

DIPLOMADOLGOZAT

Rácz Piroska Anna
Mezőgazdasági biotechnológus

Gödöllő
2023



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Mezőgazdasági Biotechnológus Szak**

**EGYES SZÁLÚ DNS-KÖTŐ FEHÉRJE ALKALMAZÁSA
PCR-REAKCIÓK SORÁN**

Belső konzulens:	Dr. Hegedűs Attila Egyetemi tanár, csoportvezető
Külső konzulens:	Dr. Lőrincz Zsolt Igazgató, Targetex Kft
Készítette:	Rácz Piroska Anna EZG7YE levelező tagozat
Intézet/Tanszék:	Növénybiotechnológia Tanszék

**Gödöllő
2023**

Tartalom

1.	Bevezetés és célkitűzés	5
2.	Irodalmi áttekintés.....	6
2.1.	A T4 gp32 egyesszálú DNS-kötő fehérje jellemzése	6
2.2.	A PCR.....	9
2.3.	A „Hot-Start” PCR	10
2.4.	RT-PCR	12
2.5.	Izoterm amplifikáció.....	13
2.5.1.	LAMP reakció	14
3.	Anyagok és módszerek.....	16
3.1.	Fehérjetermelő <i>Escherichia coli</i> sejtek előkészítése, DNS-munkák	16
3.1.1.	LB, expressziós tápoldat	16
3.1.2.	Plazmid DNS transzformálása <i>Escherichia coli</i> sejtekbe.....	16
3.1.3.	Plazmid DNS izolálás.....	17
3.1.4.	Agaróz gélelektroforézis	17
3.1.5.	Molekuláris klónozás	18
3.2.	A fehérjeexpresszió műveletei.....	19
3.2.1.	Spektrofotometriás mérések (OD_{600} , A_{280}).....	19
3.2.2.	Fehérjeexpresszió	19
3.2.3.	SDS-PAGE.....	20
3.2.4.	Baktérium sejtek feltárása	21
3.3.	A fehérjetisztítás műveletei	22
3.3.1.	Kromatográfia	22
3.4.	Mérések a tisztított fehérjével.....	24
3.4.1.	DSF.....	24
3.4.2.	Hot-Start PCR	25
3.4.3.	RT-PCR.....	26

3.4.4.	LAMP reakció	28
4.	Eredmények és megvitatásuk	29
4.1.	T4 gp32 – DNS munkák.....	29
4.1.1.	Tervezés	29
4.1.2.	Molekuláris klónozás	30
4.1.3.	Fehérjeexpresszió	33
4.1.4.	A fehérje tisztítása	34
4.2.	Kísérletek a tisztított fehérjével	38
4.2.1.	DSF.....	38
4.2.2.	„Hot-Start” PCR.....	40
4.2.3.	Reverz transzkripció PCR.....	43
4.2.4.	LAMP reakció	45
5.	Összefoglalás.....	47
6.	Köszönetnyilvánítás	48
7.	Irodalomjegyzék.....	49

Rövidítések és jelölések jegyzéke

gp32	gene product 32, a T4 bakteriofág 32-es génjéről átíródó egyes szálú DNS-kötő fehérje
BSA	bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albuminfehérje
BIP	backward inner primer, belső reverz irányú primer
Ct	cycle threshold, detektálási ciklus-küszöbérték
DSF	differential scanning fluorometry, differenciális pásztázó fluorometria
FIP	forward inner primer, belső előre irányuló primer
FPLC	fast protein liquid chromatography, gyors fehérjekromatográfia
HS antitest	<i>Taq</i> polimerázhoz kapcsolódó Hot-Start antitest
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography, immobilizált fémion affinitáskromatográfia
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification, hurok-közvetítéses izoterm amplifikáció
LB	Luria-Bertani tápoldat
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
qPCR	qualitative PCR, a DNS mennyiségi változásának nyomonkövetésével zajló PCR
RT	reverz transzkriptáz
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
SDS	sodium-dodecyl-sulphate, nátrium-dodecil-szulfát
SSB	single-stranded DNA binding protein, egyes szálú DNS-kötő fehérje
ssDNS	single-stranded DNS, egyes szálú DNS
Tris	trisaminomethane, trisz-aminometán

1. Bevezetés és célkitűzés

A modern molekuláris biológiának alapvető eszköze a polimeráz láncreakció (PCR), illetve a különböző DNS- és RNS-amplifikációs technikák. Ezek a módszerek folyamatosan fejlődnek, ezzel párhuzamosan az igény is növekszik az egyre érzékenyebb, specifikusabb, nagyobb kihozatalú és egyszerűbb nukleinsav-amplifikációs technikák iránt.

Számos különböző adalékanyag hozzáadásával értek el a kutatók eredményeket a PCR hatékonyságának növelésében. Noha nem minden esetben ismert a PCR-ben való működési mechanizmusa, a T4 bakteriofág gp32-es fehérjéje is ezen kiegészítő komponensek közé tartozik. A gp32 egy egyes szálú DNS-kötő fehérje, amely kooperatívan képes egymás után számos példányban az ssDNS szálhoz kapcsolódni. Funkcióját tekintve elengedhetetlen eleme a T4 bakteriofág DNS-replikációs és DNS-javító működésének, emiatt is érdekes a PCR reakciókra gyakorolt hatása. Kutatásom célja, hogy ezt a hatást vizsgáljam részletesebben.

Céлом eléréséhez először szükséges a gp32 fehérje rekombináns előállítás. Ez a folyamat magában foglalja a gp32 szintetikus gén megtervezését, expressziós vektorba klónozását, majd rekombináns *E. coli*-val való megtermelését.

Ahhoz, hogy a fehérje PCR reakciókban alkalmazható legyen, meg kell tisztítani olyan mértékben, hogy ne tartalmazzon PCR-inhibitorokat, nukleázokat és DNS-t. Ennek érdekében kromatográfiás módszerrel tisztítom a gp32-t, majd a fenti tulajdonságokat analitikai módszerekkel ellenőrzöm, a fehérje hőstabilitását pedig hődenaturációs módszerrel jellemzem.

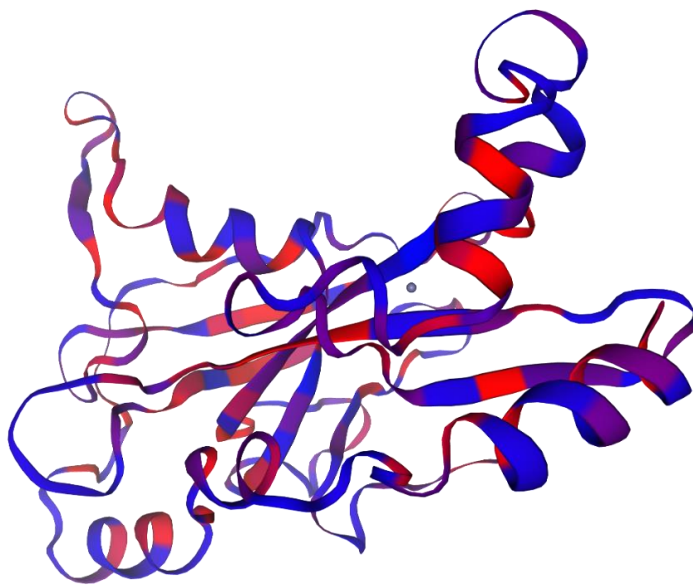
A tisztított fehérjével kísérleteket tervezek a gp32 fehérje PCR, RT-PCR és LAMP reakciókra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Jelentős hatás esetén ez új diagnosztikai kitek fejlesztését szolgálhatja.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A T4 gp32 egyes szálú DNS-kötő fehérje jellemzése

A T4 bakteriofág 32-es génjéről transzlálódó protein (gp32) egy egyes szálú DNS-kötő fehérje, amely központi szerepet játszik a T4 fág DNS replikációjában (Alberts & Frey, 1970). A replikációt segítő fehérjék között egyedülálló abban, hogy nem katalitikus, hanem sztöchiometriai mennyiségben képződik, amire magyarázatot ad, hogy az ssDNS templát szálra egymás után lineárisan rengeteg példányban képes kooperatíván kapcsolódni (Casas-Finet et al., 1992). Ezáltal védi a DNS-t a nukleázoktól, megelőzi a lokális másodlagos DNS-szerkezetek kialakulását, és segíti a templát DNS-t felnyílt állapotban tartani, amíg a T4 DNS-polimeráz lemásolja azt (Villemain et al., 2000). A T4 gp32 továbbá a DNS replikációs ciklus különböző lépéseiben segíti a többi szabályozó fehérje működését (Kreuzer & Brister, 2010).

A teljes fehérje három részből áll: a központi, Zn^{2+} iont tartalmazó strukturált rész tölti be a DNS-kötő funkciót (1. ábra), az N-terminális végen egy rövidebb, a C-terminális végen pedig egy hosszabb rendezetlen aminosavszekvencia található (Spicer et al., 1979).

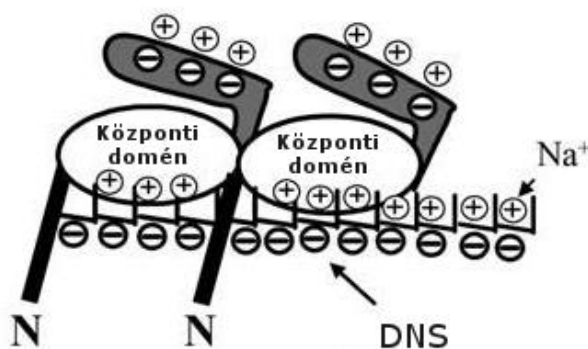


1. ábra: a T4 gp32 SSB fehérje központi doménjének szerkezete. A piros szín a hidrofób, a kék a hidrofil oldalláncú aminosavakat jelöli, a lilás árnyalatok pedig a kettő közötti átmenetet. A kék pont a Zn^{2+} iont jeleníti meg. Forrás:

<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P03695?csm=4C9771CF5D978487> 2023. április

A központi, DNS-kötő domént pozitívan töltött aminosavak alkotják, amelyek az ssDNS-hez való kapcsolódást segítik elő, illetve az itt található aromás aminosavak pedig a DNS bázisaival tudnak kölcsönhatást kialakítani. A gp32 az ssDNS-hez annak szekvenciájától függetlenül tud kötődni, és egyszerre hét bázist fed le a kölcsönhatás (Jose, Weitzel, Baase, & Von Hippel, 2015; Shamoo, 1995). A gp32 kötődése monomerként és kooperatívan láncot alkotva is független az ssDNS szekvenciájától, ami arra enged következtetni, hogy elsődlegesen a cukorfoszfát gerinchez való kapcsolódás határozza meg a kölcsönhatást, nem pedig a bázisokhoz való kapcsolódás. Az egyes- és a kettős szálú DNS között viszont pont a hidrofób kölcsönhatások alapján tesz különbséget a gp32, amelyek a fehérje aromás oldalláncai által alkotott zseb és az ssDNS bázisai között jönnek létre (Jose, Weitzel, Baase, & Von Hippel, 2015). Megfigyelték továbbá, hogy oligonukleotidok esetén enyhén erősebb affinitással rendelkezik a gp32 a csak timint tartalmazó DNS iránt, ami összhangban áll azzal, hogy az egymáshoz kapcsolódó gp32 molekulák fellazítják a DNS szerkezetét, és az ssDNS d(T) molekulák eleve kevésbé tömör formában vannak jelen, így a kapcsolódás kisebb kötési szabadenergiát igényel, mint más bázisok esetén (Jose, Weitzel, Baase, & Von Hippel, 2015; Jose, Weitzel, Baase, Michael, et al., 2015).

Az N-terminális végen található egy rövidebb, rendezetlen aminosavszekvencia. Alacsony gp32-koncentráció esetén a fehérje az ssDNS-hez monomerek formájában kötődik, amikor pedig sok gp32 van jelen a DNS mellett, akkor kooperatívan, egymást követő lineáris láncot alkotnak a fehérjemolekulák az ssDNS-en (2. ábra). A gp32 molekulák egymáshoz való kapcsolódását teszi lehetővé az N-terminális szakasz (Casas-Finet et al., 1992).

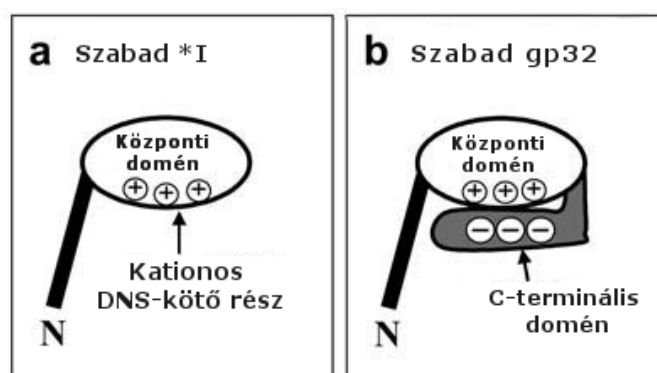


2. ábra: a gp32 kooperatív kapcsolódása az ssDNS-en. (Rouzina et al., 2005) .

A C-terminális végen egy hosszabb, szintén rendezetlen aminosavszekvencia található, amelyet savas doménnek is neveznek az itt található negatív töltésű aminosav-oldalláncok miatt. Ez a szakasz felelős az egyéb, replikációt szabályozó fehérjékkel, például a gp43-as T4 DNS polimerázzal való kölcsönhatásért (Burke et al., 1980; Hurley et al., 1993).

A teljes gp32 fehérje kettős szálú DNS denaturálására nagyon kis mértékben képes csak. Pant és munkatársai (2003) ezt azzal magyarázták, hogy a C-terminális domén ionos kölcsönhatást alakít ki a fehérje DNS-kötő részével, így a DNS nehezen fér csak hozzá a központi doménhez (3. ábra). Ez a sztérikus gátlás megszűnt, amikor a C-terminális szakaszt eltávolították a fehérjéről, létrehozva a gp32 *I formáját. Azzal párhuzamosan, hogy a *I forma DNS iránti affinitása nagyobb lett, a hélix-destabilizáló hatása is megnövekedett az teljes gp32-höz képest.

Az N-terminális domén eltávolítása tovább növeli a gp32 DNS-denaturálási képességét, ami arra utal, hogy mindkét rendezetlen szekvencia kulcsfontosságú szerepet tölt be a DNS destabilizálásában (Pant et al., 2003).



3. ábra: a gp32 monomer szerkezete a C-terminális domén hiányában (a) vagy jelenlétében (b), ahol a *I azt a fehérjét jelenti, amelyről a C-terminális szakaszt eltávolították (Rouzina et al., 2005)

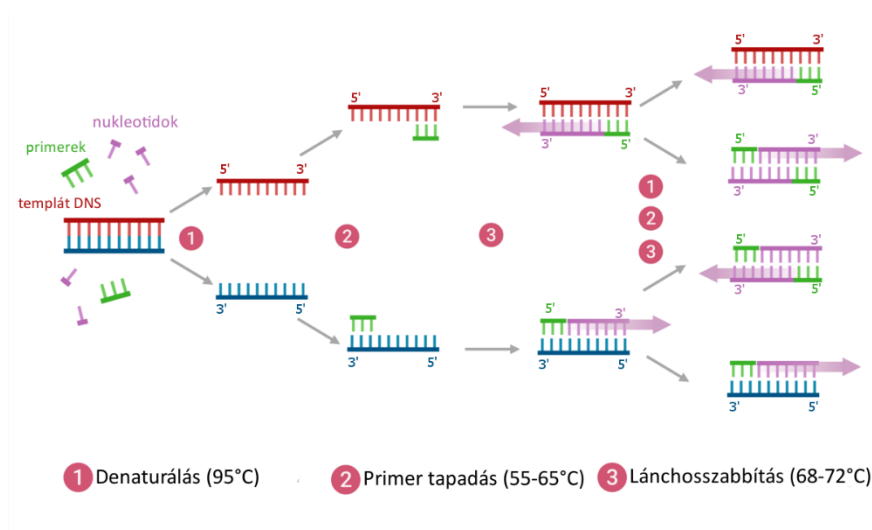
A gp32 fehérje egy Zn^{2+} iont tartalmazó metalloprotein (Giedroc et al., 1986). A fémion a 64-es pozícióban elhelyezkedő His, valamint a 77-es, 87-es és 90-es Cys aminosavakkal létesít kölcsönhatást. A cink ion jelenlétéhez többféle hatás köthető: az egyik fő funkciója az, hogy megvédi a gp32-t a proteolitikus enzimektől. Ha a cink iont eltávolítják a gp32-ről, létrehozva az apo-gp32 formát, akkor a teljes fehérjét képes a tripszin lebontani. Ha viszont az eredeti, cinket tartalmazó formában van jelen a gp32, akkor az N- és C-terminális szakaszok lehasadnak, a központi domén azonban ép marad. Másik jelenség, ami a Zn^{2+} ion jelenlétéhez köthető, hogy 150 mM NaCl-ot tartalmazó oldatban a metalloprotein forma nagymértékben csökkentette a polyd(A-T) olvadási hőmérsékletét, az apo-gp32 viszont ilyen körülmények között nem volt hatással a megegyező DNS molekulára (Giedroc et al., 1987).

A Zn^{2+} ion a gp32 fehérje szerkezetében igen stabilan van jelen. Giedroc és munkatársai (1986) kelátképző vegyületekkel szemben dializáltak Zn^{2+} -tartalmú fehérjéket, és míg például az alkalikus foszfatáz, a karboxipeptidáz vagy az *E. coli* SSB fehérjéje 10 mM EDTA hatására elveszítette a fémiont, a gp32 szerkezetéből nem mobilizálódott a Zn^{2+} (Giedroc et al., 1986).

Mivel a gp32 fehérje a replikáció folyamatában játszik szerepet, így felmerül a kérdés, hogy vajon a PCR reakciókra milyen hatást gyakorol.

2.2. A PCR

A polimeráz láncreakció (PCR) általánosan alkalmazott molekuláris biológiai technika, amely egy célzott DNS szakasról készít számos másolatot. A folyamatot hőstabil DNS polimeráz enzim végzi, és a cél DNS szekvencia határait specifikus oligonukleotidok jelölik ki. A folyamat ciklikus hőmérsékletváltoztatáson alapul: a kettős szálú DNS-t általában 95°C-on denaturálják, majd a primerek jellemzően 55-65°C környékén hibridizálnak a komplementer szakaszhoz, ezt követően a *Taq* polimeráz 68-72°C-on szintetizálja a primerektől kezdve az új DNS-szálat (4. ábra). Ezután a DNS denaturálásától kezdődik újra a folyamat. Az amplifikált DNS felhasználható klónozási műveletekre és újgenerációs szekvenálás előkészítésére, valamint kimutatása és azonosítása diagnosztikai jelentőséggel bír az orvostudomány, a mezőgazdaság, a genetikai vizsgálatok és a kriminalisztika területén egyaránt (Lebedev et al., 2008; Zhu et al., 2020). A köztudatban a PCR fogalma a SARS-Cov19 járvány miatt jelent meg, ugyanis az azt okozó vírus kimutatására is használtak PCR-t (Zhu et al., 2020).



