-tätigkeit im Boden. *Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk.* 73. 1—11 (1956).
11. LINDENMANN J. : Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid zur Messung der Dehydrogenaseaktivität von *E. coli*. *Z. Path. Bact.* 17. 311—320 (1954).
12. MARRÉ E. et ARRIGONI O. : Determinazione „in vivo” dell'attivata deidrogenasica mediante la tecnica al tetrazolio. *Nuovo J. Bot. Ital.* 61. 21—28 (1954).
13. PRICE C. A. and THIMANN K. V. : The estimation of dehydrogenases in plant tissue. *Plant Physiol.* 29. 113—124 (1954).
14. REINER J. M. : The induction of gluconocinase in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 70. 224—232 (1955).
15. RUTENBURG A. M., GOFSTEIN R. and SELIGMAN A. N. : Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 10. 113—121 (1950).
16. SATO S. : The histochemical detection of succinic dehydrogenase with 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride. *Bot. Mag. Tokyo.* 66. 277—285 (1953).
17. SATO S. : A supplemental report on the reduction of TTC by plant embryo slices. *Bot. Mag. Tokyo.* 68. 315—319 (1955).
18. SMITH F. G. : The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Plant Physiol.* 27. 445—456 (1952).
19. SPRINZ H. and WALDSCHMIDT—LEITZ E. : Über die Aktivität von Bersteinsäuredehydrase und Katalase der Leber nach der Einführung von Lebergiften. *Z. Physiol. Chem.* 293. 16—32 (1953).
20. SUMNER J. B. and MYRBÄCK K. : The Enzymes, II. part. 1. *Acad. Press. New-York.* 1951.
21. ZÖLLNER N. und ROTHEMUND E. : Beobachtungen über die Messung der Aktivität der Bernsteinsäuredehydrase. *Z. Physiol. Chem.* 298. 97—109 (1954).

A NÖVÉNYI DEHIDROGENÁZOK AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE TRIFENILTETRAZÓLIUMKLORIDDAL (TTC) II. A TTC SZUBSZTRÁT ÉS ENZIM KONCENTRÁCIÓ- JÁNAK HATÁSA*

JÁMBOR BÉLA és DÉVAY MÁRTA

Előző közleményünkben (3) az inkubációs idő, és a baktériumos fertőzés befolyásával, ill. az e tekintetben követendő eljárással foglalkoztunk módszerünkkel kapcsolatban. Megállapítottuk, hogy az endogén szubsztrátok jelenléte a kapott eredményt a szokásos rövid inkubációs idő alkalmazása esetén meghamisítja s ezért sokkal hosszabb, 15 órás inkubálás szükséges, hogy addigra az endogén szubsztrátok elfogyjanak. Minthogy ilyen hosszú inkubálás viszont baktériumos elszaporodást okozhat, ennek a kérdésnek vizsgálatát is elvégeztük és megadtuk ezen zavar kiküszöbölésének módját. Végül pedig azt találtuk, hogy a vizsgálandó anyag homogenizálása további bonyodalmakat okoz s ezért a meghatározásnak ép sejtsztruktúrájú anyagban való kivitelezését tartjuk megfelelőnek. Ezúttal egyéb kísérleti feltételek hatásával, ill. azok helyes megválasztásával kívánunk foglalkozni.

Kísérleti rész

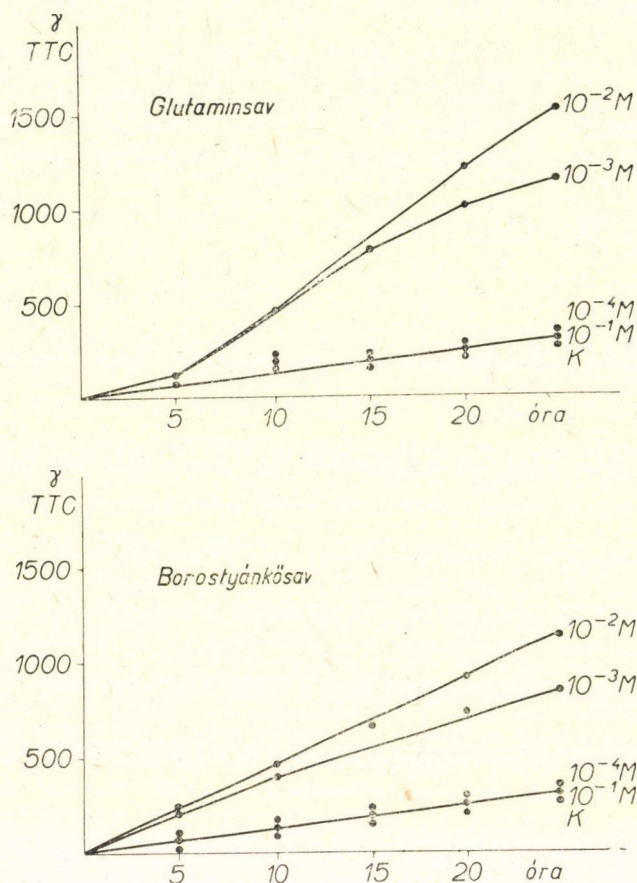
1. *Anyagok és módszerek* az előző közleményünkben leírtakkal (3) nagyjából azonosak voltak. Az ott megadott standard módszert a feltételek változásának az eredményre gyakorolt hatását kiderítendő, ezúttal is esetről esetre a célnak megfelelően variáltuk.

