

Pannon Egyetem
Országos Tudományos Diákköri
Konferencia
2024



**Vírusfertőzés kimutatásában használható
fehérjék fejlesztése**

Készítette: Kozma Bence Tamás
Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka
Konzulens: Szigeti Márton Géza

2024

Tartalmi összefoglaló

A Nyugat-nílusi láz (West Nile Fever, WNF) olyan szúnyogcsípéssel terjedő vírusos megbetegedés, amely nagyon elterjedt meleg éghajlatokon. Napjainkban azonban a klímaváltozásnak köszönhetően a mérsékelt éghajlaton, így hazánkban is egyre gyakrabban mutatható ki. A WNF elsősorban embereket, lóféléket, illetve egyes madarakat betegít meg, és a fertőzés kimenetele az emberekesetében egészen a halálos meningoencephalitisig (az agyvelő és az agyhártya együttes gyulladása) is terjedhet. A halálozási ráta az életkor növekedésével emelkedik, illetve mivel nem létezik ellene védőoltás, fontos a korai diagnózis felállítása [1],[2].

Az immunanalitikai eljárások napjainkban jelentősége egyre nagyobb, mind az orvosi diagnosztikában, mind a molekuláris biológiai kutatásokban. Ezek a módszerek a specifikus molekulafelismerésen alapulnak, melyre a fehérjék kiválóan alkalmasak. Az egydoménes antitestek (sdAb) egyetlen polipeptid láncból álló stabil antitestek, amelyek baktériumokban gazdaságosan állíthatók elő, genetikailag könnyedén módosíthatók, a sejtfalon áthatolnak, illetve hozzáférhetnek rejtett kötőhelyekhez is. Az egydoménes antitestek lehetséges orvosi alkalmazásainak feltérképezése egy jelenleg is intenzíven kutatott terület [3].

Az immunanalitikai eljárások kolorimetriás detektálására gyakran alkalmaznak peroxidáz enzimeket. Közülük a szója-aszkorbát-peroxidáz APEX2 enzim nagy előnye, hogy akkor is megtartja funkcionális aktivitását, ha redukáló környezetben (pl.: baktérium citoszolban) fejeződik ki a sejten belül, mivel nem tartalmaz diszulfidhidat, így könnyebb előállítani.

Munkám során olyan antitest-peroxidáz fúziós fehérjét hoztam létre, mellyel a vírus detektálására egyszerűsített immunanalitikai eljárások fejleszthetők.

Kulcsszavak: Nyugat-nílusi láz, egydoménes antitest, APEX2, immunanalitika, laterális áramlási teszt

Abstract

West Nile Fever (WNF) is a viral disease transmitted by mosquito bites that is very common in warm climates. Nowadays, however, due to climate change, it is becoming more common in temperate climates, including our country. WNF mainly affects humans, equids and some birds, and the outcome in humans can range up to fatal meningoencephalitis (inflammation of the brain and meninges). Mortality rates increase with age and, in the absence of a vaccine, early diagnosis is important [1],[2].

Today, immunoanalytical techniques are becoming increasingly important, both in medical diagnostics and in molecular biology research. These methods are based on specific molecular recognition, for which proteins are ideally suited. Single-domain antibodies (sdAb) are stable antibodies consisting of a single polypeptide chain, which can be produced economically in bacteria, can be easily genetically modified, can penetrate the cell wall and can access hidden binding sites. Exploring the potential medical applications of single-domain antibodies is an area of intense research [3].

Peroxidase enzymes are often used for colorimetric detection in immunoassays. Among them, the soybean ascorbate peroxidase APEX2 enzyme has the great advantage of retaining its functional activity when expressed in a reducing environment (e.g. bacterial cytosol) inside the cell, as it does not contain a disulfide bridge and is therefore easier to produce.

In my work, I have created an antibody-peroxidase fusion protein that can be used to develop simplified immunoassays for virus detection.