4. ábra: a PCR reakció folyamata sematikusán. Forrás:

https://media.sn1.no/media/204296/standard_pcr1.png 2023.április

Régóta foglalkoztatja a kutatókat, hogy milyen módon lehet a PCR érzékenységét, specifikusságát és kihozatalát növelni. Számos megközelítése létezik ennek, és az egyik megoldási javaslatként 1990-ben Schwarz és munkatársai írták le, hogy amennyiben a fent említett T4 gp32-vel egészítették ki a reakciómixet, akkor látványosan javult a PCR kihozatala (Schwarz et al., 1990). Mások azzal kísérleteztek, hogy különböző inhibitorok jelenléte esetén

milyen hatással van a gp32 a reakcióra. Panaccio és Lew azt tapasztalták, hogy 8% vért tartalmazó minta esetén a *Tth* polimerázzal a reakció még adott terméket, ha hozzáadtak gp32-t is, ellenkező esetben viszont nem (Panaccio & Lew, 1991). Rapley immunglobulin nehéz láncot kódoló régiókat amplifikált PCR-rel, és gp32 hozzáadásával enyhe javulást tapasztalt a folyamat kihozatalában (Rapley, 1994). Abu Al-Soud és Rådström 16 különböző, korábban PCR-fokozó hatásúnak titulált vegyületet hasonlítottak össze olyan minták esetén, amely vért, fekáliát vagy húst tartalmazott, mint háttérszennyező. Az ő tanulmányukban megmutatkozik a gp32 fehérjéhez kapcsolódó fokozó hatás, BSA hozzáadásával azonban ennél erősebben tapasztalták az inhibíció csökkenését (Abu Al-Soud & Rådström, 2000).

Kreader más típusú PCR inhibitorokat is vizsgált, amelyek kapcsán összehasonlította a gp32 és a BSA hatását. Azt tapasztalta, hogy a BSA hasonló mértékben, vagy erősebben képes a gátló komponensek hatását csökkenteni, mint a gp32 (Kreader, 1996). Ebből arra következtethetünk, hogy a gp32 nem a reakció mechanizmusában való részvétele által enyhíti az inhibitorhatást, hanem a BSA-hoz hasonlóan egy olyan hozzáadott fehérje a rendszerben, ami megköti a gátló komponenseket.

2.3. A „Hot-Start” PCR

Amikor nagyon kis kópiaszámban áll rendelkezésünkre a felszaporítani kívánt DNS-szakasz, akkor a primerek gondos megtervezése esetén is felléphet más, nem kívánt DNS-szakasz amplifikálódása is (Chou et al., 1992). Ennek a hatásnak a feltételezhető oka az, hogy a reakcióelegy összeállítása és az első felfűtés során is zajlik már polimerizáció, nem csak a PCR folyamán. A primerek alacsonyabb hőmérsékleten a célszekvenciától eltérő szakaszhoz is kötődhetnek, illetve primer-dimerek képződése is előfordulhat (Chou et al., 1992).

Először 1991-ben írták le D'Aquila és munkatársai, hogy ha a PCR reakcióelegyet a primerek tapadási hőmérsékleténél magasabb hőfokon állítjuk össze, az nagyban növeli a reakció érzékenységét és a termékképződés specifikitását (D'Aquila et al., 1991). Ezt a típusú PCR-t, amikor alacsonyabb hőmérsékleten valamelyik kulcskomponenst blokkoljuk vagy távol tartjuk a reakciótól, emiatt maga a polimerizáció csak magas hőfokon indul el, nevezzük „Hot-Start” PCR-nek.

D'Aquila kísérletei után számos tanulmány született azt vizsgálva, hogy milyen módokon érhető el a reakció késleltetett elindulása. Különböző kutatások irányultak arra, hogy hogyan lehetséges fizikailag elkülöníteni egymástól a reakciókomponenseket egészen addig, amíg a

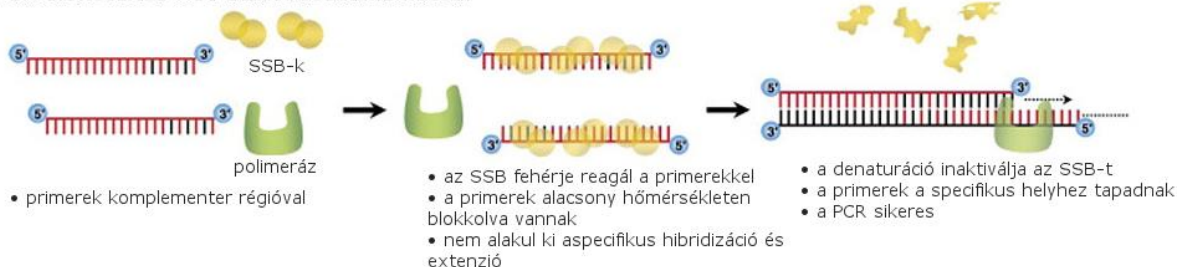
kívánt hőmérsékletre melegszik a rendszer (Chou et al., 1992; Kaijalainen et al., 1993). Más kutatócsoportok azzal kísérleteztek, hogy a DNS-polimeráznak a működését gátolták alacsonyabb hőfokon. Kermekchiev és munkatársai mutációt terveztek a *Taq* DNS-polimerázra, hogy hidegre érzékenyvé tegyék (Kermekchiev et al., 2003), Dang és Jayasena oligonukleotidokkal blokkolták a DNS-polimeráz működését (Dang & Jayasena, 1996). Kellogg és munkatársai pedig egy monoklonális antitesttel dolgoztak, amely szobahőmérsékleten képes reverzibilisen hozzákötődni a *Taq* polimerázhoz, megakadályozva annak aktivitását, magasabb hőmérsékletre emelve pedig leválik róla, és az enzim be tudja tölteni a funkcióját (Kellogg et al., 1994).

Nuovo és munkatársai 1993-ban azt jegyzik meg publikációjukban, hogy a manuálisan alkalmazott „Hot-Start” eljáráshoz hasonló érzékenység- és specifitásnövelő hatása van, ha SSB-t adunk a standard PCR-hez (Nuovo et al., 1993). Kubu 2008-ban kísérletei során „oligonukleotid-zárolásnak” nevezte azt, hogy egy egyes szálú DNS-kötő fehérjét adott a reakciómixhez, ami megkötötte a primereket (5. ábra). A PCR emelt hőmérsékletén a fehérje denaturálódott, ezáltal elengedte az oligonukleotidokat, és zavartalanul le tudott játszódni az amplifikáció (Kubu, 2008b). Kubu a T7 bakteriofág gp2.5-ös fehérjéjével valósította meg a kísérleteit (Kubu, 2008a), de a fentiek fényében nem zárható ki a lehetőség, hogy más, egyes szálú DNS-kötő fehérjével is működik a módszer.

PCR előkészítés Hot-Start mechanizmus nélkül



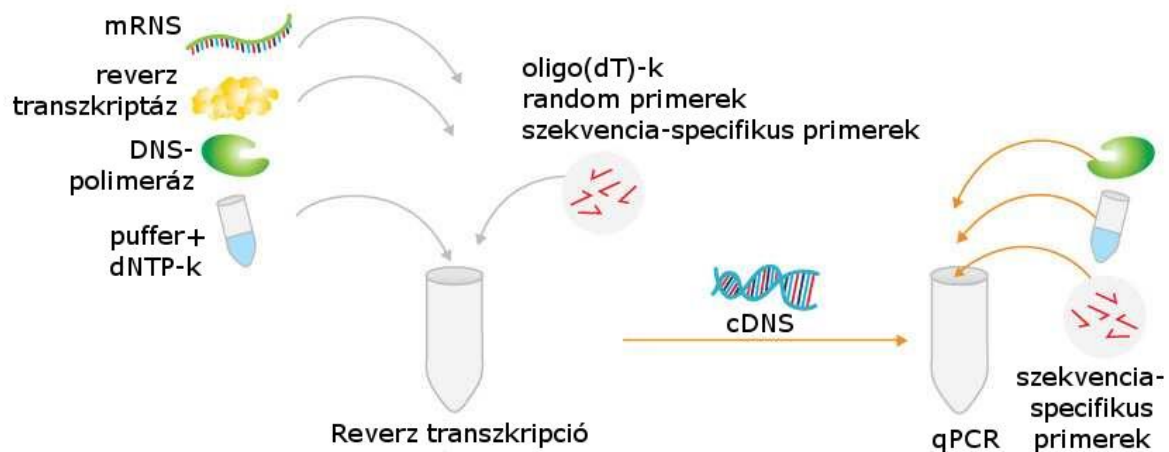
PCR előkészítés Hot-Start mechanizmussal



5. ábra: „Hot-Start” PCR a primerek blokkolásával (Kubu, 2008b)

2.4. RT-PCR

Az RT-PCR, vagy reverz transzkripció PCR olyan amplifikációs technika, amely során egy kiindulási RNS molekulából készít a reverz transzkriptáz enzim cDNS másolatot, és ez az újonnan szintetizálódott polinukleotid tud belépni a PCR ciklusba templátként. Innentől pedig az ismert ciklikus hőmérsékletváltoztatások hatására a DNS-polimeráz a megfelelő komponensek jelenlétében fel tudja szaporítani a cDNS-t (6. ábra) (Nyitray et al., 2013).



6. ábra: az RT-PCR sematikus ábrája (forrás:

https://www.thermofisher.com/hu/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr/jcr:content/MainParsys/image_fe06/foregroundimg.img.320.low.jpg/1543414495289.jpg

2023.április)

Nagyon hamar létrehoztak különböző mikroorganizmusok, funkcionális gének kimutatására RT-PCR esszét (Lamar et al., 1995; Lee et al., 1996), viszont szembesültek azzal a ténnyel, hogy sokszor maga a folyamathoz elengedhetetlen reverz transzkriptáz enzim gyakorol a PCR folyamatokra gátló hatást. Chandler és munkatársai azt vizsgálták, hogy milyen hatással van a reakcióra, ha T4 gp32 fehérjét adnak a reakcióhoz. Tapasztalataik azt mutatták, hogy a gp32 hozzáadásával jelentősen csökkent az inhibitor hatás, valamint a termék kihozatala is jobbnak mutatkozott. Leírták, hogy a gp32 javító hatása csak akkor jelentkezik, ha a fehérjét a reverz transzkripció előtt adják hozzá a reakcióhoz. Amennyiben csak a PCR-t egészítették ki gp32-vel, akkor semmilyen hatást nem mutattak ki (Chandler et al., 1998).

Azt, hogy a reverz transzkripció során hozzáadott gp32 javítja a módszer érzékenységét, Boylan és munkatársai is megerősítették cDNS-szintézis optimalizációval kapcsolatos munkájuk során (Boylan et al., 2001). Szintén ezt támasztják alá Villalva és munkatársainak kísérletei, akik a SMART PCR cDNS szintézis kit hatékonyságát javították a T4 gp32-vel (Villalva, 2001).

2.5. Izoterm amplifikáció

A PCR folyamatok ciklikus hőmérsékletváltoztatáson alapulnak, és főleg nagyobb reakciótérfogatok esetén komoly limitáló tényező a hűtés kivitelezése. Ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki a kutatók az izoterm PCR-t, amely során egy adott hőfokon zajlik a teljes reakció, így egy egyszerű vízfürdőben is véghez lehet vinni különösebb speciális berendezés nélkül. Az izoterm PCR legjelentősebb típusait foglalja össze az 1. táblázat.

Elnevezés	Nucleic Acid Sequenced Based Amplification	Rolling Circle Amplification	Loop-mediated isothermal amplification	Helicase Dependent Amplification	Recombinase Polymerase Amplification
Rövidítés	NASBA	RCA	LAMP	HDA	RPA
Magyar fordítás	nukleinsav-szekvencia-alapú amplifikáció	„gördülő kör” mechanizmusú amplifikáció	hurok-közvetítéses izotermális amplifikáció	helikáz-függő amplifikáció	rekombináz-polimeráz amplifikáció
Cél nukleotid	RNS	RNS/DNS	DNS	DNS	RNS/DNS
Primerek száma	2	2	4-6	2	2
Kezdeti felfűtés	65°C, opcionális	Van	Van	Nincs	Nincs
Inkubációs hőmérséklet	41°C	30-65°C	60-65°C	65°C	37-42°C
Időtartam	60-180 perc	60-240 perc	60 perc	30-120 perc	20-40 perc

1. táblázat: a főbb izoterm amplifikációs technikák összefoglalása Lobato és O'Sullivan nyomán (Lobato & O'Sullivan, 2018).

A HDA és az RPA technikák alapvető komponense a T4 gp32, viszont más izoterm amplifikációs módszereket is továbbfejlesztettek ennek a fehérjének a hozzáadásával. Zhang és munkatársai RCA típusú izoterm reakciót egészítettek ki gp32-vel, és azt tapasztalták, hogy a gp32 elősegítette a primerek beékelődését a DNS két szála közé a megfelelő helyre, a nem homológ primer tapadást viszont megakadályozta (Zhang & Tanner, 2017).

Nai és munkatársai NASBA reakciót egészítettek ki különböző SSB fehérjékkel, amelyek mind javították az amplifikáció hatékonyságát. A gp32 bizonyult azonban az egyetlennek, amely hozzáadása esetén nem képződött specifikus termék (Nai et al., 2022).

A fentiek alapján feltételezhetjük, hogy más típusú izoterm amplifikációkra is hatással lehet a gp32 fehérje hozzáadása.

2.5.1. LAMP reakció

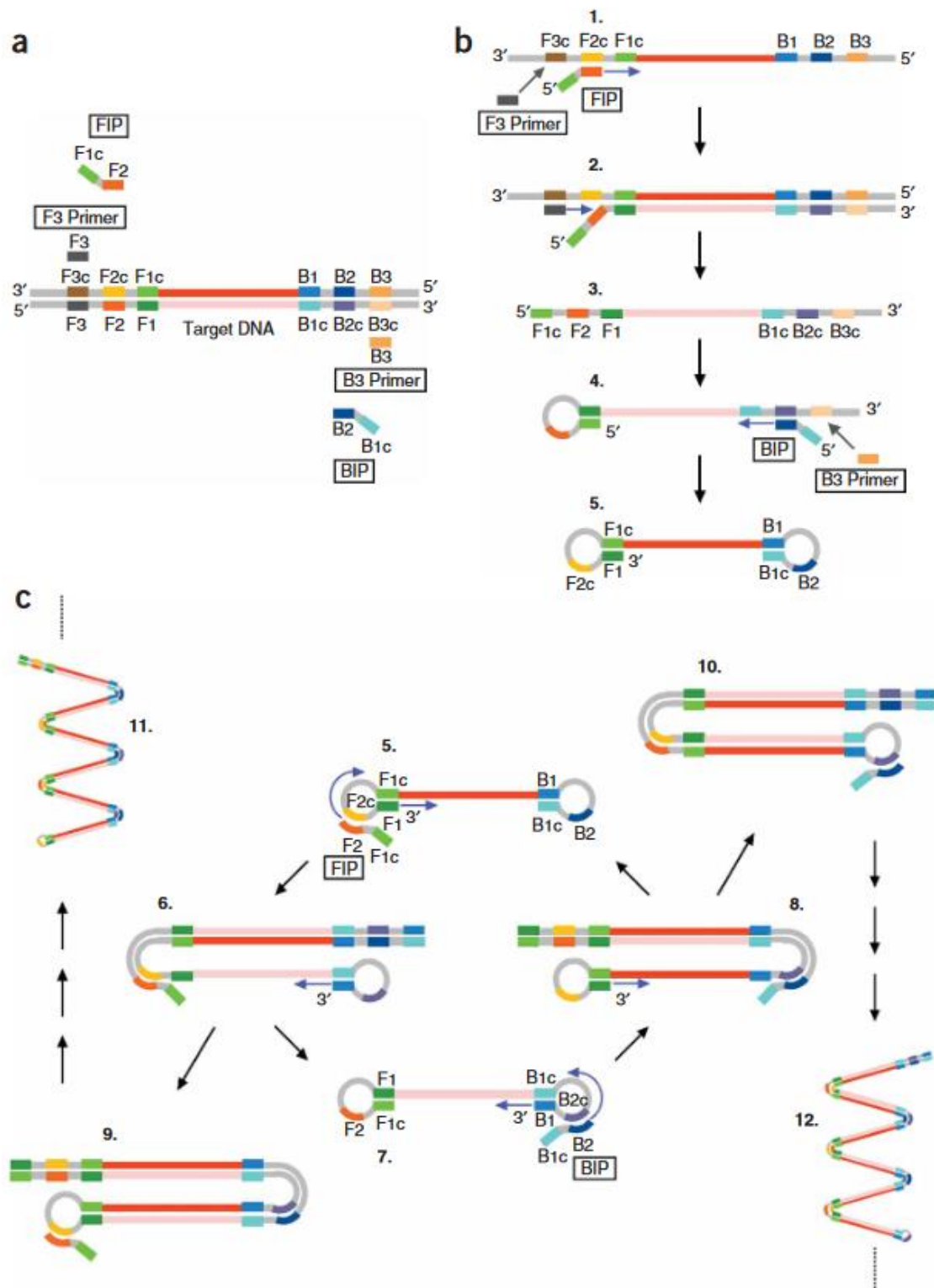
A LAMP egy olyan állandó hőmérsékleten zajló DNS-amplifikációs módszer, melynek során 4 vagy 6 különböző, speciális primer segítségével zajlik a reakció jellemzően 60-65°C-on. A LAMP kulcsfontosságú eleme a primerek helyes megtervezése, ugyanis 4-6 olyan oligonukleotidra van szükség, amelyek többek között nem szabad, hogy egymással vagy önmagukkal stabil kétszálú szerkezetet létesítsenek a reakció hőmérsékletén, valamint figyelembe kell venni, hogy a templát szálon megfelelő távolságban helyezkedjenek el. Amennyiben rendelkezésünkre állnak a primerek, akkor a technika rendkívül specifikus, egyszerű, és akár milliárdos nagyságrendű kópiaszámban képes előállítani a DNS-másolatokat egyetlen óra alatt (Soroka et al., 2021).

A LAMP folyamatát a 7. ábra mutatja be. Az ábrán az a) pontban a LAMP primerek tervezésénél jelen esetben hat régió van jelölve a DNS-en, az 5' végtől kezdődően az F3, F2, F1, B1c, B2c és B3. A c komplementer szekvenciát jelöl, így pl a B1c a B1 szekvenciával komplementer. A LAMP folyamatában két belső primert (FIP és BIP), valamint két külső primert (F3, B3) használunk, amelyek közül a külső egy hibrid primer: a FIP tartalmazza az F1c és az F2, a BIP pedig a B1c és a B2 szekvenciákat.