2. *A szubsztrát koncentráció hatása*

Egyik előző közleményünkben kimutattuk (4), hogy a magasabb szubsztrát koncentrációk gátolják a borsógyökereknél a behatolt TTC redukcióját, magára a behatolásra azonban nincsenek hatással. A kérdést az aktivitás-meghatározási módszer szempontjából szükségesnek látszott behatóbban megvizsgálni. Vizsgálataink az előző közleményben tárgyalt (4) borostyánkősav mellett glutaminsavra is kiterjedtek, továbbá változtattuk az inkubációs idő hosszát is. A kapott eredményeinket az 1. és 2. ábra foglalja össze. Látható, hogy mindkét objektum és mindkét vizsgált szubsztrát esetében a 10^{-2} M

* A Magyar Biológiai Társaság I. Vándorgyűlésén elhangzott előadás.

koncentráció mutatkozott a legmegfelelőbbnek. Ennél magasabb koncentrációknál kifejezett gátlóhatás lép fel. Az alacsonyabb koncentrációk pedig (pl. 10^{-4} M) igen gyorsan elhasználódnak és ezzel a reakciósebesség erős csökkenését idézik elő hosszabb inkubáció esetén.

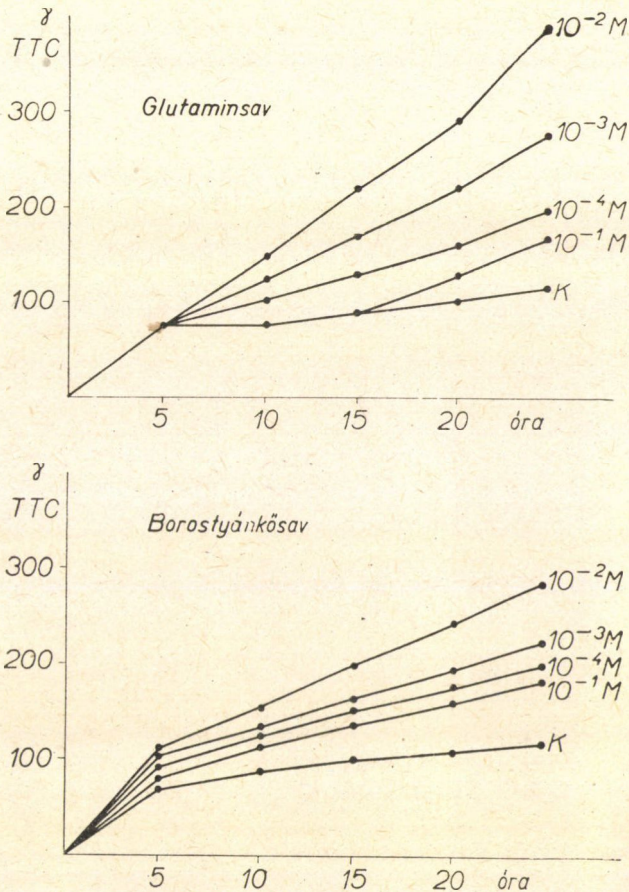


I. ábra. 100 mg borsógyökér által redukált TTC mennyisége különböző glutaminsav, illetve borostyánkősav koncentrációk esetében. x tengely: óra, y tengely: gamma TTC

3. A TTC koncentrációjának hatása

Amint a 3. ábra mutatja a formazán képződés a külső oldat TTC koncentrációjával logaritmikus összefüggést mutat a vizsgált koncentrációhatárok között. Ez várakozásunknak nem felel meg, mivel a reakciókinetika törvényei szerint magával a TTC koncentrációval és nem annak logaritmusával kellene egyenes aránynak mutatkoznia. Ez az eltérés véleményünk szerint onnan eredhet, hogy a redukciónál nemcsak egyszerű kémiai reakcióról lehet

szó, hanem végeredményben a behatolás és esetleg egyéb, még eddig nem ismert tényezőknek is fontos szerepük lehet. Ezek közül a tényezők közül figyelmet érdemel a TTC toxicitása, mely esetleg a koncentrációtól függően gátolhatja magát a formazán képződést is (6). Főleg ez a körülmény, meg a TTC viszony-