Keywords: West-Nile fever, single-domain antibody, APEX2, immunoassay, lateral flow test

Tartalom	
Tartalmi összefoglaló	2
Abstract	3
Rövidítések jegyzéke	3
1. Irodalmi áttekintés.....	4
1.1. Nyugat-nílusi láz	4
1.2. Antitestek	4
1.2.1. Egydoménos antitestek.....	6
1.3. APEX2.....	8
1.4 Fúziós fehérjék.....	8
2. Célkitűzés	10
3. Anyagok és módszerek.....	11
3.1. Szükséges anyagok és eszközök	11
3.2. Bakteriális klónozás és fehérje expressziós rendszerek	11
3.4. Ni-affinitás kromatográfia	12
3.5. Gélelektroforézis	14
3.5.1. Agaróz gélelektroforézis.....	14
3.5.2. Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)	15
4. Eredmények és értékelésük.....	15
4.1. Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje előállítása.....	15
4.1.1 Az aWNV-APEX2-6HIS gén szekvencia megtervezése	16
4.1.2 Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje termeltetési körülményeinek optimalizálása	16
4.1.3. Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje nagyobb léptékű termeltetése.....	18
4.1.4. Az aWNV-APEX2-6HIS kromatográfiás elválasztása.....	19
4.1.5. A különböző indukciós körülmények hatásának összehasonlítása.....	19
4.2 aWNV-6HIS és APEX2-6HIS fehérjék előállítása	24
4.2.1. aWNV-6HIS fehérjét kódoló plazmid előállítása.....	24
4.2.2. APEX2-6HIS fehérjét kódoló plazmid előállítása.....	25
4.2.3 Ellenőrző emésztés és DNS szekvenálás	26
4.2.4. aWNV-6HIS és APEX2-6His fehérjék termeltetési körülményeinek optimalizálása	27
4.3 A termeltetett fehérjék aktivitásának vizsgálata	29
4.3.1 Az aWNV-APEX2-6HIS és az APEX2-6HIS peroxidáz aktivitásának igazolása....	29
4.3.2 Az aWNV-6HIS és az aWNV-APEX2-6HIS víruskötő képességének igazolása	30
5. Összefoglalás	32

Hivatkozások	33
A. Függelék	36
A.1. LB (Luria-Bertani) tápoldat	36
A.2. LB táptalaj	36
A.3. SOC oldat	36
A.4. PBS puffer	36
A.5. FPLC 'A' puffer	36
A.6. FPLC 'B' puffer	37
A.7. SDS-poliakrilamid-gél	37
B. Függelék	37
B.1. Az aWNV-APEX2-6His fehérje tulajdonságai	37
B.2. Az aWNV-6His fehérje tulajdonságai	37
B.3. Az APEX2-6His fehérje tulajdonságai	38
Köszönetnyilvánítás	38

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol név	Magyar név
APEX2	Soybean ascorbate peroxidase 2	Szójabab aszkorbát-peroxidáz 2
aWNV	West Nile virus single domain antibody	Nyugat-nílusi vírust kötő egydoménes antitest
CDR	Complementarity-determining regions	Komplementaritást meghatározó régiók
CH	Constant heavy chain	Konstans nehéz lánc
DAB	3,3' Diaminobenzidine	3,3' Diaminobenzidin
FR	Framework	Vázrendszer
IPTG	Isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranoside	Izopropil- β -d-1-tiogalaktopiranozid
LFA	Lateral flow assay	Laterális áramlási teszt
NC	Nitrocellulose membrane	Nitrocellulóz membrán
PBS	Phosphate buffered saline	Foszfát pufferált sóoldat
PCR	Polimerase chain reaction	Polimeráz láncreakció
pET	Plasmid for expression by T7 RNA polymerase	Plazmid a T7 RNS polimerázzal történő fehérje expresszióhoz
rpm	Round per minute	Percenkénti fordulatszám
sdAb	Single domain antibody	Egydoménes antitest
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
VHH	Single variable domain on a heavy chain	Egyetlen variábilis domén a nehézláncon
WNF	West Nile Fever	Nyugat-nílusi láz
WNV	West Nile Virus	Nyugat-nílusi láz vírusa

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Nyugat-nílusi láz

A globális éghajlatváltozás következtében számos olyan eredetileg meleg éghajlaton őshonos vérszívó (pl. ázsiai tigrisszúnyog, japán bozótszúnyog, koreai szúnyog) rovar jelenik meg a mérsékelt éghajlaton, amelyek különböző betegségeket terjeszthetnek. Emiatt új, eredetileg trópusi területeken terjedő betegségek jelennek meg a mérsékelt éghajlaton, így hazánkban is, mint például a dengue-láz, a Lyme-kór, vagy a nyugat-nílusi láz.