A b) pont jelöli a LAMP folyamat kezdetét: a FIP F2 régiója az F2c-hez tapad a templáton, és elindul a szintézis, hasonlóképp a BIP esetén is. Az F3 primer az F3c régióhoz kötődik, a polimerizáció innen is elindul, az első szintetizált szál pedig leválik. Ez a polimeráznak az úgynevezett „strand displacement” funkciójához köthető, ami azt jelenti, hogy a DNS-szintézis közben a templáthoz hibridizált szálát eltávolítja, hogy a polimerizációt folytatni tudja.

A levált első szintetizált szál egy hurkot képez a 3' végén, és ssDNS-ként templátul szolgál a következő BIP primerrel zajló polimerizációnak. Így mindkét végen keletkezik egy hurok, ami egy súlyzóhoz hasonló szerkezet létrejöttét eredményezi.

A c) pont pedig a ciklusos amplifikációs lépés: a súlyzó-struktúrából kiindulva a FIP és a BIP primerrel az ábra szerinti szintézisek zajlanak. A végtermék polimorf, de szigorúan meghatározott fragmentumokat tartalmaz.



7. ábra: a LAMP reakció folyamata. a) a LAMP primerek tervezése. b) a LAMP kiindulási (súlyószerű) struktúra keletkezése. c) a DNS-szintézis folyamata (Tomita et al., 2008)

3. Anyagok és módszerek

3.1. Fehérjetermelő *Escherichia coli* sejtek előkészítése, DNS-munkák

3.1.1. *LB, expressziós tápoldat*

A baktériumsejtek növesztéséhez és a fehérjeexpresszióhoz Luria-Bertani folyékony táptalajt (LB-t) használtam.

Összetétele (1 l térfogathoz):

- 10 g tripton
- 5 g élesztőkivonat
- 10 g NaCl

Az LB oldatot autoklávban 121°C-on 30 percig steriliztem.

Az általam alkalmazott expressziós vektorok két különböző antibiotikumrezisztenciát hordoztak, ezért a következő két antibiotikum-oldatot készítettem:

- ampicillin (Serva #13399.02): 100 mg/ml törzsoldat
- kanamycin (Serva #26899.03): 50 mg/ml törzsoldat

A törzsoldatok koncentrációja úgy van meghatározva, hogy pontosan az LB térfogatának ezredrészével megegyező mennyiséget kell hozzáadni a sejt kultúrákhoz az antibiotikum-rezisztenciát tartalmazó baktériumok megfelelő növekedéséhez.

Az antibiotikumot minden esetben a sterilizést követően, a már lehűlt LB-hez adtam hozzá.

3.1.2. *Plazmid DNS transzformálása Escherichia coli sejtekbe*

Munkám során a következő *Escherichia coli* törzsekkel dolgoztam:

- OneShot TOP10 (Thermo Scientific™ #C404010)
- BL21 DE3 (Sigma-Aldrich #69450-M)
- SoluBL21 (Genlantis #C700210)

A transzformálás közös protokoll alapján zajlott, azaz kémiai kompetenssé tett sejtekbe vittem be a megfelelő plazmid DNS-t hősokk segítségével.

A -80°C-on tárolt kompetens sejteket, miután hozzáadtam a bejuttatni kívánt DNS 250 ng-ját, jégen inkubáltam 25 percen keresztül, majd 80 másodpercig 42°C-on történt a hősök. Ismét jégre helyeztem a csövet 2 percre, majd hozzáadtam 500 µl steril LB-t, és 37°C-on inkubáltam 60 percig. Ezután a sejtszuszpenzióból 50 µl-t szélesztettem a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agaros LB-lemezre, amelyen másnapra nőttek ki a transzformáns telepek.

3.1.3. Plazmid DNS izolálás

A transzformálás sikerességének ellenőrzésére, illetve későbbi felhasználás céljából DNS-t izoláltam a transzformáns sejtekből a következő módon: steril fogpiszkálóval leoltottam egy telepet 5 ml antibiotikumot tartalmazó sterilizett LB-be, és egy éjszakán át rázattam 200 rpm-en 37°C-on. Másnap lecentrifugáltam a sejteket, majd követve a *Marcherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid DNA purification* (#740588.50) plazmidizoláló kit protokollját, lízis puffert adtam hozzá, amit utána semlegesítettem, lecentrifugáltam a sejtörmeléket és a kicsapódott genomi DNS-t, majd megkötöttem egy szilika membránon. Mosási lépésekkel távolítottam el a fehérje és RNS szennyezőket, és a kit pufferével eluáltam a plazmidot, majd ebben tároltam -20°C-on.

Az emésztett plazmid DNS-t agaróz gélből a *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega #A9281) DNS izoláló kit segítségével tisztítottam ki a gélből. A géldarab tömegével arányos mennyiségű oldó puffert adtam hozzá, 65°C-ra való melegítéssel feloldottam a gél, majd egy szilika membránon kötöttem meg a DNS-t, amit két mosási lépés után eluáltam, és -20°C-on tároltam.

3.1.4. Agaróz gélelektroforézis

A DNS molekulák méret szerinti elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztam. Az 1%-os agaróz gél készítéséhez 0,3 g szilárd agarózt (*SeaKem® LE Agarose* #50004) adtam 30 ml 1x-es töménységű TAE pufferhez (50x TAE *Merck Millipore* #1061741000), majd addig melegítettem, amíg az agaróz szemcsék teljesen fel nem oldódtak. Ezután lehűtöttem közel szobahőmérsékletűre, és hozzáadtam 3 µl SYBR Safe festéket (*Thermo Scientific™* #S33102). Az előre összeállított keretbe öntöttem, és az elemezni kívánt minták számának megfelelő fésűt helyeztem bele.

A vizsgálandó mintához a minta térfogatának ötödrészával megegyező mennyiségű festéket (Loading Dye, *NEB* #B7124S) adtam, majd a megszilárdult gél zsebeibe pipettáztam a mintát. Az elválasztás mindig tartalmazott egy DNS-standard-et is, amelynek a gyártó által

meghatározott sávjai alapján tudtam becsülni a saját mintám méretét (*Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kbp DNA Ladder #SM0313*). Az elektroforézis 90V feszültségen zajlott 50 percig, majd a gélképet *Bio-Rad Gel-Doc™ EZ Imager* géldokumentáló rendszerrel rögzítettem.

3.1.5. Molekuláris klónozás

A molekuláris klónozás folyamata egy DNS-szakasz izolálását és vektorba való beillesztését foglalja magában az eredeti nukleotidszekvencia megváltoztatása nélkül.

Munkám során az alábbi vektorokkal dolgoztam:

- **pPAL8** (*Bio-Rad #6045*) – ampicillinrezisztenciát hordozó expressziós vektor, profinity eXact tag-et illeszt a termelt fehérje N-terminális végéhez, amely a tisztítást segíti elő. Ez a tag a tisztítás folyamán lehasad, így csak a célfehérje lesz a végtermék.
- **pET24-b+** (*Novagen, #69750*) – kanamycinrezisztenciát hordozó expressziós vektor, egy 6 hisztidinből álló His-tag-et illeszt a fehérje C-terminális végéhez, amely affinitáskromatográfiás tisztítást tesz lehetővé. A tag a tisztítás folyamán nem hasad le, így a végtermék is hordozni fogja.

Az alábbi enzimeket és puffereket alkalmaztam a molekuláris klónozáshoz:

- NdeI (*NEB #R0111L*)
- NotI (*NEB #R0189L*)
- BamHI (*NEB # R0136S*)
- T4 ligáz (*Thermo Scientific #EL0011*)
- NEB 3.1 Buffer (*NEB #B7203S*)
- T4 ligáz puffer (*Thermo Scientific™ #B69*)

Az emésztéshez összemértem a megfelelő vektort, restriktációs enzimet és puffert, majd a térfogatot nukleázmentes vízzel egészítettem ki. Az emésztést 37°C-on végeztem 60 percen keresztül. Az emésztési elegyet elválasztottam agaróz gélen, majd izoláltam a megfelelő méretű DNS-szakaszt. A ligáláshoz összemértem az összeilleszteni kívánt vektort és inszertet 1:5 moláris arányban, aminek a pontos mennyiségét az izolált DNS koncentrációjából számoltam ki. Hozzáadtam a T4 ligáz puffert és a T4 ligáz enzimet, majd 20°C-ra helyeztem az elegyet, ahol 60 percig zajlott a reakció. Ezután 65°C-on 20 percig inkubáltam az elegyet az enzim inaktiválása céljából, majd transzformálásig -20°C-on tároltam a mintát.

3.2. A fehérjeexpresszió műveletei

3.2.1. Spektrofotometriás mérések (OD_{600} , A_{280})

Az UV-Vis spektrofotométer a mintán áthaladó fény intenzitását méri, amelyet egy referenciaoldattal hasonlít össze. A mért abszorbancia-értékből tudunk következtetni az oldatban található anyagok mennyiségére. Munkám során két célra alkalmaztam fotometriás módszert:

- **Fehérjekoncentráció meghatározása:** a fehérjék az őket alkotó aminosavak szerkezetéből adódóan elnyelési maximummal rendelkeznek 280 nm hullámhosszon. Az általam vizsgált fehérje szekvenciája alapján az ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) moláris extinkciós koefficiensnek $\epsilon=1,156$ -os értéket kalkulált, a továbbiakban ezzel számoltam én is.

A fehérje tisztítása során több lépésnél is szükség volt koncentrációmeghatározásra, referenciának mindig azt az oldatot használtam, amelybe a tisztítás során a fehérje került.

A fehérjekoncentrációt *NanoDrop*TM spektrofotométerrel határoztam meg.

- **Optikai denzitás meghatározása:** a sejtsuszpenziók sejtsűrűségének meghatározására alkalmaztam, 600 nm-es hullámhosszon mértem a kultúrából vett minta elnyelését steril LB-hez viszonyítva. Döntő jelentősége van a műveletnek a fehérjetermeléskor, ugyanis az indukálást az exponenciális növekedést jelző $OD_{600}=0,6-0,8$ -as értékek között végeztem.

Az optikai denzitást *Eppendorf Biophotometer plus* készülékkel határoztam meg, a méréshez egyszer használatos 10 mm-es úthosszúságú protein, és RNáz és DNáz-mentes műanyag küvétát (*Eppendorf #30106300*) használtam.

3.2.2. Fehérjeexpresszió

Az általam használt expressziós vektorok fehérjetermelése a lac operon alapján működik, így amíg nincs laktóz vagy laktózanalog molekula a rendszerben, addig nem termelődik szignifikáns mennyiségben a célfehérje.

A fehérjeexpresszió a következőképp történt: starterkultúrát indítottam lemezről vagy -80°C -on tárolt sejtekből, amit 100 ml antibiotikus LB-ben egy éjszakán át rázattam 200 rpm-en 37°C -on. A starterből másnap 20 ml-t mértem át 2 l antibiotikumot tartalmazó LB-be, aminek

az optikai denzitását mintavétellel monitoroztam. $OD_{600}=0,6-0,8$ közötti értéken, amikor a sejtek növekedése elérte az exponenciális fázist, 2 ml 95 mg/ml IPTG-t (*Biosynth #I-8000*) adtam hozzá, ami indukálta a fehérjetermelődést.

A túlzott mértékű overexpresszió elkerülése érdekében 25°C-on rázattam tovább a kultúrát 20 órán keresztül. A termelést azzal állítottam le, hogy a sejteket 4000 g-n centrifugáltam, majd további felhasználásig -20°C-on tároltam.

3.2.3. SDS-PAGE

A fehérjék méret szerinti elkülönítésére leggyakrabban alkalmazott analitikai módszer az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis, munkám során én is ezt az eljárást használtam. A minták analíziséhez 1 mm vastagságú 12,5% akrilamidot tartalmazó szeparáló gél, illetve 5%-os koncentráció gél öntöttem.

A gélminták előkészítése a következőképp zajlott: az analizálandó mintából 10 µl-t összekevertem 10 µl 5% béta-merkaptoetanolt tartalmazó redukáló mintapufferrel, majd 95°C-on 5 percig inkubáltam. Ezalatt zajlik az SDS-nek a fehérjék hidrofób részeihez való kötődése, ami segíti a letekeredésüket, valamint egységes negatív töltés alakul ki a molekulák felszínén, ami az elválasztás alapját képezi.

Az elektroforézishez használt kádat desztillált vízzel tízszeresére kihígított 10xRUN pufferrel töltöttem fel, az elválasztás 200 V-on zajlott 50 percen keresztül.

A mintákkal párhuzamosan molekulamarkert is felvittem a gélre (*Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards #1610373, GE Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit #17044601*), aminek a segítségével meg lehet becsülni a fehérjék molekulatömegét.

Az elektroforézis folyamatát követően a fehérjéket a következő módon vizualizáltam: a gél Coomassie-blue tartalmú oldatba áztattam 20 percre, majd 7%-os ecetsav oldattal mostam ki a nem kötődött festéket. A gélről végül *Bio-Rad Gel-Doc™ EZ Imager* készülékkel készítettem képet.

Az SDS-PAGE során használt oldatok összetételét a 2. táblázat, a gél összeállításához használt oldatok mennyiségét a 3. táblázat tartalmazza.

A oldat	B oldat	C oldat	Amper
• 1,5M Tris-HCl • 0,4% SDS • pH 8,8	• 0,5M Tris-HCl • 0,4% SDS • pH 6,8	• 30% akrilamid (29,1:0,9 arányú akrilamid és biszakrilamid)	• 10% ammónium-perszulfát
Mintapuffer (190ml)	10xRUN (1 l)	R-festék (2 l)	Temed
• 25 ml 0,5M Tris-HCl • 50 ml glicerín • 40 ml (10 %) SDS • 4 ml (0,5 %) brómfenolkék • MQ víz • pH 6,8	• 30,3 g Tris • 144 g glicerín • 100 ml (10%) SDS • MQ víz • pH 8,3	• 2 g (1%) Coomassie Brilliant Blue • 200 ml (10%) ecetsav • 500 ml (25%) izopropanol • MQ víz	• N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin

2. táblázat: az SDS-PAGE analízishez használt oldatok összetétele.

Komponens	Szeparáló gél (12,5%)	Koncentráló gél (5%)
MQ víz	0,47 ml	1,17 ml
C oldat	2,33 ml	0,333 ml
A oldat	2,8 ml	-
B oldat	-	0,5 ml
Amper	40 µl	20 µl
Temed	7 µl	3 µl

3. táblázat: az SDS-poliakrilamid gél összeállításához használt oldatok mennyisége.

3.2.4. Baktérium sejtek feltárása

Az intracellulárisan termelődő fehérjék kinyerésének legelső lépése a sejtek feltárása. Ehhez munkám során ultrahangot alkalmaztam, aminek hatására a keletkező buborékok kavitációja roncsolja irreverzibilisen a sejtmembránt, így a sejtek elpusztulnak és a bennük levő anyag az őket tartalmazó oldatba kerül.

A sejtfeltáráshoz *Bandelin Sonoplus HD2070* készüléket és *MS73* szonikálófejet használtam.

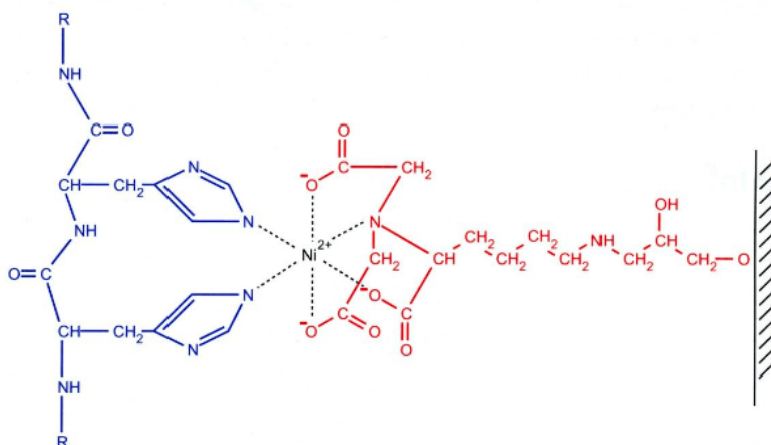
3.3. A fehérjetisztítás műveletei

3.3.1. Kromatográfia

A termelt fehérjét egymás után következő gyors fehérjekromatográfiás (FPLC) lépésekkel tisztítottam. Az FPLC megvalósításához *ÄKTA Pure™* és *Bio-Rad NGC Chromatography System* készülékeken dolgoztam, amelyek a kromatográfia közben speciális detektor segítségével folyamatosan regisztrálják a konduktivitást és 280 nm hullámhosszon elnyelt fényintenzitást.

3.3.1.1. Affinitáskromatográfia: His-Trap IMAC rendszer

A His-tag-et, azaz egymás után 6 hisztidin aminosavat tartalmazó fehérjék tisztításának az egyik legelterjedtebb módja az IMAC (immobilizált fémion-affinitás kromatográfia), amely a hisztidin és a gyantához rögzített kétértékű fémionok kölcsönhatásán alapul (8. ábra). A kötődés igen szelektív és erős, így nagy tisztaság elérhető akár ezzel az egyetlen kromatográfiás lépéssel.



8. ábra: a rögzített nikkell és a His-tag közötti kölcsönhatás.

Az általam alkalmazott oszlopot (*Cytiva HiTrap™ IMAC FF 1 ml #17092102*) Ni^{2+} fémionnal használtam. Az elúciót imidazollal valósítottam meg, amely a szerkezeti hasonlóság miatt a fémionért verseng a célfehérjével, nagy koncentráció esetén pedig teljesen leszorítja azt. Kis mennyiségben az ekvibráló puffer, illetve maga a minta is tartalmazhat imidazolt, ez ugyanis csökkenti az aspecifikus kötődések kialakulását.

Ahhoz, hogy az oszlop minden tisztításnál a maximális kapacitással álljon rendelkezésre, előkészítésként elvégeztem az oszlop regenerálását, azaz eltávolítottam a Ni^{2+} iont, majd újra felvittem a gyantára. Ezt a folyamatot a gyártó által javasolt protokoll alapján végeztem el.

Az oszlop használati útmutatója és a fehérje tulajdonságai alapján a 4. táblázatban található puffereket használtam a kromatográfiához.

gp32-NiA: ekvibráló puffer	gp32-NiB: elúciós puffer	NiS: regeneráló puffer	Feltáró puffer
• 20 mM NaH₂PO₄ • 300 mM NaCl • 20 mM imidazol • pH 7,5	• 20 mM NaH₂PO₄ • 300 mM NaCl • 400 mM imidazol • pH 7,5	• 20 mM NaH₂PO₄ • 500 mM NaCl • 50 mM EDTA • pH 7,4	• 20 mM NaH₂PO₄ • 300 mM NaCl • pH 7,4

4. táblázat: az IMAC kromatográfia során alkalmazott pufferek összetétele.

A fentieknek megfelelően állítottam össze a kromatográfia lépéseit, amelyek az 5. táblázat találhatóak.