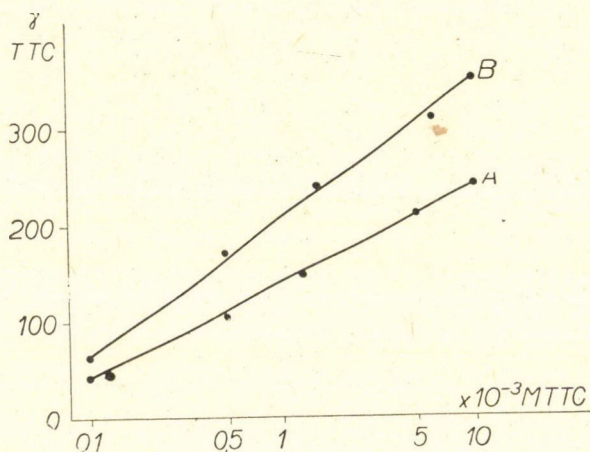


2. ábra. 100 mg pékélesztő által redukált TTC mennyisége különböző glutaminsav, illetve borostyánkősav koncentrációk mellett. x tengely: óra, y tengely gamma TTC

lag magas ára figyelembevételével ajánlatos a TTC koncentrációját a lehető legalacsonyabbnak választani. Vizsgálataink szerint már $10^{-3}M$ használata esetén jól mérhető eredményeket kapunk. A külső TTC koncentrációt tízszeresére emelve, a formazán képződés csak kétszeresére emelkedik. A MARRÉ és ARRIGONI (6) által előírt 1,5%-os, kb. $5 \cdot 10^{-2}M$ koncentrációt nem tartjuk előnyösnek, mert ezeknél a koncentrációknál már erősen érvényesül a TTC mérgező hatása.

4. A különböző szubsztrátumok egyidejű hatása

Ha a vizsgálandó objektumhoz egyszerre több szubsztrátumot adunk, várható, hogy a formazán képződés mértéke a szubsztrátumok egyenkinti alkalmazásánál nyert értékek összegeződésének lesz az eredménye. Viszont PRICE és THIMANN (7) megemlítik minden kísérleti adat nélkül, hogy több szubsztrát egyidejű hatása nem additív. A kérdés meghatározási módszerünk szempontjából azért lényeges, mert az additivitás fennállása a módszer megbízhatóságát növelné. A kérdést megvizsgáltuk annak eldöntésére, hogy az additivitás hogyan alakul ép és homogenált objektum esetében és hogy DPN, illetve élesztőfőzet hozzáadása növeli-e az additivitás mértékét. Fel-



3. ábra. A TTC koncentrációjának hatása a redukció mértékére. 100 mg borsógyökér (A) és élesztő (B) által 15 óra alatt redukált TTC mennyisége, az inkubációs oldat TTC koncentrációjának függvényében

tehető volt ugyanis, hogy a dehidrogenázok és a TTC között közvetítő egyik vagy másik tényező elégtelen volta okozza az additivitás csökkenését. Eredményeinket az 1. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban megadott értékek a kontroll levonásával, illetve számítás útján kapott (a számolási sémát előző közleményünkben tárgyaltuk) formazánmennyiségeket jelölik gammában kifejezve.

Az adatok áttekintésekor az alábbi törvényszerűségeket láthatjuk:

- A homogenizátumban az additivitás általában nagyobbfokú, mint ép sejtekben. Utóbbinál a hozzáadott második szubsztrátnak alig van hatása.

- A szubsztrát koncentráció csökkenése csak kis mértékben emeli az additivitás mértékét.

Több esetben megkíséreltük az alacsony additivitást 1 mg DPN, illetve 2 ml élesztőfőzet hozzáadásával emelni. Ez azonban nem sikerült. A homogenizátumnál észlelt csaknem 100%-os additivitás arra látszik mutatni,

hogy ép sejtekben az egyes szubsztrátok a redukció helyére való jutásban egymást gátolják és nem feltételezhető, hogy valamilyen „szűk keresztmetszet” akadályozza a teljes additivitást. Ezt az elképzelésünket támasztja alá az a megfigyelésünk is, mely szerint sem DPN, sem pedig FAD nem fokozza lényegesen az additivitást. Ha a korlátozó tényezők ezek volnának, akkor a kisebb additivitást okvetlen homogenizátumban kellett volna észlelnünk, mivel a homogenizálás következtében ezek az oldható kofaktorok erősen