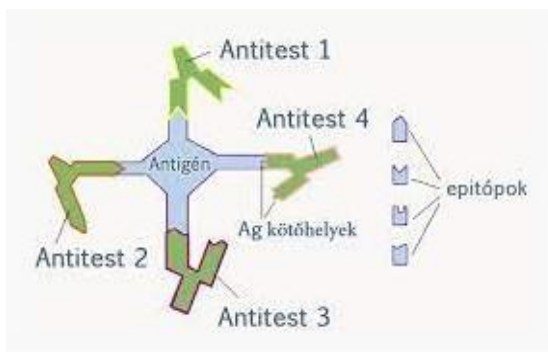
A nyugat-nílusi láz egy általában valamilyen vérszívó, pl. szúnyog vagy kullancs közvetítésével gyorsan terjedő, flavivírus okozta megbetegedés, amely ritkább esetekben vérátömlesztés, szervátültetés vagy anyáról gyermekre történő átvitel útján is terjedhet. Ez a vírus honos Afrikában, Amerikában, Ausztráliában, Ázsiában, Európában és nagy járványokat okozott a múltban. Az egyes betegségek kezelése változó lehet, de nincs specifikus antivirális gyógyszer a legtöbb flavivírus okozta fertőzés kezelésére. Természetes rezervoár (természetes tároló, hosszú időn keresztül biztosítja a kórokozó fennmaradását) gazdái a madarak. A legtöbb esetben az emberi WNV (nyugat-nílusi vírus) fertőzés csak szubklinikai (tünetmentes), de a klinikai fertőzések kimenetele a WNF-től egészen a halálos végkifejletű *meningoencephalitis*-ig (az agyvelő és az agyhártya együttes gyulladása) is terjedhet. Az életkor növekedésével a halálozási ráta is nő, és jelenleg nincs ellene engedélyezett vakcina. A betegség kezelése általában a tüneti kezelésre és a szövődmények megelőzésére irányul, mivel jelenleg nincs specifikus gyógymód ellene, fontos a pontos diagnózis felállítása már korai stádiumban [1].

A nyugat-nílusi láz nagy gondokat okoz a mezőgazdaságban is, elsősorban a lótaratók körében. A lovagnál a betegség klinikai tünetei közé tartozhat az étvágytalanságtól kezdve a részleges bénuláson és a görcsökön keresztül akár a kóma és a halál is [2].

1.2. Antitestek

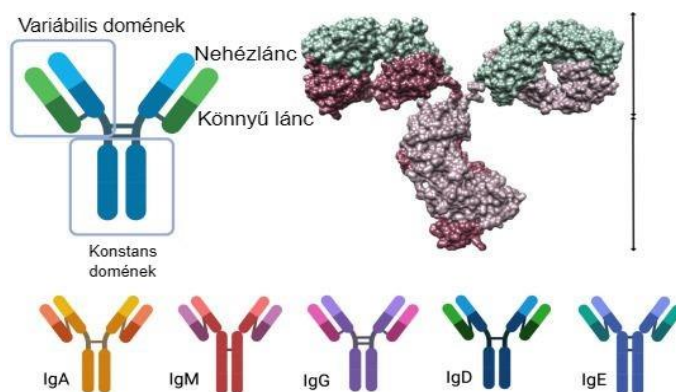
Az antitesteknek specifikus molekulafelismerési tulajdonságuk van, amely alapján képesek az antigéneket megkötni, ezáltal eltávolítani azokat a szervezetből. A közönséges antitestek, vagy más néven immunglobulinok nagyméretű glikoprotein molekulák, amelyek gyakorlatilag az immunrendszer alapját jelentik, és az élő szervezetek valamely

adott idegen anyag, az úgynevezett antigén jelenlétére termelik válaszként. A szervezet számára sokféle anyag lehet antigén, például mérgező anyagok, vagy a betegségeket okozó organizmusok. Amikor egy idegen anyag újra bekerül a szervezetbe, akkor azt az immunrendszer felismeri, mivel ezeknek a felületén több jól felismerhető felületi régió, úgynevezett epitóp (1. ábra) is lehet, melyekre korábban szintetizálódott antitest [4],[5].