Oszlopregenerálás	1. gp32-NiA 5-10 oszloptérfogat 2. NiS 5-10 oszloptérfogat 3. gp32-NiA 5-10 oszloptérfogat 4. MQ 5-10 oszloptérfogat 5. 0,1 M NiSO ₄ 5-10 oszloptérfogat 6. MQ 5-10 oszloptérfogat
Fehérjetisztítás	7. ekvibrálás gp32-NiA pufferrel 8. mintafelvétel 9. mosás gp32-NiA pufferrel 10. gradiens: 0-100%B 15 oszloptérfogat

5. táblázat: az IMAC kromatográfia lépései.

A módszer következtében a tisztított fehérje tartalmaz egy His-tag-et, amely, mivel mindössze hat aminosavból áll, az esetek legnagyobb részében nem zavarja a fehérje működését.
(<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11495-pdf>)

3.3.1.2. Puffercsere gélszűréssel

A méretkizárásos kromatográfia G-25 gyantával általános módszer egy adott minta puffercseréjére, illetve a benne található nagy és kis molekulák hatékony elkülönítésére. Azok a molekulák, amelyek nagyobbak, mint a gyanta legnagyobb pórusmérete, nem tudnak bejutni a pórusokba, így átesnek az oszlopon, és ezek eluálódnak leghamarabb.
(<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11639-pdf>)

Tároló puffernek azt választottam, amelyben több nagy forgalmazó cég is tárolja az általuk előállított T4 gp32 fehérjét (6. táblázat első oszlopa). A glicerint hozzáadása a kromatográfia után célszerű, ezért a puffercseréhez kétszeres töménységű, és glicerint nem tartalmazó oldatot készítettem (6. táblázat második oszlopa).

A puffercseréhez HiTrap™ 5 ml Desalting (Cytiva #17140801) oszlopot használtam, és Bio-Rad NGC Chromatography System készüléken végeztem a műveletet.

A kromatográfia menete jellemzően a következő: az oszlop bemosása a célpufferrel, mintafelvétel, majd a célpufferrel mossuk a rendszert addig, amíg az UV abszorbancia és a konduktivitás is stabilizálódik az eredeti állapotra. A mintát a kromatográfia előtt célszerű betöményíteni, hogy a puffercsere hatékonyan megtörténjen. A töményítést Sartorius Vivaspin® #VSA005 20 ml-es töményítőcellában végeztem 4000g fordulatszámom.

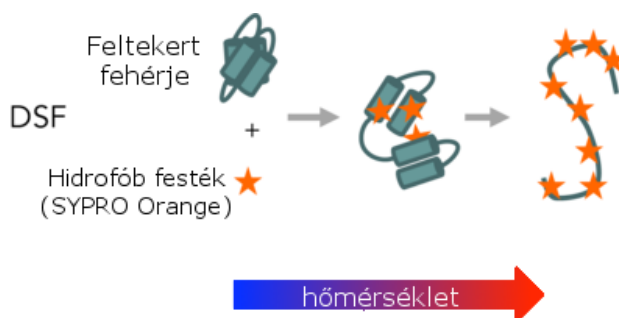
Tároló puffer	gp32 St2x puffer
• 20 mM Tris-HCl • 100 mM NaCl • 0.5 mM DTT • 1 mM EDTA • 50% glicerin • pH 8	• 40mM Tris-HCl • 200mM NaCl • 1mM DTT • 2mM EDTA • pH 8

6. táblázat: a gp32-t tároló végleges puffer és a puffercsere oldatának összetevői.

3.4. Mérések a tisztított fehérjével

3.4.1. DSF

A Differential Scanning Fluorimetry (DSF) módszer a fehérjék térszerkezetének változását vizsgálja a hőmérséklet függvényében. A DSF előkészítése során a fehérjeoldathoz hidrofób festéket adunk, amely csendesített formában van jelen, azaz nem ad fluoreszcens jelet. A hőmérséklet emelésével a fehérje letekeredik, így a festékmolekula hozzá tud kapcsolódni a hidrofób részeihez. Ennek hatására a fluoreszcencia-csendesítés megszűnik, és detektálható jelet kapunk (9. ábra).



9. ábra: a DSF mechanizmusának sematikus ábrája. Forrás: <https://cmi.hms.harvard.edu/differential-scanning-fluorimetry>

A dolgozatomhoz kapcsolódó DSF kísérletekhez a SYPRO™ Orange (Invitrogen #S6650) festéket használtam.

A mérés a következőképp zajlott: a gp32-t kihígítottam 0,1 mg/ml koncentrációjúra a vizsgálni kívánt pufferben, majd hozzáadtam a fluoreszcens festéket. Kimértem az elegyet 4ititude FrameStar 96-lyukú PCR-plate-re, amit Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System készülékbe helyeztem. A készülék 10-90°C között 0,5°C-onként emelte a hőmérsékletet és detektálta a fluoreszcens jelet.

A kirajzolódó olvadási görbét vizuálisan értékeltem ki.

3.4.2. Hot-Start PCR

A „Hot-Start” kísérleteket egy olyan PCR-esszével végeztem, amelyben a primerek rendelkeznek komplementer szakasszal, így egymáshoz is képesek hibridizálni. Mivel a folyamat kis mértékben alacsonyabb hőmérsékleten is zajlik, ezért a PCR felfűtése alatt elkezdődő reakciók miatt nem csak specifikus termék, hanem primer-dimerek is keletkeznek. Ha a reakcióelegy összeállításakor szobahőmérsékleten a Taq DNS-polimerázt vagy a primereket blokkoljuk olyan módon, hogy ez a hatás a primerek olvadási hőmérséklete környékén megszűnjön, akkor az első denaturálódás után kezdődik el az amplifikáció, és csak a kívánt termék keletkezik.

A gp32-vel kiegészített minta mellett minden esetben összeállítottam egy negatív kontrollt is, illetve pozitív kontrollként elvégeztem a PCR-t HS-antitest hozzáadásával.

A kísérlet a következőképp zajlott: először a tároló pufferrel kihígítottam a 10 mg/ml-es gp32-t a kívánt mértékben, majd a 7. táblázatban található reakciómixeket állítottam össze.

Összetevő	Mennyiség
MSOP012 2x puffer (PCRBIO #MSOP012)	128 µl
Taq polimeráz (PCRBIO #PB004618-052-1)	12,8 µl
Forward primer (100 µM)	6,4 µl
Reverz primer (100 µM)	6,4 µl
Nukleázmentes víz	17,92 µl

7. táblázat: a „Hot-Start” kísérletekhez tartozó reakciómix összetétele.

A pozitív kontrollhoz 6,4 µl 250 ng/µl-es HS antitestet (*PCRBIO #P0064-0411F*) és 14,1 µl nukleázmentes vizet adtam hozzá, a vizsgált mintákhoz pedig a hígított gp32-ből 20,5 µl-t.

Ahhoz, hogy a HS antitest hozzá tudjon kapcsolódni a *Taq* polimerázhoz, 37°C-on inkubáltam a reakciómixet 30 percen keresztül, ezalatt kihígítottam a templátot: 10-, 100-, 2500-, és 10000-szeres hígításokat készítettem a kiindulási cDNS-ből.

Egy PCR plate-re kimértem a hígított cDNS-ből 12-12 µl-t, majd a 30 perc letelte után hozzáadtam 36-36 µl-t az inkubált mixekből. Minden reakcióelegyből 2-2 párhuzamost készítettem: 20-20 µl-eket mértem szét a PCR plate-en. A PCR hőmérsékletprogramját a 8. táblázat tartalmazza.

A PCR-t követően 65 és 95°C között olvadási görbét vettem fel 0,5°C-onként. A PCR-t *4titude FrameStar* 96-lyukú plate-en végeztem *Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System* készülékkel.

Kezdeti denaturálás	95°C 2min	
Denaturálás	95°C 10s	35 ciklus
Primer tapadás + lánchosszabbítás	60°C 15s	
Olvadási görbe	65-95°C, 0,5°C-onként	

8. táblázat: a „Hot-Start” PCR hőmérsékletprogramja.

A mérést vizuálisan értékeltem ki: a minta és a kontroll olvadási görbéit hasonlítottam össze annak az ismeretében, hogy a specifikus termék olvadási hőmérséklete ~84°C, a primer-dimereké pedig ~74°C. A cDNS hígítás hatására a termékképződés a primer-dimerek irányába tolódik el. Amennyiben sikeres a „Hot-Start” reakció, akkor a leghígabb cDNS koncentráció esetében sem képződnek primer-dimerek.

3.4.3. RT-PCR

RT-PCR modellkísérleteket a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Scientific™ #K1621*) segítségével végeztem, amely tartalmaz minden olyan komponenst, amely a reverz transzkripcióhoz szükséges. A kitnek része továbbá egy kontroll RNS és hozzá tartozó specifikus GADPH PCR-primerek is, amely alapján végig lehet követni a teljes cDNS szintézis folyamatot.

Munkám során a kontroll RNS-t és a primereket használtam fel ahhoz, hogy megvizsgáljam, milyen hatással van a GAPDH génszakasz amplifikációjára, ha gp32-t adok az RT-PCR reakciómixhez.

A kísérlet a következőképp zajlott: az RNS-ből hígítási sort készítettem: 10-, 100-, 1000- és 10000-szeres hígításokat. A reakciómixeket a kit protokollja alapján állítottam össze, a 9. táblázat szerinti mennyiségekkel.

14-14 µl-enként szétmértem a reakciómixeket a PCR plate-re, majd mindegyikhez hozzáadtam 6 µl kihígított gp32-t, a kontrollhoz pedig ugyanennyi nukleázmentes vizet. A plate-et *Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System* készülékben 42°C-on inkubáltam 60 percig, majd 5 perces 70°C-on tartással állítottam le a reakciót.

Összetevő	Mennyiség
hígított kontroll RNS	2 µl
oligod(T) ₁₈ primer	1 µl
5x reaction buffer	4 µl
RiboLock RI	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid RT	1 µl
nukleázmentes víz	3 µl

9. táblázat: a reverz transzkripció reakciómixének összetétele

Közvetlenül ezután a PCR lépéshez a reverz transzkripció elegyet használtam templátnak. Ebből 5-5 µl-t kihígítottam 2000-szeresére, majd a PCR-hez a 10. táblázatban található reakciómixet állítottam össze.

Komponens	Mennyiség
SYBR 2x Mastermix (<i>PCRBIO #PB20.11-50</i>)	41 µl
Forward GAPDH primer	2,5 µl
Reverz GAPDH primer	2,5 µl
Nukleázmentes víz	30 µl

10. táblázat: a cDNS szintézis PCR lépéséhez tartozó reakciómix összetétele.

A mixet 72 µl-enként mértem szét a PCR-plate-en, majd hozzáadtam 6,5 µl 2000-szeresére hígított cDNS-t. Párhuzamosként az adott lyukból három egymás alatti helyre 25-25 µl-eket mértem szét, majd a 11. táblázat szerinti hőmérsékletprogram alapján zajlott a reakció.

Kezdeti denaturálás	94°C 3min	
Denaturálás	94°C 30s	35 ciklus
Primer tapadás	58°C 30s	
Lánchosszabbítás	72°C 45s	

11. táblázat: az RT-PCR hőmérsékletprogramja

3.4.4. LAMP reakció

A LAMP kísérleteket M13mp18 ssDNS templátra tervezett esszével végeztem: hat specifikus primert (FIP, BIP, F3, B3, LoopF, LoopB) és *Bst* *exo*(-) DNS-polimerázt (*Targetex #Bst2023/1*) használtam a reakcióhoz, amely 65°C-on zajlott. Az izoterm amplifikációt *4titude FrameStar* 96-lyukú plate-en végeztem *Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System* készülékkel.

A mérés előkészületeként nukleázmentes MQ vízben kihígítottam a 250 ng/μl-es M13mp18 ssDNS templátot (*NEB #N4040S*) 1000-szeres mértékben. Elkészítettem a 10 x primer mixet: a FIP és BIP primereket 16 μM, az F3 és B3 primereket 2 μM, a LoopF és LoopB primereket 4 μM koncentrációban tartalmazta a mix.

Kihígítottam a *Bst* *exo*(-) DNS polimeráz enzimet 0,05 mg/ml koncentrációjúra, a gp32-t hígítatlanul, 10 mg/ml-es koncentrációban adtam a reakcióelegyhez. Ezután állítottam össze a mastermixet, amelynek összetételét a 12. táblázat tartalmazza.

Komponens	Mennyiség
10x IsoFast A buffer (<i>PCRBIO #PB80.11</i>)	2,5 μl
5x IsoFast B buffer (<i>PCRBIO #PB80.11</i>)	5 μl
20x Fluorescent dye (<i>PCRBIO #PB80.11</i>)	1,25 μl
10x Primer mix	2,5 μl
Hígított templát M13mp18ssDNS	5 μl
10 mg/ml T4 gp32	0,375-3,75 μl
Nukleázmentes MQ víz	4-7,375 μl
Hígított <i>Bst</i> polimeráz	1 μl

12. táblázat: a LAMP mastermix összetétele.

Kimértem a plate-re a reakcióelegyeket, három-három párhuzamost mértem szét mindegyik mérési elegyből. Ezután 65°C-ra helyeztem a plate-et, és 15 másodpercenkénti fluoreszcens jeldetektálással monitoroztam az amplifikációt. A kiértékelést vizuálisan, illetve a Ct értékek összehasonlításával végeztem.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. T4 gp32 – DNS munkák

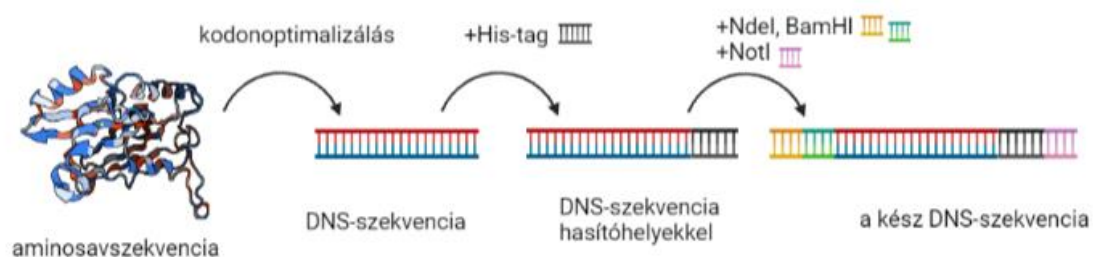
4.1.1. Tervezés

A szintetikus biológia korában az expressziós vektorok előállítása nem cDNS könyvtárból való klónozással történik, hanem a kívánt fehérje aminosavszekvenciájának ismeretében meg tudjuk tervezni az azt kódoló DNS-t, optimalizálva a választott gazdasejt kodonpreferenciájának megfelelően. Ezt a DNS-szekvenciát pedig szintetikusan elő lehet állítani.

A T4 gp32 fehérje aminosavsorrendjéhez forrásként az uniprot honlapját használtam (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03695/entry>). A későbbiekben megtermelt fehérjét Ni/NTA affinitáskromatográfiával terveztem tisztítani, így az aminosavszekvenciához hozzáillesztettem egy hat hisztidinből álló taget, amivel az említett lépés kivitelezhető.

Ezután több fordítást is készítettem aminosavról DNS-re az Integrated DNA Technologies kodonoptimalizáló eszközével (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>), amik közül kiválasztottam a megfelelőt. A kiválasztásban szerepet játszó tényezők a következők voltak: egyrészt ne tartalmazzon olyan hasítóhelyet a szekvencián belül, amelyet a DNS-munkák során használni kívántam, másrészt a <http://rna.tbi.univie.ac.at/> oldal által előrejelzett átíródott RNS szerkezet a legkevésbé képezzen önmagával másodlagos struktúrákat, amelyek a transzlációt gátolják.

Végül az így kapott His-taget viselő szekvencia elejére illesztettem az NdeI és a BamHI hasítóhelyeket, a NotI felismerési szekvenciáját pedig a végére (10. ábra). A pET24-b vektorba az NdeI-NotI, a pPAL8 vektorba pedig a BamHI-NotI enzimek hasítóhelyei közé terveztem beilleszteni a gp32 szekvenciáját.

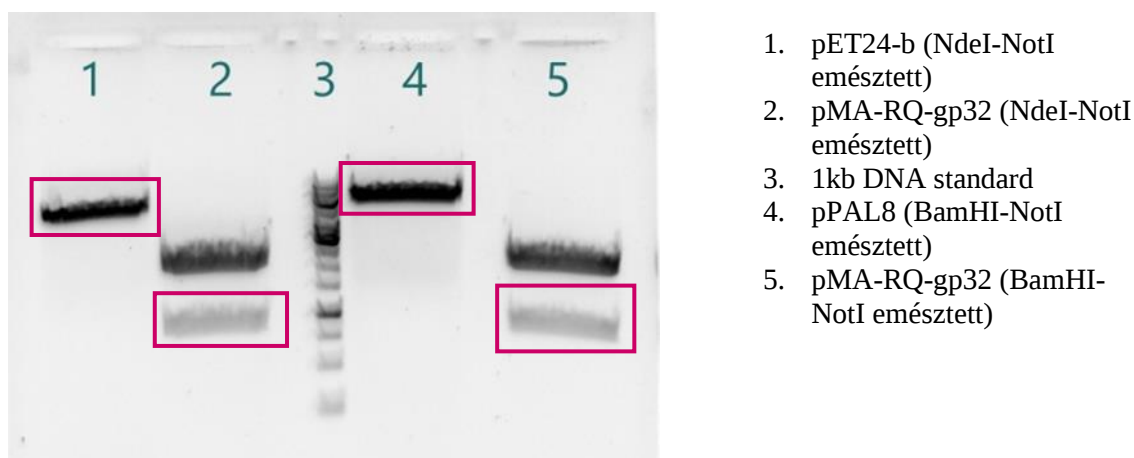


10. ábra: a gp32 szintetikus gén megtervezése. Az ábrát a BioRender online szoftver segítségével szerkesztettem.

4.1.2. Molekuláris klónozás

A szintetikus gént a ThermoFischer Scientific cégtől rendeltem meg, ami a pMA-RQ vektorba építve érkezett meg. Ezt először feloldottam nukleázmentes vízben, majd a két külön konstrukciónak megfelelően megemésztettem az inszert DNS-t, és elválasztottam 1% agaróz gélen. Kivágtam a 930 bázispár méretnél található fragmentumot, majd a gélből izoláltam a DNS-t.

Ugyanezt elvégeztem a vektorokkal, a pET24-b esetében az 5,2 kb méretű, a pPAL8 esetében pedig az 5,9 kb méretű DNS-darabot vágtam ki és izoláltam a gélből (11. ábra).



11. ábra: 1% agaróz gélen elválasztva az emésztett pET24-b és pPAL8 vektorok, valamint szintén emésztve a pMA-RQ vektorban található szintetikus gp32 gén. Bekeretezve láthatók azok a DNS-fragmentumok, amelyeket izoláltam a gélből.