I. táblázat

Több szubsztrát egyidejű hatásának addíciója

Vizsgált anyag	Szubsztrát	Inkubációs idő, óra	Redukált TTC gammában		Addíció mértéke $\frac{100a}{b}$ %
			a) mért	b) számfutt	
Ép. bgy. 160 mg	10 ⁻² M gluts, succ.	20	166	288	58
	10 ⁻⁴ M gluts, succ.		88	144	61
hom. bgy 200 mg 300 „ 400 „ 500 „	10 ⁻² M gluts, succ.	6	24	28	86
			40	46	87
			36	42	85
			48	50	96
ép. élesztő 100 mg 200 „ 300 „ 400 „ hom élesztő 200 mg 300 „ 400 „ 500 „	10 ⁻² M gluts, succ.	6	18	34	53
			38	76	50
			52	96	54
			64	104	61
			64	67	96
			68	72	94
			74	80	95
			80	80	100
Hom. bgy 400 mg	10 ⁻³ M gluts, succ.	6	190	192	99
ép élesztő 400 mg hom. élesztő 400 mg	10 ⁻³ M gluts, succ.	6	10	18	55
			162	158	100
ép. bgy. } 100 mg } hom. bgy } 400 mg } ép élesztő } 100 mg } hom. élesztő } 400 mg }	10 ⁻² M gluts, succ.	20	112	160	70
			68	82	83
		6	89	98	90
			15	19	79
		20	88	128	69
			60	66	90
		6	59	74	79
			40	45	88

Használt rövidítések: bgy: 3 napos borsógyökér, hom: homogenizálva, gluts: glutamát, succ.: szukcinát.

felhígulnak. Valószínűnek látszik azonban, hogy ezen koenzimek még felhígított állapotban is bőven elégnek bizonyulnak az inkubációs idő alatt.

A közölt táblázatban igen feltűnő még, hogy míg ép sejtek esetében a különböző beméréskor kapott formazánmennyiségek arányosak a beméréssel, addig homogenizátumnál csaknem függetlenek ettől. Erre a kérdésre a továbbiakban még visszatérünk.

Az additivitás hiánya, valamint a magas szubsztrát koncentrációk gátló hatása aggodalmat kelthet módszerünk megbízhatóságát illetően. Ezek a hibák azonban igen könnyen kiküszöbölhetők egyrészt a megfelelő szubsztrát koncentráció megválasztásával, másrészt a megfelelő inkubációs idővel. A hosszúra választott inkubációs időnél, az endogén szubsztrátumok kifogyása után csak az általunk hozzáadott egyetlen szubsztrát van jelen és ezáltal a több (esetleg endogén módon jelenlevő) szubsztrát okozta hiba-lehetőség elesik.

5. Az enzim mennyiségének hatása

Egy módszer megbízhatóságának legbiztosabb kritériuma, ha a kapott érték a hatóanyag koncentrációjával, illetve annak mennyiségével egyenes arányban áll. Módszerünk használhatóságát ebből a szempontból is megvizsgáltuk. A kísérletekhez különböző mennyiségű borsógyökeret, illetve pékélesztőt mértünk be. Az inkubációs oldat összetétele a szokásos volt, azzal a különbséggel, hogy szubsztrátot nem adtunk a rendszerhez. Inkubációs időként 15 óra helyett 6 órát választottunk azért, hogy az összehasonlítás a homogenizátummal lehetséges legyen. A homogenizátumok ugyanis 15 óra alatt a vizsgált legnagyobb bemérés esetén az összes TTC mennyiséget elfogyasztják, mely tény zavarhatja az értékelést. Külön szubsztrátot ebben az esetben azért nem adtunk a rendszerhez, mert mint már említettük, az endogén szubsztrátok az inkubáció első hat órájában még nem fogytak ki. Az enzim mennyisége és a formazán képződés közötti összefüggéseket a 4. ábra mutatja. Látható, hogy ép sejtek esetében a keletkezett formazán mennyisége a bemért anyagmennyiséggel egyenesen arányos, viszont homogenizátummal ez az összefüggés exponenciális. A homogenizátumok görbéje megfelelt a várakozásunknak, minthogy a vizsgálandó anyag mennyiségének fokozásával nemcsak az enzim mennyisége nőtt, hanem gyarapodott a rendszerbe került endogén szubsztrát mennyisége is. A redukció mértékét az $a = kc_1c_2$ egyenlet fejezi ki, ahol k arányossági tényező, c_1 az enzim, c_2 pedig a szubsztrát koncentrációja. Az enzim koncentrációjával a bevitt szubsztrát koncentrációja is nő és így az aktivitásgörbe felfelé hajlik. Ép sejtek esetében a görbe véleményünk szerint azért nem követi ezt a törvényszerűséget, mert ez utóbbi esetben nem egy homogén rendszerrel van szó, hanem egymástól függetlenül redukáló sejtekről. Így a mért aktivitás csak a sejtek számával lesz egyenesen arányos. A homogenizátumban mutatkozó viszonylagosan