1. ábra Antitest-antigén kölcsönhatás szemléltetése [6]

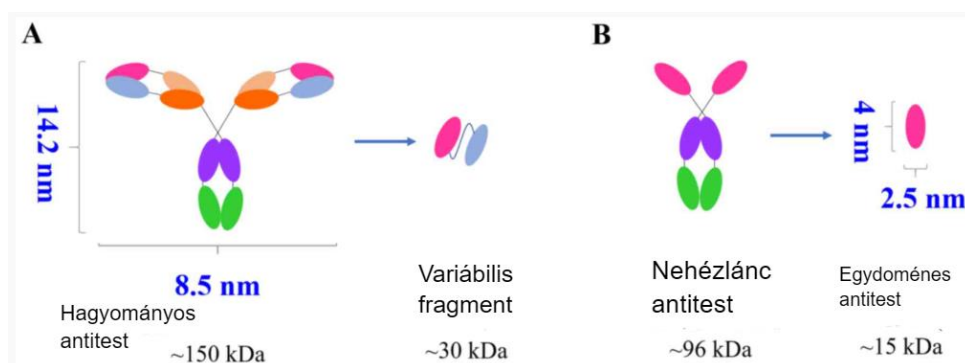
Egy antigénhez több antitest is hozzákapcsolódhat, amik vagy más epitópokat ismernek meg, vagy ugyanahhoz az epitóphoz kötődnek eltérő erősséggel. Ezeket a különböző nyiroksejtek által termelt különféle antitesteket nevezzük poliklonális antitesteknek. Az antitestek felépítése a 2. ábrán látható. Az antitesteknek valójában csak egy kis részlete a kötőhely, a többi része az úgynevezett komplementrendszer része. Ez a komplementrendszer annak a közelítőleg 20 fehérjének az együttese, amelyek inaktív állapotban a vérplazmában keringenek, de ha megfelelő inger érkezik (pl. az antitesthez kötődő antigén), akkor gyorsan aktiválódnak. Ezeknek a jelenléte aztán elősegíti a fagocitáló sejtek és az antigének találkozását is, és ilyen módon az immunválasz létrejöttét.



2. ábra Különböző típusú antitestek felépítése [7]

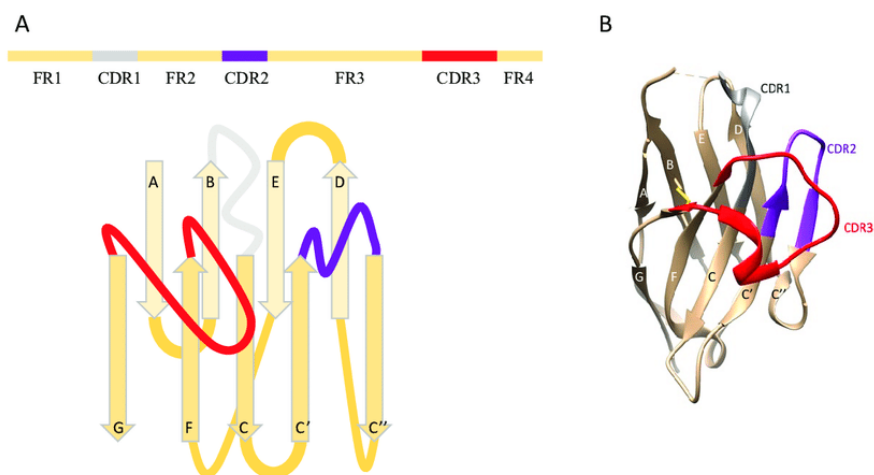
1.2.1. Egydoménes antitestek

A tevéfélék (például a tevék, a dromedárok és lámák) és a cápák szervezetében olyan antitestek találhatók, amelyekből hiányzik a könnyűlánc domén. Ezeknek a nehézlánc antitesteknek az epitóp kötő egysége csak egyetlen változó doménből áll, ezt nevezzük egydoménes antitestnek (sdAb). Ezek az egydoménes kötőegységek rendkívül jó affinitással és antigénkötő specificitással rendelkeznek annak ellenére is, hogy egyetlen polipeptidláncból állnak és eléggé kicsi a méretük ($M_w \sim 15$ kDa). Ezeknek az egydoménes antitesteknek a származtatása a 3. ábrán látható.