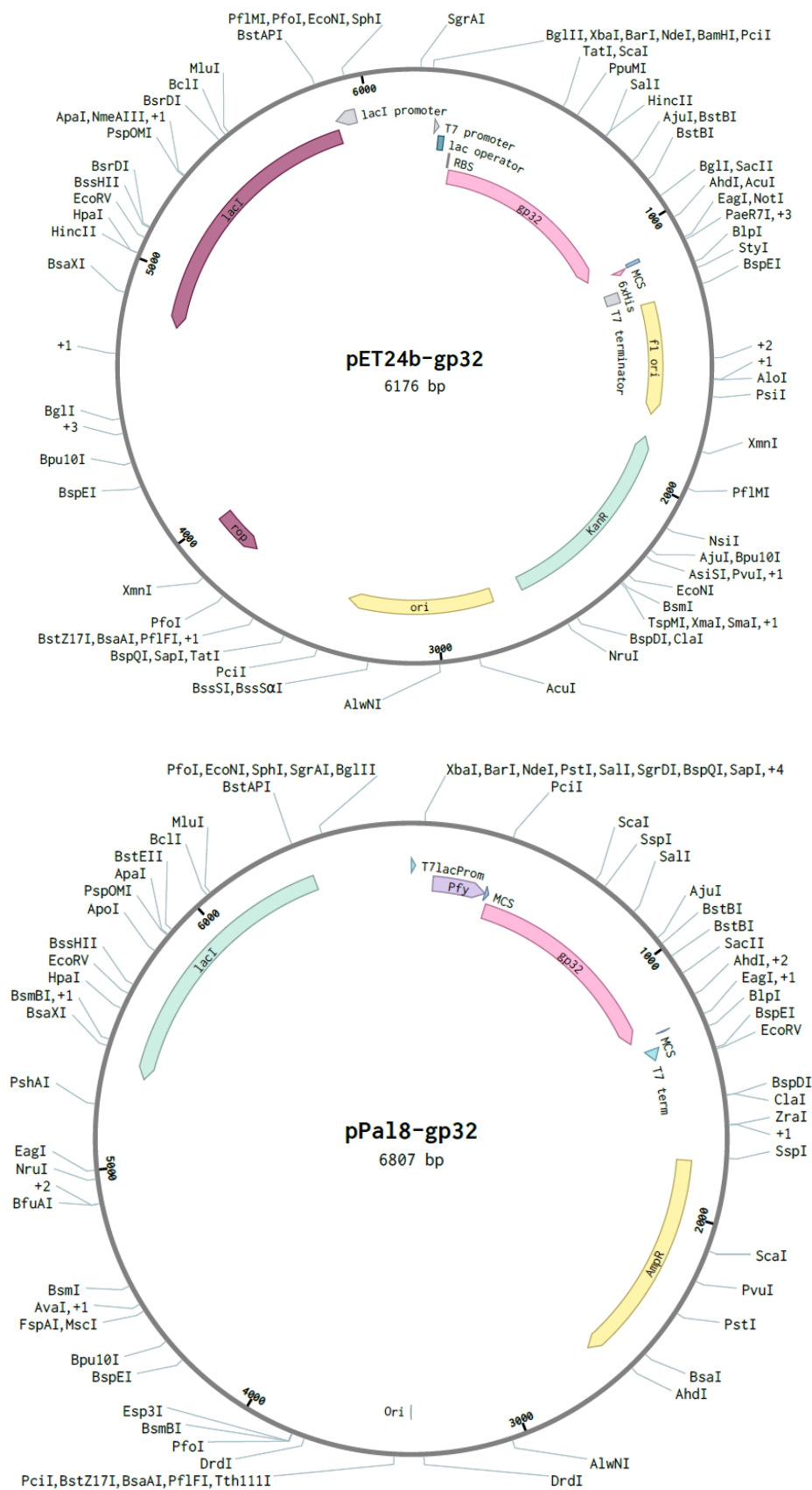
Az izolált DNS-eket 1:5 vektor:inszert moláris arányban T4 DNS ligáz segítségével összeillesztettem, külön a pET24-b, és külön a pPAL8-as konstrukciókat. A rekombináns klónok izolálása érdekében a ligátumokat transzformáltam *E. coli* TOP10 kompetens sejtekbe. A transzformációt hősokkal végeztem, majd szelekció céljából a pET24-b-gp32-vel transzformált sejteket kanamicines, a pPAL8-gp32-sejteket pedig ampicillines táptalajra szélesztettem. Másnap mindkét konstrukció 4-4 telepéről indítottam 5 ml kultúrát, amelyből plazmidot izoláltam. A rekombináns klónok ellenőrzése céljából az izolált plazmidokat megemésztettem a megfelelő restrikciós endonukleázokkal: a pET24-b-gp32-t NdeI és NotI enzimekkel, a pPAL8-gp32-t pedig BamHI és NotI enzimekkel. 1% agaróz gélen elválasztottam az emésztési elegyeket, és a számított méretű DNS-darabnak megfelelő helyeken jelentek meg a sávok, megerősítve, hogy sikeres volt a rekombináns plazmid DNS-ek elkészítése (12. ábra).



1. DNS standard
2. pET24-b-gp32 #3/1
3. pET24-b-gp32 #3/2
4. pET24-b-gp32 #5/1
5. pET24-b-gp32 #5/2
6. –
7. –
8. –
9. –
10. DNS standard
11. pPAL8-gp32 #3/1
12. pPAL8-gp32 #3/2
13. pPAL8-gp32 #5/1
14. pPAL8-gp32 #5/2
15. –
16. –

12. ábra: a rekombináns konstrukciók ellenőrző emésztése elválasztva 1% agaróz gélen. A felső minták tartoznak a pET24-b-gp32 konstrukcióhoz, az alsók pedig a pPAL8-gp32 konstrukcióhoz. A kihasított gp32 rész 0,9kb magasságában látható, a vektor pET24-b és pPAL8 pedig 5,2 és 5,9 kb magasságában, ami megfelel a várt értéknek.

A molekuláris klónozás helyességét DNS szekvenálással is ellenőriztem: mindkét konstrukció egy-egy mintája a Biomi Kft munkatársai által került szekvenálásra. A kapott szekvencia tökéletesen illeszkedett a tervezetthez, így további munkákra alkalmasnak bizonyult a minta. A két konstrukció vektortérképét a 13. ábra tartalmazza.



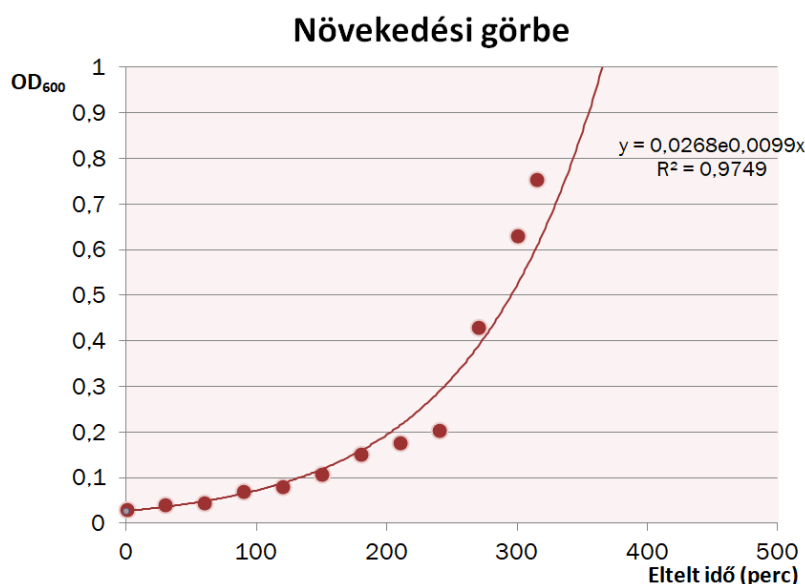
13. ábra: a pET24b-gp32 és a pPa18-gp32 konstrukció vektortérképe.

4.1.3. Fehérjeexpresszió

A T4 gp32 olyan fehérje, amelyet nagy mennyiségben tud termelni egy megfertőzött *E. coli* sejt, ezért akár olyan mértéket is elérhet az expresszió, hogy inklúziós testet képez a felhalmozódott fehérje. Ezért két *E. coli* törzsbe transzformáltam mindkét konstrukciót: a BL21 DE3 törzsbe, illetve a SoluBL21-be, amely tartalmaz egy dajkafehérjét kódoló DNS-szakaszt is, ami a fehérjék feltekeredését katalizálja, elősegítve ezáltal az oldható formában maradáást.

A transzformációt hősokkal végeztem, majd antibiotikus táptalajon szelektáltam a transzformáns telepeket. Négyféle expressziós rendszert készítettem: pET24-b-gp32 BL21 DE3 sejtekben, pET24-b-gp32 SoluBL21 sejtekben, illetve pPAL8-gp32 BL21 DE3 sejtekben, és pPAL8-gp32 SoluBL21 sejtekben.

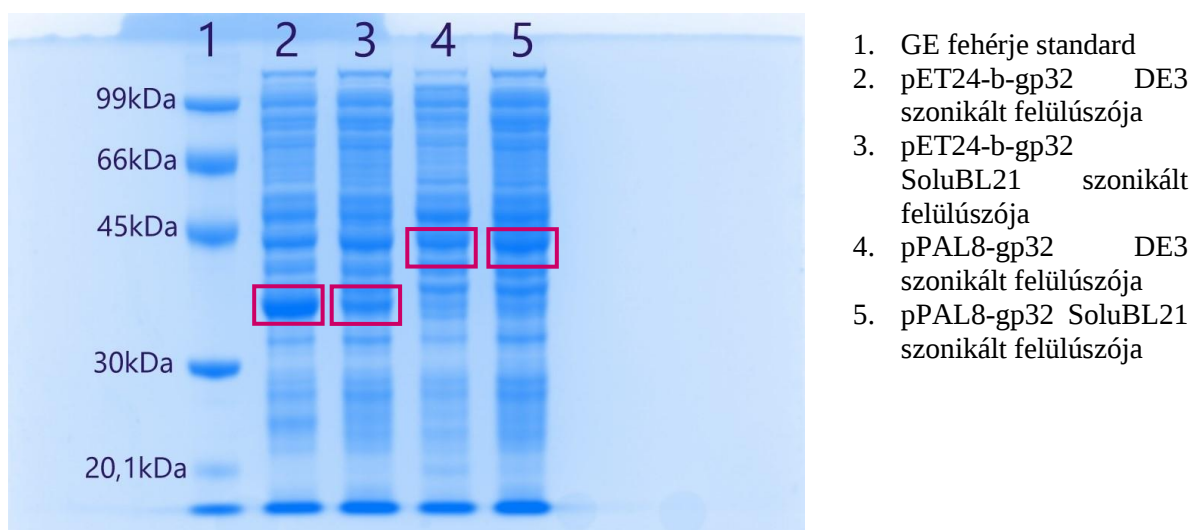
Abból a célból, hogy eldöntsem, a négy közül melyik rendszer termeli legnagyobb mennyiségben oldható formában a T4 gp32 fehérjét, mind a négy variációval végeztem termelést a következőképp: steril fogpiszkálóval beoltottam 20-20 ml antibiotikus LB-t, ezt starterként overnight növesztettem 37°C-on, 200 rpm rázatással. Másnap a starterből 1-1 ml-t hozzáadtam 100-100 ml szintén antibiotikumot tartalmazó LB-hez, amit $OD_{600}=0,6-0,8$ közötti értékig növesztettem, ami az exponenciális növekedés fázisának felel meg (14. ábra). Ekkor indukáltam a termelést: hozzáadtam a kultúrákhoz 1-1ml 95 mg/ml IPTG oldatot, majd 20 órán keresztül 25°C-on zajlott a termelés.



14. ábra: A pET24-b-gp32 plazmiddal transzformált BL21 DE3 sejtek növekedési görbéje.

A 20 óra letelte után 3,6 ml mintát vettem mindegyik kultúrából, 4000 g-n 5 percig centrifugáltam, leöntöttem a felülúszót, majd 360 ml PBS-ben szuszpendáltam a sejteket. Szonikáltam a sejtuszpenziót, majd centrifugálás után a felülúszót analizáltam 12,5% SDS-gélen (15. ábra).

A gp32 moláris tömege 33,5 kDa, a His-taggel kiegészített konstrukcióé 34,6 kDa. Ennél a méretnél a 15. ábra a 2-es számmal jelzett minta sávjában látszik jelentős mértékű overexpresszió, ami a pET24-b-gp32 BL21 DE3-ban történt termelésének felel meg. Azonos méretnél a 3-as számú mintában is látható sáv, ez azonban keskenyebb, mint a 2-es mintában. A 4-es és az 5-ös minta esetén a célfehérje közel 8 kDa-nal nagyobb, mivel a gp32 a profinity tag-et is hordozza. Ennél a két mintánál nehéz beazonosítani a fehérjét, mivel a kapott 43,3 kDa méretnél mind a négy konstrukció hasonló vastagságú sávot tartalmaz. A gélkép alapján a BL21 DE3 sejtek pET24-b-gp32 transzformánsa termelte a legtöbb szolubilis fehérjét, innentől ezzel folytattam a további munkát.



15. ábra: a gp32 termelése a négy expressziós rendszerben SDS gélelektroforézissel analizálva, ahol piros kerettel a feltételezhető célfehérje van jelölve.

4.1.4. A fehérje tisztítása

4.1.4.1. Affinitáskromatográfia

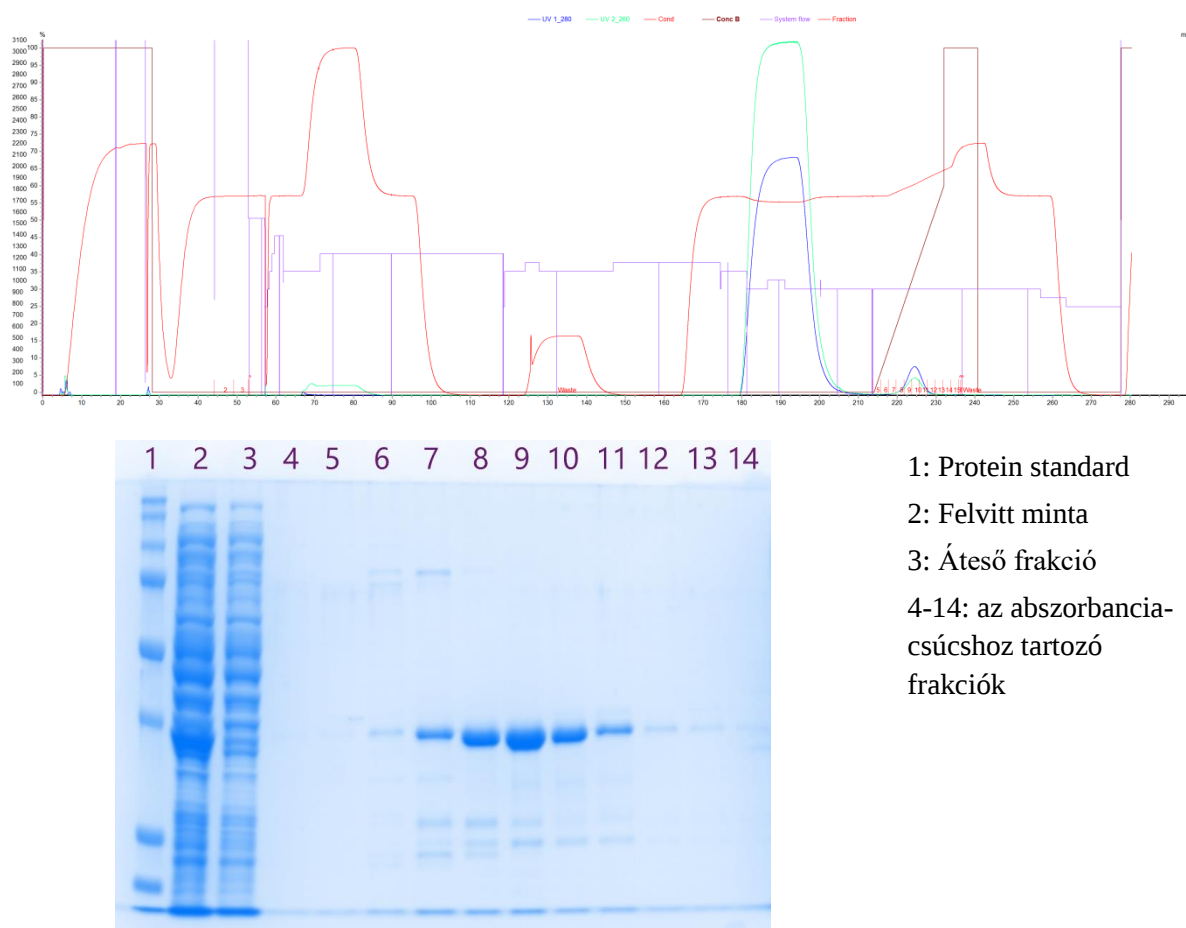
A szintetikus gén tervezésekor egy His-tag-et illesztettem hozzá a T4 gp32 fehérje C-terminális végéhez, így az első tisztítási lépésnek az affinitáskromatográfiát választottam.

A tisztításhoz előre töltött 1 ml térfogatú oszlopot, és ÄKTA Pure FPLC kromatográfot használtam.

Mintaelőkészítés: a termelést 20 óra után állítottam le, centrifugáltam a kultúrát 4000 g-n 25 percig, majd a sejteket felszuszpendáltam feltárási pufferben. A sejtfeltárást szonikálással végeztem: 4 x 30 másodpercig 70% intenzitással, 6 x cycle beállítással, miközben a mintát jégen tartottam.

Ezután centrifugáltam a szonikált sejtszuszpenziót 13000 g-n 35 percig, és a felülúszót 0,45 µm-es cellulóz acetát filteren keresztül leszűrtem. Szűrés után 1/100 térfogatrész 1 M imidazolt adtam a mintához, majd leellenőriztem a pH-ját.

A kromatográfiát az *Anyagok és módszerek* bekezdésben leírtak alapján végeztem. Regeneráltam az oszlopot, majd az ekvilibrálást követően felvittem a mintát, és B puffer gradienssel eluáltam a fehérjét. A gradiens alatt frakciókat szedtem, amelyekből gélmintákat készítettem, és elválasztottam 12,5% SDS gélen. A kromatogramot és a hozzá tartozó gélképet a 16. ábra tartalmazza.