alacsonyabb aktivitás azzal magyarázható, hogy ép sejtekben az összes tényezők a sejten belül viszonylag koncentráltabb formában fordulnak elő, homogenizáláskor azonban a reakció résztvevőinek oldható tagjai sokszorosukra hígulnak. Nagy, 0,6 g feletti bemérések esetén a redukció már túlhaladja az ép szöveteknél kapott értékeket. Ez a jelenség arra utal, hogy valószínűleg ilyen nagy bemérések esetén már előtérbe jut a homogenizálás előnye, vagyis, hogy a struktúra elroncsolása következtében a TTC könnyebben jut a redukció helyére. Ép sejtek esetében ugyanis a TTC bejutásának korlátozó tényezője a sejtek permeabilitása. Ez a mennyiségi görbe menetét nem befolyásolja, mert a beméréstől független. Homogenizátumoknál a kofaktorok felhígulása korlátozó tényezővé válhat. Ez utóbbi jelenség viszont erősen függ a beméréstől és nagy mennyiségek használata esetén megszűnik korlátozó tényező lenni.

A fentebb kifejtettek felvetik annak lehetőségét, hátha megoldható valamiképpen a homogenizátumban való dehidrogenáz-aktivitás-mérés. Ennek az lenne az igen nagy előnye, hogy a permeabilitás, mint limitáló tényező, kiküszöbölhető lenne, ezenkívül esetleg az inkubációs idő is lerövidíthető volna. Hogy egyelőre mégis az ép anyag vizsgálatát tartjuk előnyösebbnek, ennek az alábbi okai vannak:

a) Homogenizált anyag használata esetén vagy nagy anyagkoncentrációval, vagy hozzáadott kofaktorokkal kellene a szükséges kofaktorkoncentrációról gondoskodnunk. Mindkét mód a vizsgálatokat igen megnehezítené és megdrágítaná.

b) A magas bemérés még nem biztosítja (0,6 g) a szükséges kofaktor koncentrációját, hisz itt még a mennyiségi görbe emelkedő szakaszában vagyunk, a görbe még mindig exponenciális.

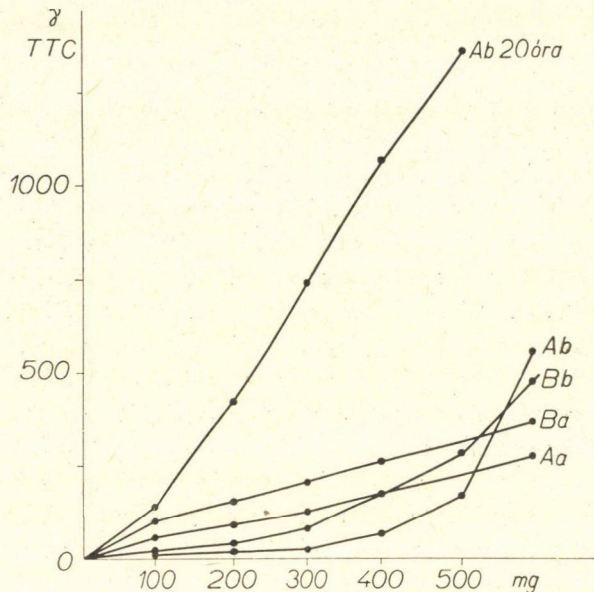
c) Teljesen bizonytalan, hogy a homogenizálás okoz-e tényleges aktivitáscsökkenést és ez esetleg milyen mérvű lehet (a híguláson kívül).

d) A homogenizált anyag igen gyorsan autolizálódik, s kétes, hogy található-e egyáltalán olyan inkubációs idő, mikor az autolízis még elhanyagolható, viszont az endogén szubsztlát nem zavar, de ugyanakkor a hozzáadott szubsztlát hatására már jól mérhető formazán képződést kapunk. Ilyen feltételek irányában további vizsgálatok folynak, mivel számos növényi objektum (pl. burgonya-gumó) annyi endogén szubsztlátot tartalmaz, hogy azok még 24 órás inkubálás alatt sem fogynak el, ép szövettel végezve a vizsgálatot. Ilyen esetekben a dehidrogenáz-aktivitás mérése esetleg homogenizátum vizsgálatával úgy-ahogy, mégis megoldható, az említett hátrányok ellenére.

