

A DIPLOMADOLGOZAT TARTALMI KIVONATA

Egyes szálú DNS-kötő fehérje alkalmazása PCR reakciók során

Rácz Piroska Anna

Mezőgazdasági Biotechnológia szak, MSc, levelező tagozat

Növénybiotechnológia Tanszék

Belső témavezető: Dr. Hegedűs Attila, csoportvezető (Növénybiotechnológia Tanszék)

Külső témavezető: Dr. Lőrincz Zsolt, igazgató (Targetex Kft)

Napjaink molekuláris biológiájának alapvető eszközei a különböző nukleinsav-amplifikációs technikák. Ezek a módszerek folyamatosan fejlődnek, ezzel párhuzamosan az igény is növekszik az egyre gyorsabb, nagyobb kihozatalú, érzékenyebb, specifikusabb és egyszerűbb technikák iránt. Dolgozatom céljából azt tűztem ki, hogy különböző amplifikációs reakciók hatékonyságát növeljem a T4 gp32 egyes szálú DNS-kötő fehérje hozzáadásával.

A gp32-t rekombináns *E. coli* sejtekkel termeltem meg, és kromatográfiás eljárással tisztítottam. A tisztított fehérje hőstabilitását DSF méréssel jellemeztem. Megállapítottam, hogy a gp32 különböző pufferekben különböző hőmérsékleten denaturálódik, illetve a hőstabilitása nagyobb, ha a vizsgált oldathoz egyes szálú DNS-t adunk.

Ezek alapján végeztem el a „Hot-Start” PCR kísérleteket, amely a következő mechanizmuson alapult: a reakció összeállítása és a felfűtés alatt a gp32 a primereket megkötötte, majd a polimerizáció hőmérsékletén denaturálódott, elengedve a primereket, és a reakció le tudott játszódni. Ez a módszer sikeresnek mutatkozott, így a Taq-polimerázt blokkoló antitesten alapuló eljárás alternatívájaként alkalmazható „Hot-Start” reakciók megvalósítására.

Kétlépéses RT-PCR esetén a gp32 hozzáadásával enyhén hamarabb kezdődik el az amplifikáció, mint a gp32-t nem tartalmazó kontroll esetében. Egylépéses RT-PCR-re gyakorolt hatás vizsgálatát nem tartalmaz a dolgozat, ez további kutatást igényel.

A LAMP izotermális amplifikáció esetében a hozzáadott gp32 akár 4 ciklussal is korábbi amplifikációt eredményezett.

Összességében a kísérleteim és a szakirodalmi adatok alapján a gp32 fehérjéről elmondható, hogy PCR reakciók hatékonyságának növelésére alkalmas, ehhez azonban jelentős mennyiségben kell hozzáadni a reakcióhoz, ami akadályozhatja széleskörű alkalmazását.