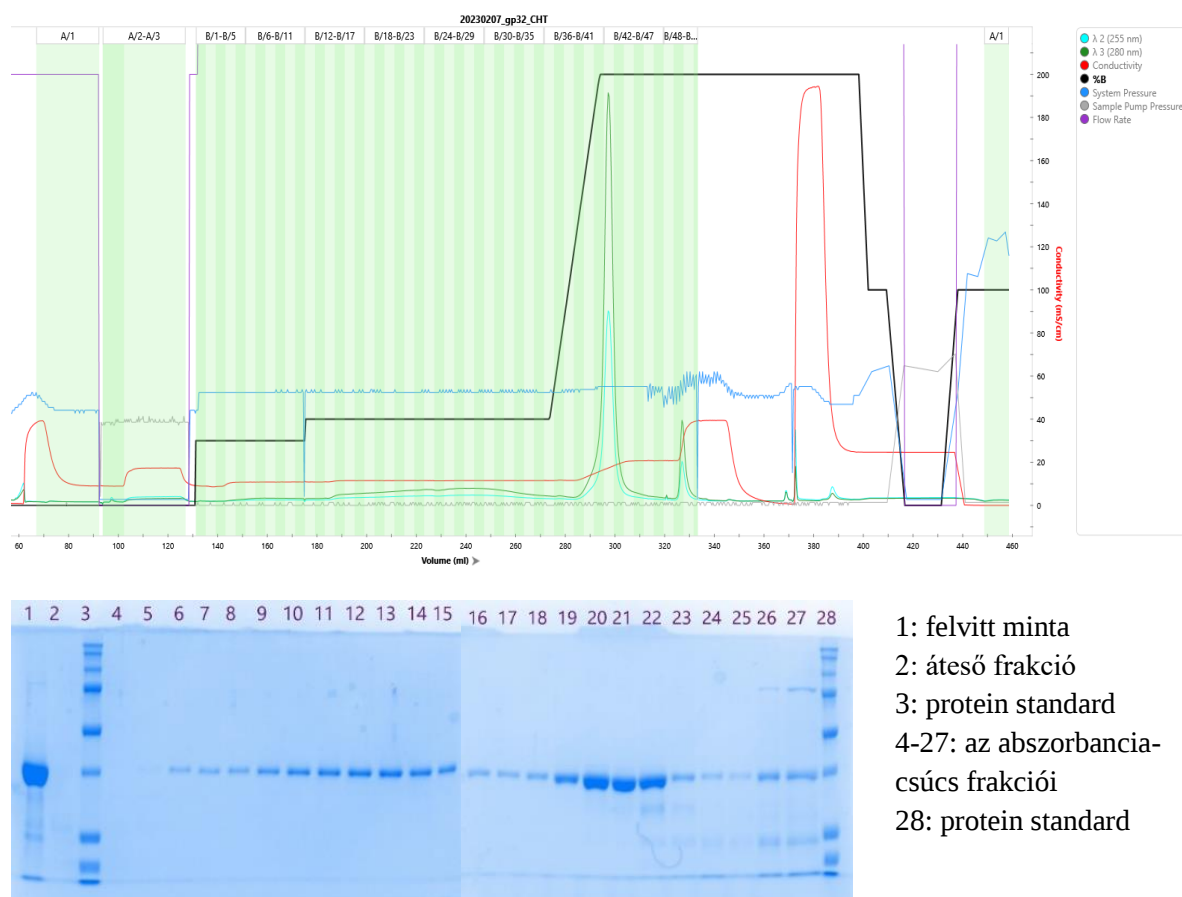


16. ábra: a T4 gp32 fehérje IMAC affinitáskromatográfiája. Fent látható a teljes kromatogram, alul pedig a csúchhoz tartozó minták 12,5% SDS gélen analizálva..

4.1.4.2. Mixed mode kromatográfia

Az affinitáskromatográfiához tartozó gél alapján elmondható, hogy a szennyezők legnagyobb részét el lehet távolítani ezzel az egyetlen lépéssel, a kellő tisztaság elérése érdekében azonban további tisztításra van szükség. Következő lépésként egy mixed-mode kromatográfiát alkalmaztam. Mivel ez a tisztítási módszer üzleti titoknak minősül, ezért a pontos paramétereit ez a dolgozat nem tartalmazza.

A kromatogramot és a hozzá tartozó gélképet a 17. ábra tartalmazza. A gél regeneráló frakcióhoz tartozó sávjában látszik, hogy a felvitt minta fő szennyezőitől sikeresen megtisztítottam a fehérjét.

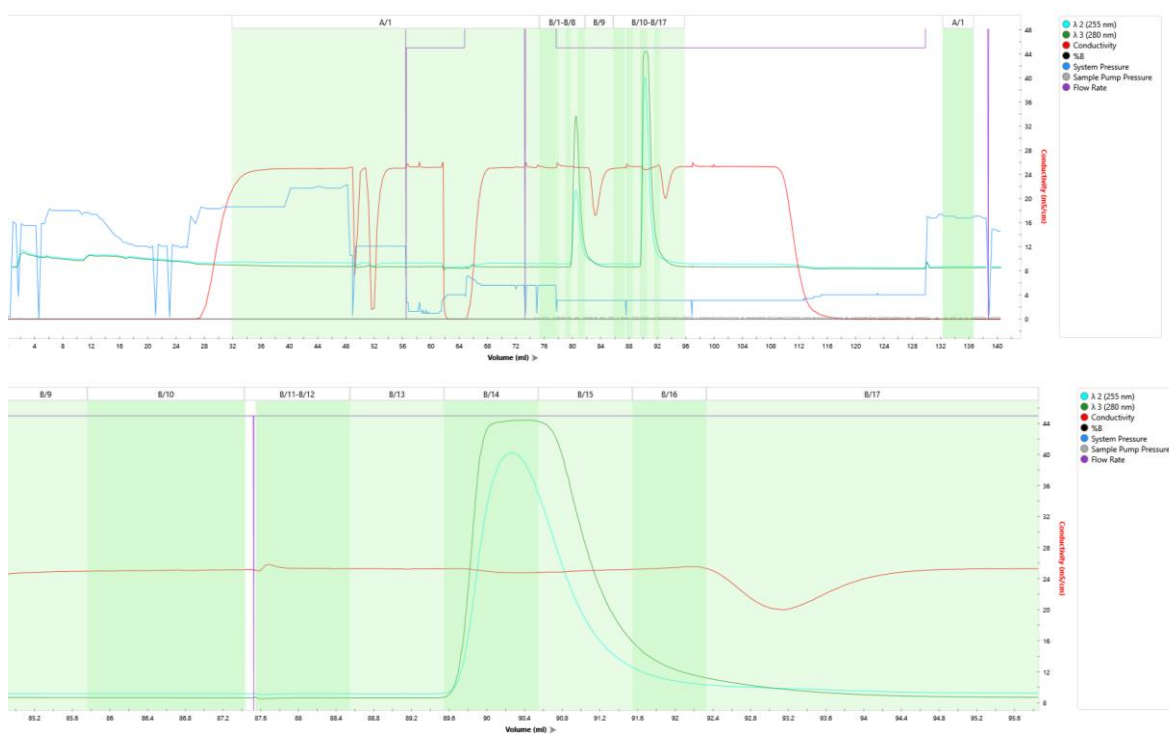


17. ábra: a T4 gp32 tisztítása mixed-mode kromatográfiával. A felső képen a tisztítás kromatogramja, az alsón pedig a hozzá tartozó gél képe látható.

4.1.4.3. Puffercsere gélzúréssel

Azért, hogy a gp32 fehérje megfelelő körülmények között és kísérletekre alkalmas formában legyen tárolva, egy puffercsere lépésre volt még szükség.

Mintaelőkészítés gyanánt összeöntöttem a T4 gp32-t tartalmazó frakciókat a mixed-mode kromatográfia után, és 10 kDa-os töményítőcellában annyira koncentráltam be a mintát, hogy a térfogata 1 ml alá csökkent. Az oszlopot ekvilibráltam gp32 St2x pufferrel, majd felvittem a mintát. Mostam szintén gp32 St2x pufferrel, ami alatt frakciókat szedtem. A puffercsere kromatogramját a 18. ábra tartalmazza. Az oszlopról lejött fehérjét betöményítettem a mintaelőkészítéshez hasonló módon 20 mg/ml koncentrációjúra, majd a térfogatával pontosan megegyező térfogatú glicerint adtam hozzá, hogy 10 mg/ml koncentrációjú legyen, így tároltam -20°C-on a fehérjét.



18. ábra: a T4 gp32 puffercserejének kromatogramja, és a további mérésekhez használt fehérjéhez tartozó abszorbanciacsúcs.

A fehérje tisztaságát analitikai módszerekkel ellenőriztem. Megállapítottam, hogy DNáz-, RNáz- és DNS-tartalma határérték alatt van, tisztasága megfelelő (a mérési fájlok nincsenek feltüntetve).

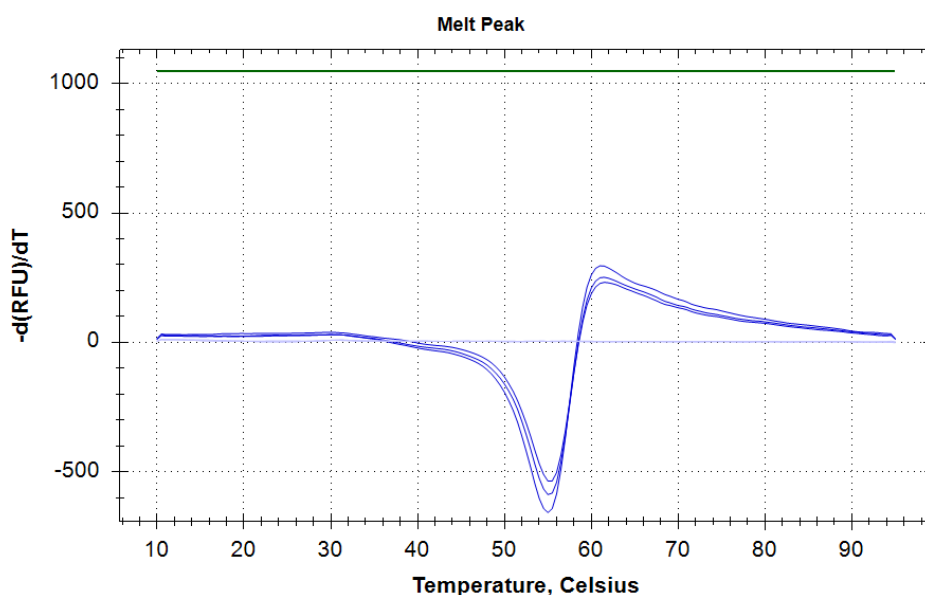
4.2. Kísérletek a tisztított fehérjével

4.2.1. DSF

A gp32 jellemzésére hődenaturációs kísérleteket (DSF-et) végeztem a fehérjével különböző körülmények között. A gp32 hőstabilitását a következő pufferekben vizsgáltam:

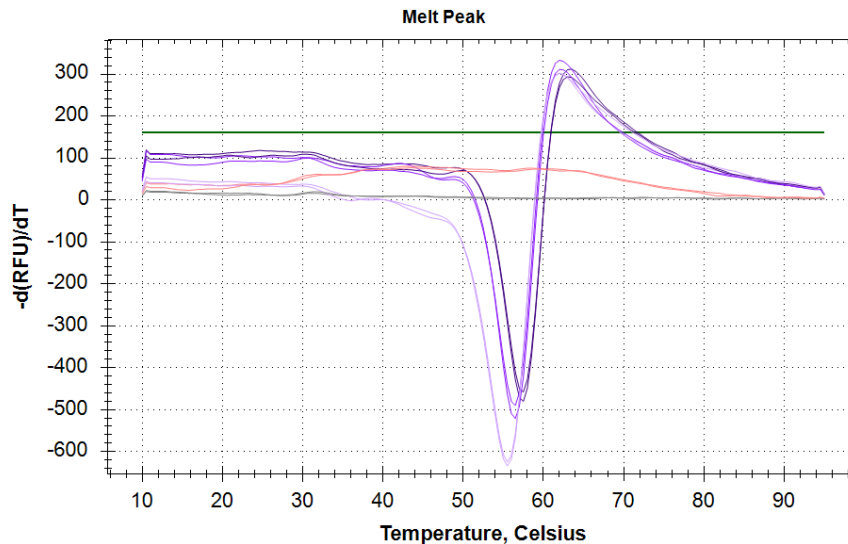
- MSOP012 (PCRBIO #MSOP012): a PCR reakciókhoz használt puffer
- 5 x Reaction Buffer (ThermoScientific™ #K1621): az RT-PCR reakciók puffere
- IsoFast™ Buffer (PCRBIO #PB80.11): LAMP kísérletek puffere

Az első mérés alapján azt állapítottam meg, hogy az MSOP012 pufferben 52,5°C a gp32 olvadási hőmérséklete (19. ábra)



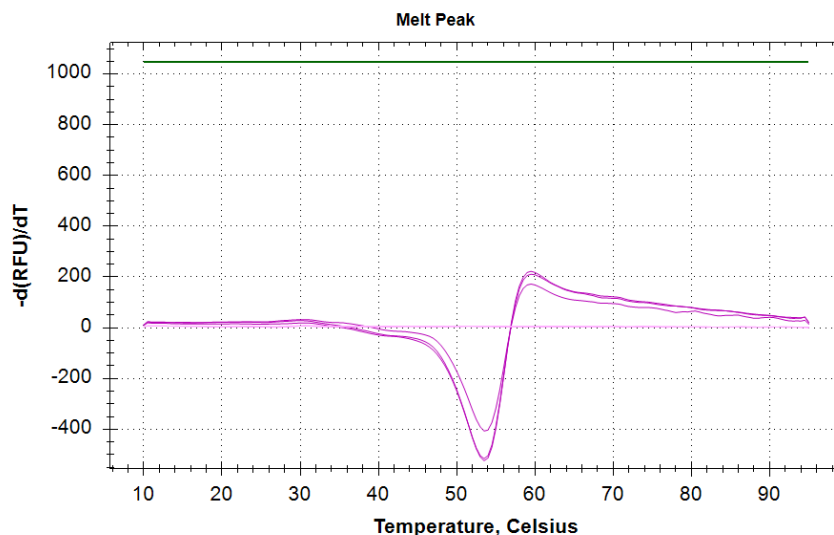
19. ábra: a gp32 olvadási görbéje MSOP012 pufferben. A három vonal három párhuzamos mérést jelent.

A DSF mérést olyan módon is elvégeztem, hogy egy 31 bázis hosszúságú egyes szálú DNS-t adtam a reakcióelegyhez 3 és 10 μ M-os mennyiségben, pufferként az MSOP012-t használva. A hozzáadott oligonukleotid hatására az olvadási pontok magasabb hőmérséklet felé tolódnak (20. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a gp32 és az ssDNS közötti kölcsönhatás stabilizálja a fehérjét. Hasonló eredményt publikáltak Rupesh és munkatársai (2014), akik herpesz szimplex vírus egyes szálú DNS-kötő fehérjéjének stabilitását vizsgálták oligonukleotid hozzáadásával szintén hődenaturációs módszerrel. Kutatásukban arra az eredményre jutottak, hogy az oligonukleotid hosszúsága és koncentrációja egyaránt befolyásolja a vizsgált fehérje olvadási hőmérsékletét (Rupesh et al., 2015)



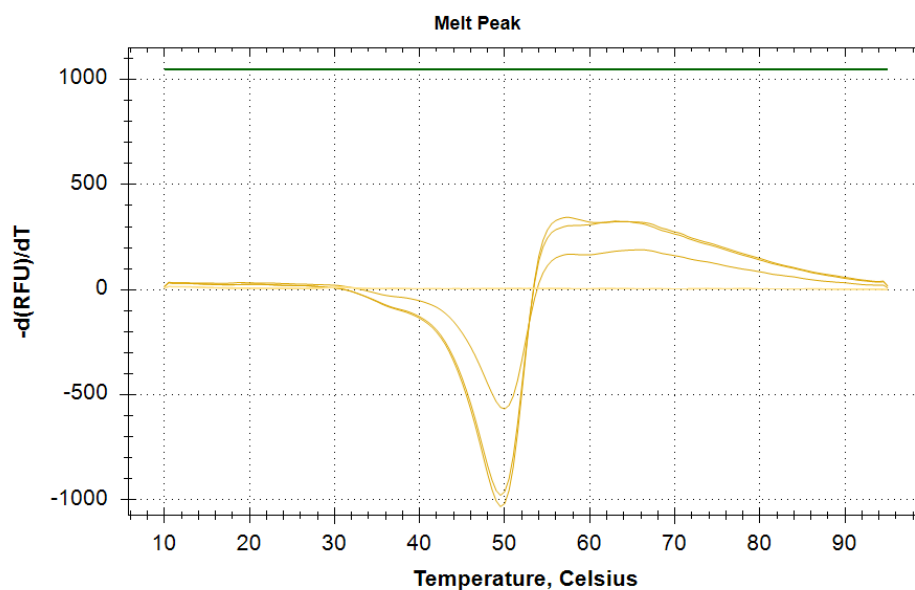
20. ábra: MSOP012 pufferben a T4 gp32 görbái különböző mennyiségű hozzáadott 31 bázisos egyes szálú oligonukleotid mellett. Szürke vonal: csak a tároló puffer (háttér); piros: csak az oligonukleotid; halványlila: T4 gp32 önmagában; közepes lila: 3 μ M koncentrációban hozzáadott oligonukleotid; sötétlila: 10 μ M koncentrációban hozzáadott oligonukleotid.

A reverz transzkripció PCR-hez alkalmazandó 5 x Reaction Bufferben a gp32 olvadási hőmérséklete 51,5-52°C között van (21. ábra). A reakciót a kit protokollja alapján 42°C-on terveztem elvégezni, ez összhangban van azzal is, hogy a DSF alapján ezen a hőmérsékleten az 5 x Reaction Bufferben a gp32 még teljesen feltekeredett formában van jelen, illetve azzal is, hogy korábbi kísérletek során is pontosan ezen a hőmérsékleten zajló reverz transzkripció hatékonyságán javított a hozzáadott gp32 (Chandler et al., 1998).



21. ábra: a gp32 olvadási görbéje az RT-hez használatos 5 x Reaction Bufferben. A három vonal három párhuzamos mérést jelöl.

A LAMP kísérlethez tartozó IsoFastA+B puffer „A” komponense tartalmaz olyan összetevőt, amely miatt nem értelmezhető a kapott görbe (az ábra nincs feltüntetve), a B pufferben viszont 50°C-os olvadási hőmérsékletet mértem (22. ábra). Mivel a LAMP reakció 65°C-on zajlik, ezért a folyamat közben a gp32 feltételezhetően nincs hatással az amplifikációra. Hozzáadásának a reakcióelegy összemérése előtt lehet szerepe, amennyiben a primerekkel vagy az egyes szálú DNS templáttal való előzetes kölcsönhatása jelentős az amplifikáció szempontjából.