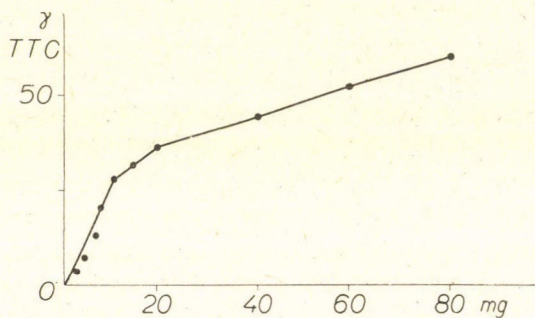
A 4. ábra elemzésekor még az is megfigyelhető, hogy az ép élesztővel felvett görbe nem fut O-ba, hanem az ordinátát kb. 50 gamma értéknél metszi. Hasonló jelenséget már előző közleményünkben (3) is leírtunk, hosszabb inkubációs idők használata esetén. Annak okául ott a baktériumok elszaporodását jelöltük meg. Jelen esetben a látszólag hasonló jelenség oka azonban egészen más, hiszen a hat órás inkubáció alatt baktériumok elszaporodásával

nem számolhatunk. Ezt az anomáliát csak az élesztő görbéje mutatja. Az élesztőnek azt a viselkedését jól magyarázhatjuk az 5. ábra elemzésével.

Látható, hogy a mennyiségi görbe lényegében két egyenesből tevődik össze. A 10 mg alatti meredek rész azzal kapcsolatos, hogy ilyen élesztő-



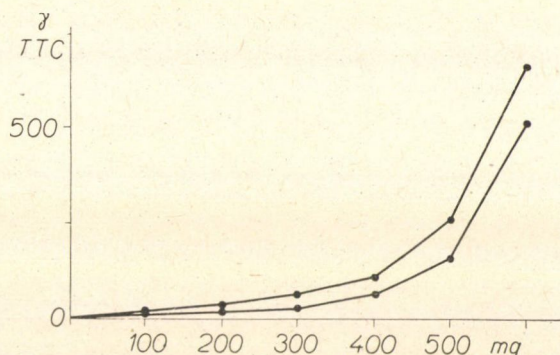
4. ábra. Az enzim mennyiségének hatása a TTC redukciójára. Különböző mennyiségű borsógyökér (A) és élesztő (B) által redukált TTC mennyisége ép (a), illetve homogenált (b) állapotban, szubsztrát hozzáadása nélkül, 6 óráig inkubálva. Egy görbe (Ab 20 óra) 20 órás inkubációval készült



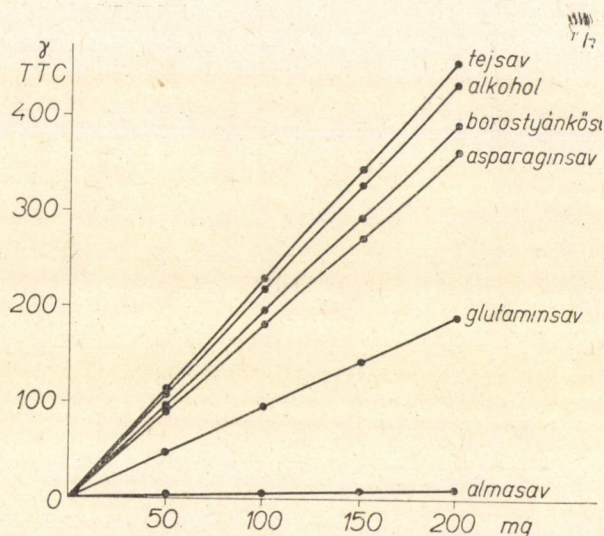
5. ábra. Különböző mennyiségű élesztő által 6 óra alatt redukált TTC

mennyiség még nagyjából szuszpendálva marad, a magasabb beméréseknél azonban az élesztő hamar leülepszik s így a TTC-nek a sejtbejutása igen megnehezül. Ilyen magas beméréseknél aztán az élesztő úgy viselkedik, mintha

összefüggő szövet volna. Ez a megfigyelésünk is azt mutatja, hogy milyen számottevő tényező a dehidrogenáz-aktivitás-méréseknél a behatolás sebessége. A fentiekből az is következik, hogy sejtszuszpenzió és szövetdarab TTC redukálóképességét csak akkor mérhetjük össze, ha előbbi az inkubálás folyamán esetleg összefüggő réteggé ülepedne le. Visszatérve az 1. táblázattal



6. ábra. Az enzim koncentrációjának hatása. Különböző mennyiségű homogenált borsógyökér által redukált TTC mennyisége 10^{-2} M glut, succ hozzáadásával, és szubsztrát hozzáadása nélkül. Inkubációs idő 6 óra



7. ábra. Az enzimkoncentráció hatása a TTC redukációjára. Különböző mennyiségű borsógyökér által redukált TTC mennyisége különféle szubsztrátok jelenlétében (a szubsztrátmentes kontroll érték levonva). Inkubációs idő 15 óra

kapcsolatban tett utalásra, a homogenizálásnak az is következménye, hogy a szubsztrát hozzáadásával kapott görbe párhuzamos a csak endogén szubsztráttal felvett görbével (6. ábra). A jelenség magyarázata a következő:

a bemérés növelésével az oldatban levő endogén szubsztrátok mennyisége is nő, s a hozzáadott szubsztrátnak egyre kisebb jelentősége van a formazán képződés szempontjából.

Az előbbiekben csak a görbék jellegét kívántuk megállapítani. Ezenkívül azonban szükségesnek látszott még úgy is elvégezni a vizsgálatokat, hogy az általunk megállapított standard módszerhez tartva magunkat és a szubsztrátos és kontroll értékek különbségét vizsgáljuk a bemérés függvényeként. Ezeket a méréseket több szubsztráttal is elvégeztük. A kísérletek eredményeit a 7. ábra mutatja.

Az ábrán látható, hogy standard feltételek mellett képződött formazán mennyisége a beméréssel egyenesen arányos. A különböző szubsztrátokkal különböző aktivitás értékeket kaptunk. Ezek a jelenségek módszerünk használhatóságát bizonyítják az ilyen jellegű vizsgálatokban.

6. A homogenizálás egyöntetűsége :

Láttuk, hogy homogenizált anyagban az enzimaktivitás az ép sejttel kapott értéknek csak törtrésze. Ez a hányados azonban nem állandó érték, hanem a bemérés mennyiségének és az inkubációs időnek a függvénye. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy élesztőnél kismértékű homogenizálás a formazán képződés fokozódását eredményezi. A sejtek teljes szétroncsolása viszont erős aktivitáscsökkenést okoz. A homogenizátumban történő aktivitásmérésnek ez a tény további hátrányát jelenti, mert igen nehéz megoldani, hogy az összehasonlítható mintákat egyenlő mértékben homogenizáljuk. A homogenizálás mértékének hatását igen jól szemlélteti a 2. táblázat. Itt egyrészt azt vizsgáltuk, hogy a homogenizátumban a külön-külön eldörzsöléssel kapott eredmények hogyan szórnak. Egyúttal figyelemmel voltunk arra is, hogy azonos homogenizátum alikvot részeiben végzett aktivitás értékek hogyan egyeznek.

2. táblázat

A homogenizálás mértékének hatása

0,5 g élesztő, 6 órás inkubáció, szubsztrát nélkül. Gamma TF

I. homogenizálás	380	365	372
II. homogenizálás	430	420	419
III. homogenizálás	650	680	655
IV. homogenizálás	240	233	242
ép sejtek	200	215	208

Az értékek világosan mutatják, hogy egy homogenizátummal, valamint ép sejtekkel kapott értékek szórása 10% alatt marad, viszont a párhuzamos homogenizálódások eredményei között mintegy 200%-os különbségek is vannak, annak ellenére, hogy megítélésünk szerint a homogenizálást azonos körülmények között, azonos mértékben végeztük. A táblázatból az is kitűnik,

hogy ez alkalommal végzett, kíméletes homogenizálás az ép sejtek értékeinél jóval magasabb értékeket eredményez. E jelenség a TTC behatolási sebességének fontos szerepére utal a kapott eredményben: kismérvű sérülése a sejteknek megkönnyíti a behatolást és ez látszólagos aktivitásnövekedést okoz, viszont a plazmaszerkezet teljes elroncsolása, mint láttuk, az aktivitás nagyfokú csökkenését eredményezi. A homogenizálás mértékének reprodukálhatatlansága ismételten megerősítette azt az álláspontunkat, hogy az aktivitásméréshez ép sejtek használatát ajánljuk.

Az adatok értékelése

Összefoglalva az eddig elmondottakat és összehasonlítva az ép sejtekkel és homogenizátumokkal kapott kísérleti eredményeinket, megállapíthatjuk, hogy növényi objektumoknál, endogén szubsztrát jelenléte esetén az ép szövetek használata látszik a dehidrogenáz-aktivitás-mérések elvégzésére a legmegfelelőbbnek:

1. A standard módszerrel mért aktivitás a jelenlevő endogén szubsztrát ellenére is egyenesen arányos a beméréssel.

2. Jelentős autolízis még 20 óra inkubálás alatt sem mutatható ki.

3. Az endogén szubsztrátok hamar kifognak, és ezzel elesik az a hiba-lehetőség, mely a nem teljes additivitásból adódik több szubsztrát egyidejű jelenléte esetén. A hozzáadott szubsztrátok okozta aktivitás emelkedés az idő előrehaladtával mind kifejezettebbé válik. Ajánlatos ezért ép objektum használata esetén hosszabb inkubációs idő használata. Természetes, hogy az endogén szubsztrátok mennyisége kísérleti objektumok szerint változik, ezért pontosabb eredményhez jutunk az előző közleményünkben leírt (3) módon meghatározott három érték alapján eljárva.