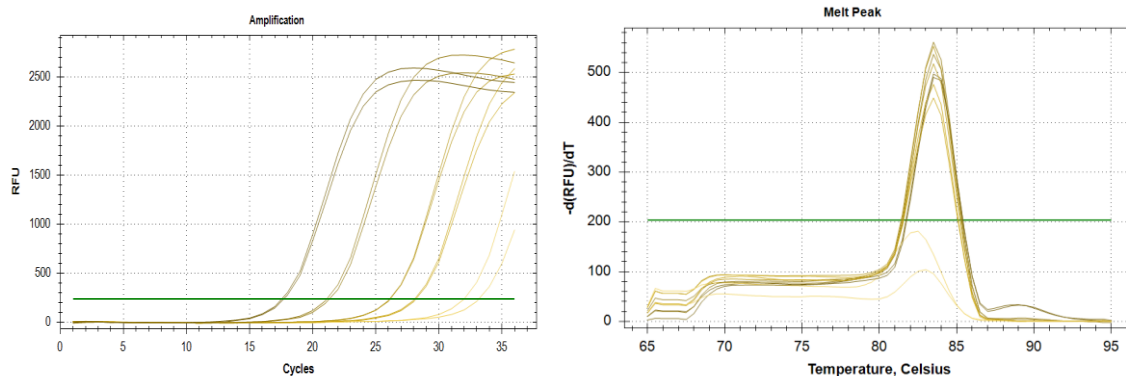
22. ábra: a gp32 olvadási görbéje IsoFast B pufferben. A három vonal három párhuzamos mérésnek felel meg.

4.2.2. „Hot-Start” PCR

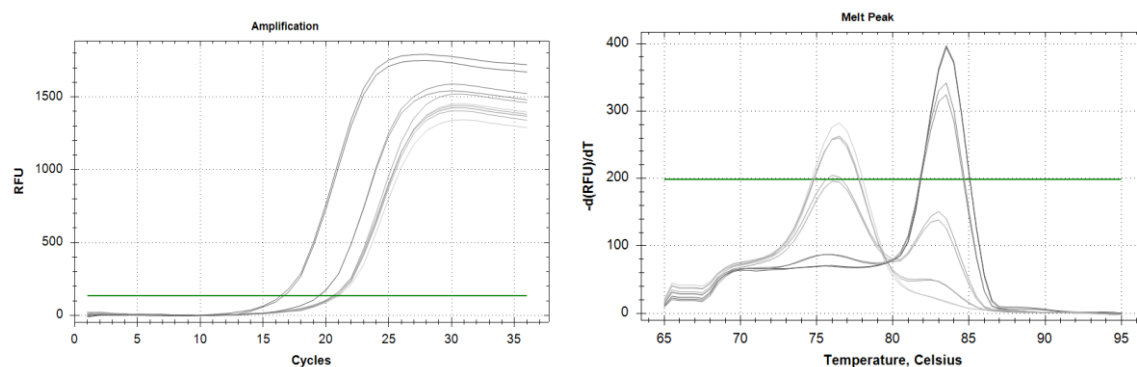
A „Hot-Start” kísérletek arra irányultak, hogy a tisztított gp32 fehérje betölti-e azt a funkciót, hogy alacsonyabb hőmérsékleten megkötí a primereket, a PCR reakció elindításakor történő fűtés során viszont elengedi azokat.

Három különböző koncentrációban adtam hozzá a fehérjét a mintákhoz: 1,5 µg, 3 µg, illetve 8 µg mennyiségben tartalmaztak az egyes 20 µl térfogatú reakciók gp32-t.

A minta mellett pozitív kontroll gyanánt elvégeztem az antitesttel történő „Hot-Start” PCR-t is (23. ábra), a negatív kontroll pedig nem tartalmazott se antitestet, se gp32-t (24. ábra). A negatív kontroll görbéi a templátkoncentráció csökkenésével a primer-dimerek képződése irányába tolódik el, a cDNS-re nézve leghígabb mintában specifikus termék nem keletkezik. A pozitív kontroll ábráján pedig az látszik, hogy a kiindulási templátkoncentrációtól függetlenül csak a specifikus termék képződik.

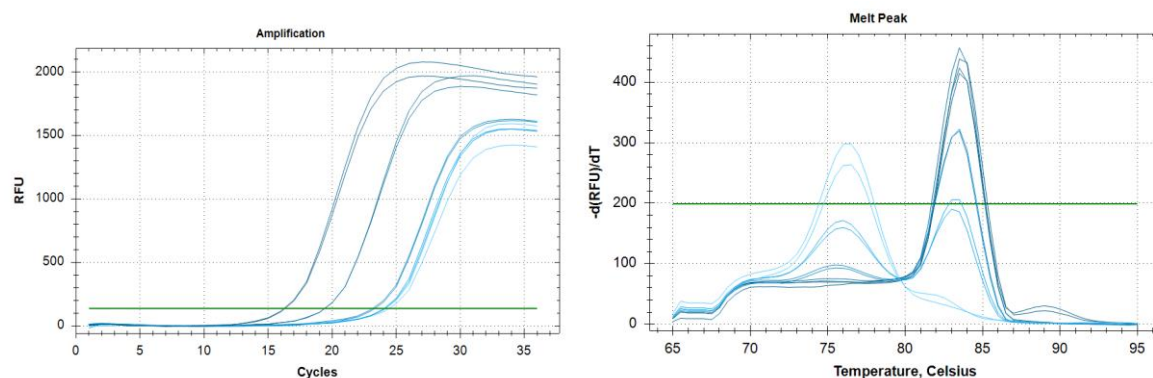


23. ábra: a HS antitesttel végzett pozitív kontroll amplifikációs és olvadási görbéi. Az egyre sötétebb sárga színű vonalak egyre töményebb cDNS templátkoncentrációt jelölnek.

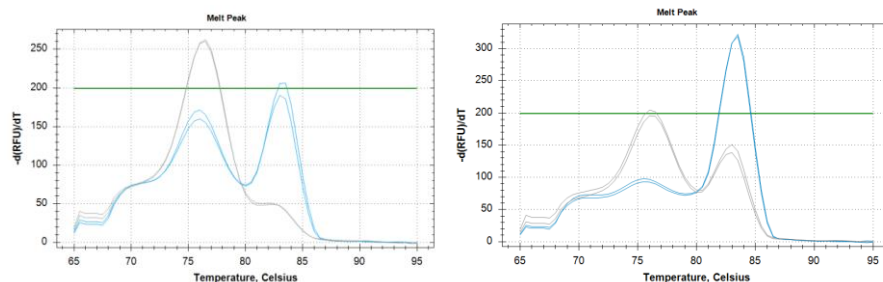


24. ábra: a negatív kontroll amplifikációs és olvadási görbéi. Az egyre sötétebb szürke vonalak egyre töményebb kiindulási cDNS templátkoncentrációt jelölnek.

Az 1,5 μg gp32-t tartalmazó kísérlet azt eredményezte, hogy az olvadási görbék nagyon hasonló mintázatot mutatnak, mint a negatív kontroll (25. ábra). Az azonos cDNS koncentrációhoz tartozó görbéket megvizsgálva látható, hogy nagyon kicsi hatása van az 1,5 μg mennyiségben hozzáadott gp32-nek (26. ábra).

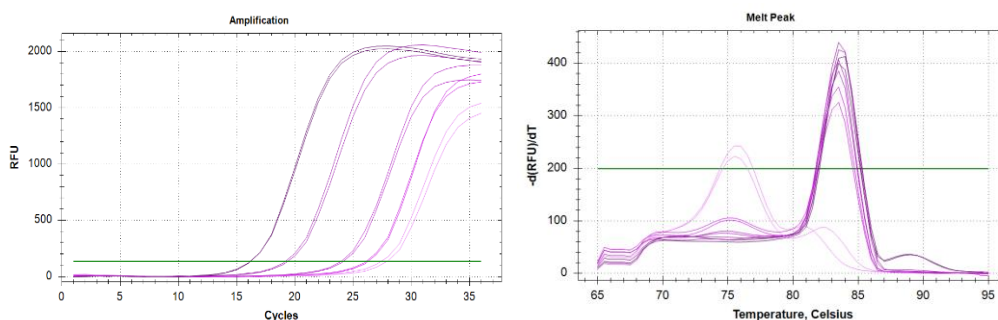


25. ábra: az 1,5 μg gp32-es minta amplifikációs és olvadási görbéi, ahol az egyre sötétebb kék vonalak egyre növekvő cDNS templátkoncentrációhoz tartoznak.



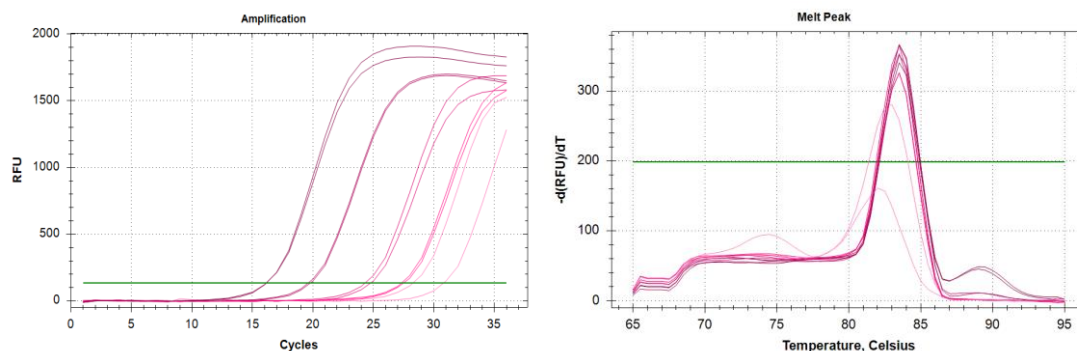
26. ábra: az 1,5 µg gp32-t tartalmazó minta olvadási görbéi a negatív kontroll azonos cDNS-hez tartozó mintáival együtt. Balra a leghígabb, 10000-szeres, jobbra pedig a 2500-szoros cDNS hígítás mintái vannak feltüntetve.

A 3 µg gp32-t tartalmazó minták olvadási görbéi viszont nagyon hasonló mintázatot mutatnak, mint amit az antitesttel végzett kontrollmérés eredményezett (27. ábra), a legkisebb kiindulási templátkoncentrációnál láthatunk csak egy igen alacsony csúcsot a primer-dimerek olvadási hőmérsékleténél.



27. ábra: a 3 µg gp32-t tartalmazó minta amplifikációs és olvadási görbéi, ahol az egyre sötétebb lila vonalak az egyre töményebb cDNS koncentrációt jelzik. A leghalványabb vonal az NTC.

A reakciónként 8 µg gp32-vel kiegészített PCR görbéi megegyeznek a pozitív kontroll mintázatával, primer-dimer csúcs nem látható a legkisebb templátkoncentrációnál sem (28. ábra).



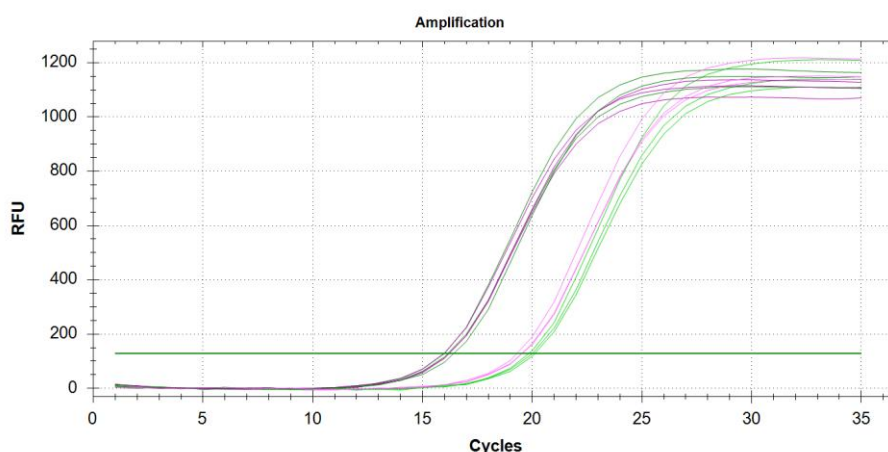
28. ábra: a 8 µg gp32-t tartalmazó minták görbéi. Az egyre sötétebb rózsaszín vonalak az egyre töményebb kiindulási cDNS koncentrációt jelölik.

A „Hot-Start” kísérleteim azonos mechanizmuson alapulnak, mint a Kubu által fejlesztett Hot-Start-IT® eljárás (Kubu, 2008a). Dolgozatomban azt mutattam be, hogy a T4 gp32 fehérjével is alkalmazható a módszer. Az esszé során a szabadalomtól eltérő kiértékelési módot alkalmaztam: a qPCR reakció után a specifikus termék és a primer-dimerek olvadási görbéit hasonlítottam össze, ebből tudtam következtetni a reakció hatékonyságára, míg a szabadalom agaróz gélelektroforézis módszerével értékeli ki a primer-dimerek és a specifikus termék jelenlétét és arányát.

A kísérletek alapján a T4 gp32 fehérje sikeresen alkalmazható a primerek reverzibilis megkötésére PCR reakciók specifitásnöveléseként.

4.2.3. Reverz transzkripció PCR

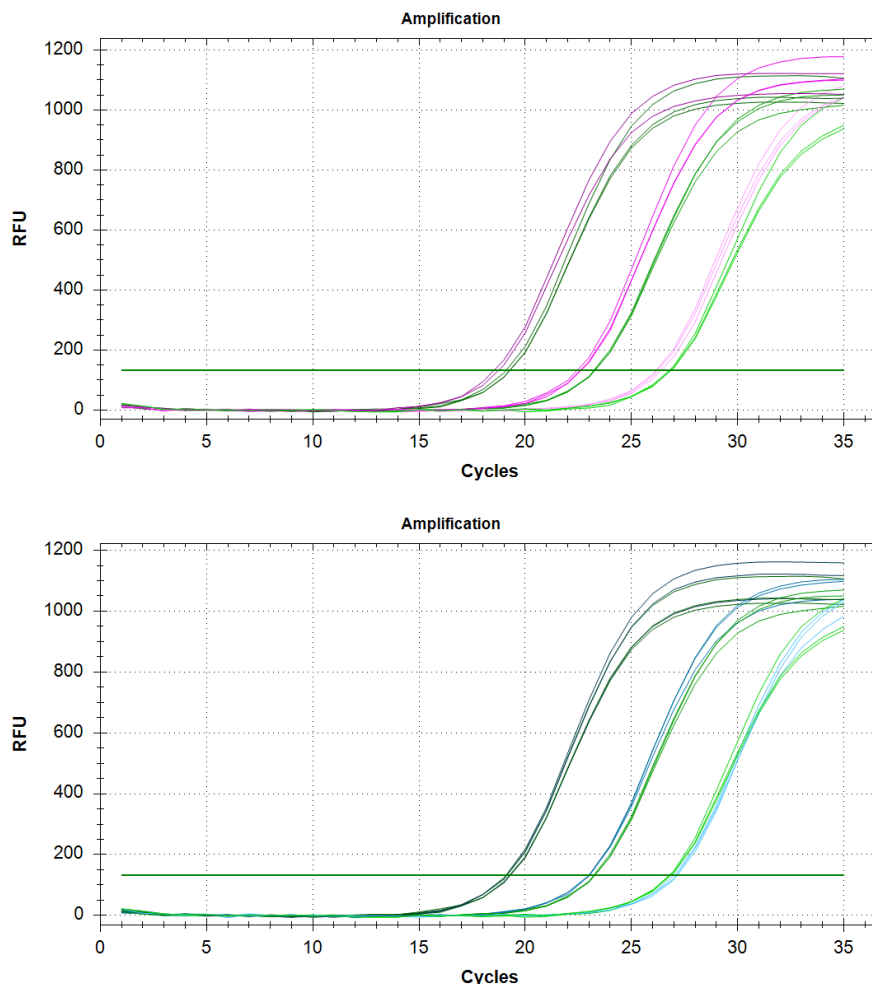
Az első kísérlet során a kiindulási RNS templátot 10- és 100-szoros hígításban alkalmaztam a reakcióban, és azt vizsgáltam, hogy milyen különbség tapasztalható a gp32-t nem tartalmazó, és az 1,5 µg gp32 hozzáadásával módosított esszé eredménye között. Az ábrán az látható, hogy a 10-szeres RNS templát hígítás esetén nincs kimutatható különbség, a 100-szorosára hígított RNS-sel végzett RT-PCR során viszont hamarabb indul el a gp32-vel kiegészített minta amplifikációja (29. ábra).



29. ábra: a gp32-vel kiegészített és a negatív RT-PCR amplifikációs görbéi. Zöld szín jelöli a kontrollt, rózsaszín pedig a gp32-t tartalmazó mintákat. A sötétebb árnyalat a töményebb kiindulási RNS koncentrációt jelzi.

Az ezt követő RT-PCR reakciók során tovább csökkentettem a kiindulási RNS mennyiségét: 100-, 1000-, és 10000-szeresére hígítottam a templátot. Ez esetben azt is vizsgáltam, hogy amennyiben a hozzáadott gp32 mennyiségét 5-szörösére növelem, kimutatható-e további javulás a folyamatban.

A kísérlet során azt tapasztaltam, hogy a megnövelt mennyiségű, 7,5 µg gp32 a reakcióra nem volt hatással, a kontrollal egyszerre indult el az amplifikáció. 1,5 µg gp32 hozzáadásához pedig az előző kísérlethez hasonló eredmény kapcsolható: az amplifikáció egyértelműen, de igen kis mértékben kezdődik hamarabb, mint a kontroll esetében (30. ábra).



30. ábra: a két különböző mennyiségű gp32-vel kiegészített és a negatív RT-PCR amplifikációs görbéi nagyobb mértékű templáthígítás esetén. Zöld szín jelöli a kontrollt, rózsaszín az 1,5 µg gp32-t tartalmazó mintákat (felső ábra), kék pedig a 7,5 µg gp32-t tartalmazó mintákat (alsó ábra). A sötétebb árnyalat a töményebb kiindulási RNS koncentrációt jelzi.

Az, hogy a gp32 hozzáadása az RT-PCR reverz transzkripció lépéséhez javítja a reakció érzékenységét és kihozatalát, már többek által felismert jelenség. A korábbi kutatások a PCR termék agaróz gélen való analizálásával állapították meg ezt a tényt (Boylan et al., 2001; Chandler et al., 1998; Villalva, 2001), munkám során qPCR reakciók amplifikációs görbéinek összehasonlításával tudtam az eredményeiket megerősíteni.