Hogy a 10^{-1} M-os szubsztrát koncentrációk esetében mutatkozó erős gátlóhatás magyarázható-e esetleg a viszonylag tömény oldat plazmolitikus hatásával (2), vagy esetleg más okokra vezethető vissza, azt még eddig eldönteni nem sikerült. Az erre vonatkozó vizsgálataink folyamatban vannak. Annyit azonban már ezekből a kísérletekből is megállapíthatunk, hogy a dehidrogenáz aktivitásának meghatározásánál a szubsztrát koncentráció 10^{-3} és 10^{-2} M között legyen. Kísérleteink alapján az utóbbi értéket javasoljuk.

Hasonló jelenségről számoltak be COTZIAS (1), LAGNADO és SUURKES (5) és VARGA (8). Előbbi szerzők az amin-oxidáz gátlását tapasztalták magas szubsztrát koncentráció esetében, utóbbi viszont a borostyánkősav erős növekedés-gátló hatását tapasztalta. Itt kell megjegyeznünk, hogy kísérleteink folyamán ez a gátlóhatás nem minden esetben mutatkozott meg kétséget kizáróan, különösen élesztőnél. Nyilván a vizsgált objektum fiziológiai állapotában beálló, mind ez ideig közelebről nem ismert változás játszik e téren fontos szerepet. Vizsgálataink tovább folynak abban az irányban, hogy

az átdolgozott módszert tovább finomítsuk, több növényre, illetőleg növényrészre is kipróbáljuk, az alkalmazhatósági határait pontosabban megállapítsuk.

Végezetül e helyről mondunk köszönetet az Egyetemi Növényélettani Intézet, és az Egyetem Alsógödi Biológiai Állomásán dolgozó mindazon munkatársainknak, kik tanácsukkal munkánkat támogatták.

Összefoglalás

Megállapítottuk azokat a kísérleti feltételeket, melyek mellett endogén szubsztrátot tartalmazó növényi anyagokban a különböző dehidrogenázok aktivitása egymás mellett kielégítő pontossággal, szériaszerűen meghatározható. Kiküszöböltük az endogén szubsztrát, a nagy szubsztrát koncentráció és az egyes szubsztrátok egymásra gyakorolt zavaró hatását. Kimutattuk, hogy a meghatározásokat ép sejteken a legcélszerűbb végezni, mert a homogenizálás reprodukálhatatlan eredményeket ad és erősen csökkentheti az enzim aktivitását. Rámutattunk a módszer hibalehetőségeire és korlátozó tényezőire is, melyek azonban a széria vizsgálatokat nem zavarják, illetve nem befolyásolják lényegesen.

IRODALOM

1. COTZIAS, G. C.: Mono amine oxidase substrates and inhibitors. In: „Shock and Circulatory Homeostasis 2nd Conference. New York, 232 (1953).
2. CURRIER, H. B. and VAN DER ZWEEP, W.: Plasmolysis and the tetrazolium reaction in *Anacharis Canadensis*. *Protoplasma*, 45. 125 (1955).
3. JÁMBOR B. és DÉVAY, M.: A növényi dehidrogenáz-rendszerek aktivitásának mérése triféniltetrazóliumkloriddal (TTC). I. Az inkubációs idő hatása. *Acta Biol. Hung. S. A.*
4. JÁMBOR B., DÉVAY M. and ROBERTS, L. W.: Experiments on the penetration and reduction of TTC in plant tissues. I. Accumulation of TTC by yeast cells. *Bull. Georgia Acad. Sc.* 15. 57. (1957).
5. LAGNADO, J. R. and SOURKES, T. L.: The enzymatic reduction of tetrazolium salts by amines. *Canad. J. Biochem. Biophys.* 34. 1094—1106. (1956).
6. MARRÉ, E. et ARRIGONI, O.: Determinazione „in vivo” dell’attività deidrogenasica mediante la tecnica al terazolio. *Nuovo J. Bot. Ital.* 61. 21—28. (1954).
7. PRICE, C. A. and THIMANN, K. V.: The estimation of dehydrogenases in plant tissue. *Plant Physiol.* 29. 113—124 (1954).
8. B. VARGA, M.: Növekedésgátló anyagok papírkromatográfiás vizsgálata húsos termékekből. Előadás a Magyar Biol. Társ. 1957. IV. 23-i ülésén.