Azzal szemben, hogy a fent említett kutatások jelentős hatást kapcsoltak a hozzáadott gp32 fehérjéhez, munkám során igen enyhe változást tapasztaltam a kontrollhoz képest. Érdekes

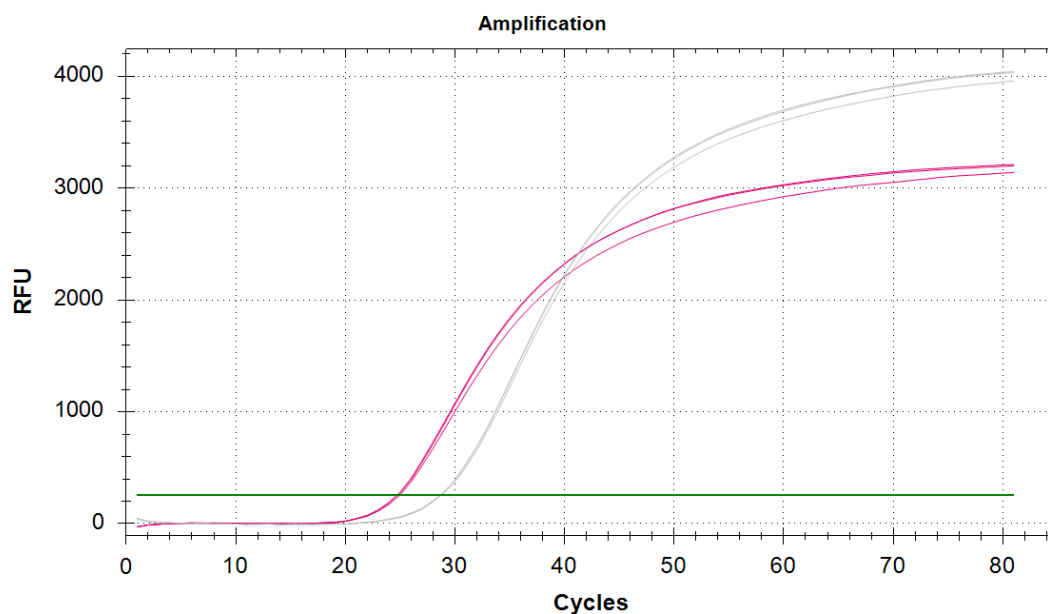
lehet alacsonyabb kiindulási templátkoncentráció alkalmazásával is elvégezni a kísérleteket, annak megállapítása érdekében, hogy a kimutatási határ környékén tapasztalható-e jelentősebb hatás. A jelen kétlépéses RT-qPCR kísérletekhez képest továbbá a gp32 egylépéses RT-qPCR reakciókra gyakorolt hatását is érdemes egy következő kutatás során megvizsgálni.

4.2.4. LAMP reakció

A DSF mérésnek megfelelően a LAMP reakciókkal kapcsolatban azt feltételeztem, hogy a gp32 nem fogja befolyásolni a folyamatot 65°C-on, ahol az amplifikáció zajlik. A reakcióelegy összemérésekor, illetve a 65°C-ra való felfűtés alatt azonban lehetséges, hogy van szerepe a hozzáadott SSB fehérjének, ugyanis a hat primer és maga a templát is egyes szálú DNS.

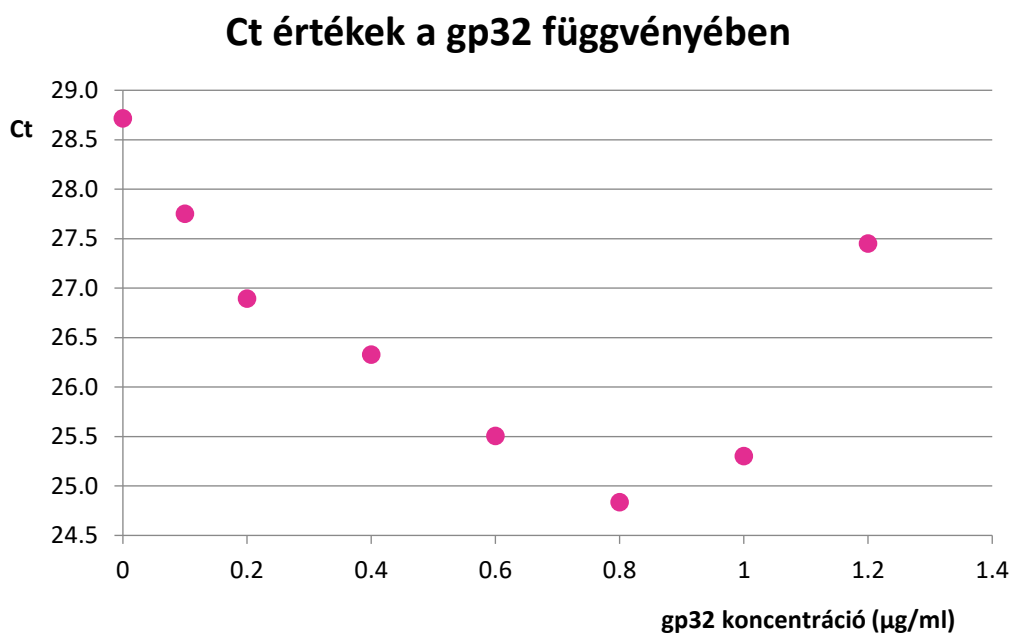
A reakcióhoz hét különböző mennyiségben adtam hozzá a gp32-t: 0,1, 0,2 0,4, 0,6, 0,8, 1, és 1,2 µg/ml végkoncentrációban tartalmzták a reakciómixek a fehérjét. A fentiekkel párhuzamosan kontrollként elvégeztem a kísérletet úgy is, hogy nem adtam hozzá a reakcióelegyhez gp32-t.

A kísérlet során azt tapasztaltam, hogy egy bizonyos koncentrációértékig a hozzáadott gp32 mennyiség növelése előre hozza az amplifikációt. A legerősebb hatást a 0,8 µg/ml-es gp32 koncentrációnál tapasztaltam, ezt és a kontrollt jellemző görbéket mutatja be a 31. ábra.



31. ábra: a LAMP reakció amplifikációs görbéi. A szürke a kontroll, a rózsaszín pedig a 0,8 µg/ml gp32-t tartalmazó mintához tartozik.

A LAMP reakció és a gp32 koncentráció közötti kapcsolat jellemzésére a cycle threshold (Ct, detektálási ciklus-küszöbérték) értéket használtam. A Ct azt mutatja meg, hogy mennyi az a ciklusszám, aminél az amplifikáció egyértelmű jelet ad, minél kisebb ez az érték, annál hamarabb kezdődött el a reakció. A 32. ábra a gp32 koncentráció függvényében ábrázoltam a hozzájuk tartozó Ct értéket.



32. ábra: Ct értékek a hozzájuk tartozó gp32 koncentráció függvényében. Az egyes pontok a három párhuzamos mérés átlagát jelenítik meg.

A Ct-koncentráció összefüggés szerint 0,8 µg/ml koncentráció környékén van az optimális gp32-koncentráció az adott kísérleti körülmények mellett. Ennél nagyobb mennyiség esetén fellép egy gátló mechanizmus. Juma és munkatársai RPA-val kapcsolatban hasonló összefüggést találtak a hozzáadott gp32 és a reakció hatékonysága között. Tanulmányukban igen szűk tartományban mutatkozott a gp32-koncentráció optimálisnak, ez az RPA esetében kulcsfontosságú, mivel a gp32 a működési mechanizmusához tartozik a folyamatnak (Juma et al., 2021). LAMP reakciók esetében a gp32-vel való hatékonyságnövelés akkor lehet jelentős, amennyiben még gyorsabb amplifikációt vagy alacsonyabb kimutatási határt tud eredményezni. Ennek feltérképezéséhez további kutatásra van szükség.

5. Összefoglalás

A különböző nukleinsav-amplifikációs technikák alapvető eszközei napjaink molekuláris biológiájának. A módszer fejlesztése folyamatosan zajlik: újabb és újabb megközelítésekről keletkeznek publikációk, hogy milyen módon tegyék érzékenyebbé, szelektívebbé, gyorsabbá és egyszerűbbé a folyamatokat. Dolgozatomban különböző típusú amplifikációs reakciók hatékonyságának növelését tűztem ki célul a T4 gp32 egyes szálú DNS-kötő fehérje alkalmazásával.

A gp32 előállításához először génszinten terveztem meg a fehérjét, majd a szintetikus gént expressziós vektorba klónoztam, és rekombináns *E. coli* sejtekkel termeltem meg. Az előállított gp32-t a megfelelő tisztaság elérése érdekében kromatográfiás eljárással tisztítottam.

A tisztított gp32 hőstabilitását DSF méréssel jellemeztem. Megállapítottam, hogy a fehérje különböző pufferekben eltérő hőmérsékleten denaturálódik, illetve hogy egyes szálú oligonukleotid hozzáadásával nő a hőstabilitása.

Ezen mérési információk alapján végeztem el a „Hot-Start” PCR kísérleteket, amelyek az ismert, Taq-polimerázt blokkoló antitesten alapuló mechanizmus helyett egy másik megközelítésben zajlottak: a reakció összemérése és felfűtése alatt a primereket kötötte meg a gp32. A PCR reakció hőmérsékletére felmelegítve a rendszert a gp32 fehérje denaturálódik, így a felszabaduló primerek be tudták tölteni az eredeti funkciójukat anélkül, hogy például egymáshoz hibridizálva aspecifikus termékeket hozzanak létre. Ez az eljárás sikeresnek mutatkozott, és alternatív mechanizmusként alkalmazható „Hot-Start” reakciók kivitelezésére.

Kétlépéses RT-PCR reakcióhoz is hozzáadtam gp32-t hatékonyságnövelés céljából. Ebben az esetben azt tapasztaltam, hogy hamarabb kezdődött el az amplifikáció, ha gp32-t adtam hozzá a reakcióhoz.

A LAMP izotermális amplifikáció esetében a hozzáadott gp32 akár 4 ciklussal is korábbi amplifikációt eredményezett, az adott kísérleti körülmények mellett ez az idő egy percet jelentett.

Összességében a gp32-ről kísérleteim és az irodalmi adatok alapján kimondható, hogy alkalmas PCR reakciók hatékonyságának növelésére, ehhez azonban jelentős mennyiségben kell hozzáadni a reakcióhoz, ami akadályozhatja széleskörű elterjedését.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Zsoltnak a szakmai támogatásért, illetve a lehetőségért, hogy ezt a témát dolgozhattam fel a diplomamunkámban. Köszönet illeti belső konzulensemét, Dr. Hegedűs Attilát, aki befogadta a témát, köszönöm a tőle érkezett támogató és pozitív visszajelzéseket, amelyekkel munkámat kísérte. Szeretném köszönetemet kifejezni továbbá a Targetex Kft munkatársainak, akik meglátásaikkal, javaslataikkal, humorukkal és segítőkészségükkel járultak hozzá ennek a műnek a létrejöttéhez. Közülük külön Kiss Benjaminnak vagyok hálás a Hot-Start kísérletek ötletéért, Bulyáki Évának a Hot-Start és RT-PCR kísérletekben való segítségért, Petres Melindának pedig a LAMP reakciókhoz kapcsolódó tapasztalatainak megosztásáért.

Végül szeretném köszönetemet kifejezni családomnak és barátaimnak, akik a diplomamunka-írás miatt tőlük távol töltött időt szeretettel és türelemmel tudták elfogadni.

7. Irodalomjegyzék

- Abu Al-Soud, W., & Rådström, P. (2000). Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 38, Issue 12).
- Alberts, B. M., & Frey, L. (1970). T4 Bacteriophage Gene 32: A Structural Protein in the Replication and Recombination of DNA. *Nature*.
- Boylan, S., Honda, S., Hjelmeland, L. M., & Handa, J. T. (2001). *An Optimized Protocol for First Strand cDNA Synthesis from Laser Capture Microdissected Tissue*. <http://dir.nichd.nih->
- Burke, R. L., Alberts, B. M., & Hosoda, J. (1980). Proteolytic removal of the COOH terminus of the T4 gene 32 helix-destabilizing protein alters the T4 in vitro replication complex. *Journal of Biological Chemistry*, 255(23), 11484–11493. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)70317-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)70317-2)
- Casas-Finet, J. R., Fischer, K. R., & Karpel, R. L. (1992). Structural basis for the nucleic acid binding cooperativity of bacteriophage T4 gene 32 protein: The (Lys/Arg)3(Ser/Thr)2 (LAST) motif. In *Biochemistry* (Vol. 89).
- Chandler, D. P., Wagnon, C. A., & Bolton, H. (1998). Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and Its Implications for Quantitative RT-PCR. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 2).
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., & Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 20, Issue 7).
- Dang, C., & Jayasena, S. D. (1996). Oligonucleotide Inhibitors of Taq DNA Polymerase Facilitate Detection of Low Copy Number Targets by PCR. In *J. Mol. Biol* (Vol. 264).
- D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J. A., Eron, J. J., Gorczyca, P., & Kaplan, J. C. (1991). Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, Issue 13).
- Giedroc, D. P., Keating, K. M., Williams, K. R., & Coleman, J. E. (1987). The Function of Zinc in Gene 32 Protein from T4. In *Biochemistry* (Vol. 26).
- Giedroc, D. P., Keating, K. M., Williams, K. R., Konigsberg, W. H., & Coleman, J. E. (1986). Gene 32 protein, the single-stranded DNA binding protein from bacteriophage T4, is a zinc metalloprotein (DNA replication). *Biochemistry*, 83, 8452–8456.
- Hurley, J. M., Chervitz, C. A., Jarvis, T. C., Singer, B. S., & Gold, L. (1993). Assembly of the bacteriophage T4 replication machine requires the acidic carboxy terminus of gene 32 protein. *J. Mol. Biol.*
- Jose, D., Weitzel, S. E., Baase, W. A., Michael, M. M., & Von Hippel, P. H. (2015). Mapping the interactions of the single-stranded DNA binding protein of bacteriophage T4 (gp32) with DNA lattices at single nucleotide resolution: Polynucleotide binding and cooperativity. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9291–9305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv818>
- Jose, D., Weitzel, S. E., Baase, W. A., & Von Hippel, P. H. (2015). Mapping the interactions of the single-stranded DNA binding protein of bacteriophage T4 (gp32) with DNA lattices at single nucleotide resolution: gp32 monomer binding. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9276–9290. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv817>
- Juma, K. M., Takita, T., Ito, K., Yamagata, M., Akagi, S., Arikawa, E., Kojima, K., Biyani, M., Fujiwara, S., Nakura, Y., Yanagihara, I., & Yasukawa, K. (2021). Optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 567, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.023>

- Kaijalainen, S., Karhunen, P. J., Lalu, K., & Lindstrom, K. (1993). An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 21, Issue 12).
- Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P. D., & Chenchik, A. (1994). TaqStart Antibody: 'hot start' PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. In *Biotechniques* (pp. 1134–1137).
- Kermekchiev, M. B., Tzekov, A., & Barnes, W. M. (2003). Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. *Nucleic Acids Research*, 31(21), 6139–6147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg813>
- Kreader, C. A. (1996). Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 62, Issue 3).
- Kreuzer, K. N., & Brister, J. R. (2010). Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: A review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives. In *Virology Journal* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-358>
- Kubu. (2008a). *Novel hot start nucleic acid amplification* (Patent No. EP2366802A1).
- Kubu, C. J. (2008b). *HotStart-IT®: A Novel Hot Start PCR Method Based on Primer Sequestration* (Vol. 44, Issue 2). www.biotechniques.com/BioTechniques1275
- Lamar, R. T., Schoenike, B., Vanden Wymelenberg, A., Stewart, P., Dietrich, D. M., & Cullen, A. D. (1995). Quantitation of Fungal mRNAs in Complex Substrates by Reverse Transcription PCR and Its Application to *Phanerochaete chrysosporium*-Colonized Soil. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 61, Issue 6).
- Lebedev, A. V., Paul, N., Yee, J., Timoshchuk, V. A., Shum, J., Miyagi, K., Kellum, J., Hogrefe, R. I., & Zon, G. (2008). Hot Start PCR with heat-activatable primers: A novel approach for improved PCR performance. *Nucleic Acids Research*, 36(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn575>
- Lee, S.-Y., Bollinger, J., Bezdicek, D., & Ogram, A. (1996). Estimation of the Abundance of an Uncultured Soil Bacterial Strain by a Competitive Quantitative PCR Method. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 62, Issue 10).
- Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 98, pp. 19–35). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- Nai, Y. H., Doeven, E. H., & Guijt, R. M. (2022). An improved nucleic acid sequence-based amplification method mediated by T4 gene 32 protein. *PLoS ONE*, 17(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265391>
- Nuovo, G. J., Gallery, F., Horn, R., Macconnell, P., & Bloch, W. (1993). *Importance of Different Variables for Enhancing In Situ Detection of PCR-amplified DNA*.
- Nyitrai, L., Alexa, A., Fodor, K., Garai, Á., Glatz, G., Radnai, L., Rapali, P., Szakács, D., Várkuti, B., & Zeke, A. (2013). *Géntechnológia és fehérjemérnökség elektronikus-jegyzet*.
- Panaccio, M., & Lew, A. (1991). PCR based diagnosis in the presence of 80/ (v/v) blood. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, Issue 5).
- Pant, K., Karpel, R. L., & Williams, M. C. (2003). Kinetic regulation of single DNA molecule denaturation by T4 gene 32 protein structural domains. *Journal of Molecular Biology*, 327(3), 571–578. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00153-0)
- Rapley, R. (1994). *Enhancing PCR Amplification and Sequencing Using DNA-Binding Proteins* Ralph Rapley.

- Rouzina, I., Pant, K., Karpel, R. L., & Williams, M. C. (2005). Theory of electrostatically regulated binding of T4 gene 32 protein to single- and double-stranded DNA. *Biophysical Journal*, 89(3), 1941–1956. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.063776>
- Rupesh, K. R., Smith, A., & Boehmer, P. E. (2015). Ligand induced stabilization of the melting temperature of the HSV-1 single-strand DNA binding protein using the thermal shift assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(4), 604–608. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.145>
- Schwarz, K., Hansen-Hagge, T., & Bartram, C. (1990). *Improved yields of long PCR products using gene 32 protein*. Oxford University Press 1079.
- Shamoo, Y. (1995). Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA_SHAMOO_1995. *Letters to Nature*.
- Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): The better sibling of pcr? In *Cells* (Vol. 10, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- Spicer, E. K., Williams, K. R., & Konigsberg, W. H. (1979). T4 gene 32 protein trypsin-generated fragments. Fluorescence measurement of DNA-binding parameters. *Journal of Biological Chemistry*, 254(14), 6433–6436. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50385-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50385-9)
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Villalva, C. (2001). Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system_VILLALVA_2001. *BioTechniques*.
- Villemain, J. L., Ma, Y., Giedroc, D. P., & Morrical, S. W. (2000). Mutations in the N-terminal cooperativity domain of gene 32 protein alter properties of the T4 DNA replication and recombination systems. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31496–31504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002902200>
- Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2017). Isothermal Amplification of Long, Discrete DNA Fragments Facilitated by Single-Stranded Binding Protein. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09063-x>
- Zhu, X., Wang, X., Han, L., Chen, T., Wang, L., Li, H., Li, S., He, L., Fu, X., Chen, S., Xing, M., Chen, H., & Wang, Y. (2020). Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112437>

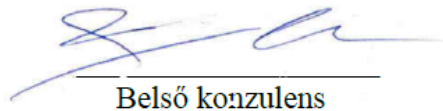
KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A Rác Piroska Anna hallgató (Neptun azonosítója: EZG7YE) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: 2023. év április hó 26. nap



Belső konzulens

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Rácz Piroska Anna
A Hallgató Neptun kódja: EZG74E
A dolgozat címe: Egyes szálú DNS-kötő fehérje alkalmazása
PCR reakciók során
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Növénybiotechnológiai Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023 év április hó 27 nap


Hallgató aláírása