3. ábra A hagyományos és nehézlánc antitestekből származtatható egyetlen polipeptid láncból álló antitest-szerű fehérjék. (A) Hagományos antitest és egyláncú antitest fragmentum (ScFv); (B) Tevé nehézlánc antitest (VHH) és az ebből származtatott egydoménes antitest (sdAb) [8]

Hasonlóan, a hagyományos antitestek variábilis doménjeihez, az egydoménes antitestek is négy állandó vázrégióval (FR1-4) rendelkeznek, amelyeket egymástól három hurokrégió (CDR1, -2 és -3) választ el. Az sdAb FR2-nek van egy megkülönböztető jellemzője, egy hidrofíli felületi exponált „folt”, ami nagy valószínűséggel a könnyűlánc-kötés elvesztésének kompenzálásául szolgálhat, illetve a CDR3 hurokrégió gyakran visszahajlik arra a helyre, ami alapesetben kölcsönhatásba lépne a változó könnyű láncsal. Ezen kívül az egydoménes antitestek CDR3-jának hosszúsága nagyobb mértékben változó, és jellemzően hosszabb is, mint a hagyományos antitestek CDR3-ja. Az egydoménes antitestek szerkezete a 4. ábrán látható [3].



4. ábra Az egydoménes antitestek felépítése és szerkezete [9]

Mivel kis mérettel, illetve egyetlen doménnel rendelkeznek, valamint hidrofíl aminosavakat tartalmaznak az FR2-ben, ezért ezek az egydoménes antitestek magas oldhatósággal és stabilitással rendelkeznek. Ezen jellemzőik alapján az sdAb-k hatékonyan és alacsony költséggel állíthatók elő mikroorganizmusok segítségével. Ezen a vonzó tulajdonságok ismeretében nem meglepő, hogy számos vírus ellen irányított antitestet szelektáltak VHH könyvtárakból. Az immunkönyvtárak létrehozhatók olyan, vérből izolált limfociták alapján, amelyeket egy teljes vírussal vagy a megfelelő vírusantigénnel immunizált tevéféléből izoláltak. Viszont a megfelelő sdAb-k olyan natív könyvtárakból is kiválaszthatóak, amiket nem immunizált tevéfélékből nyertek ki. A szintetikus VHH-könyvtárak létrehozásához kísérleti állatkezelésre sincs szükség. Az ilyen könyvtárakat egyetlen egydoménes antitest alapján felépítik, aminek megmaradnak a konzervált FR-jei, de a CDR-ekben lévő aminosavakat módosítják helyspecifikus mutációkkal [5].

Az ebben a munkában használt aWNV Nyugat-nílusi láz vírusa elleni egydoménes antitest a vírus DIII doménjéhez kötődik. Az aWNV egydoménes antitestet Hrušková és mtsai szelektálták úgy, hogy lámát immunizáltak a kórokozó antigénjével, és így hoztak létre egy VHH (egyetlen variábilis domén a nehézláncon) könyvtárat. Ebből a könyvtárból aztán szelektálták azokat az sdAb-kat, amelyek a nyugat-nílusi láz vírusának a HBMEC-hez (humán agyi mikrovaskuláris endotélsejtek) történő kötődését megakadályozta. Mivel a munkámhoz használt egydoménes antitest kötőhelye az N terminális oldalon található, ezért a fúziós fehérje konstrukciót úgy állítottam össze, hogy az sdAb C-terminális végével kapcsolódjon a peroxidáz jelölőenzimhez.

1.3. APEX2

A peroxidázok vagy peroxid-reduktázok az enzimek nagy csoportja, amelyek különböző biológiai folyamatokban játszanak szerepet. Nevüket onnan kapták, hogy általában peroxidokat bontanak. A peroxidázok hem prosztetikus csoportot tartalmaznak kofaktorként. A peroxidáz enzimeket elterjedten alkalmazzák különböző kimutatási folyamatokban, mivel megfelelő szubsztráttal szemmel is jól látható színreakciót eredményeznek. A leggyakrabban alkalmazott peroxidáz a torna-peroxidáz (horseradish peroxidase, HRP) enzim [10], amely többek közt a TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) az oxidációját katalizálja, azt színtelenből kék színű terméké alakítva. Azonban a HRP-nek egy nagy hátránya, hogy több ciszteint is tartalmaz, emiatt a bakteriális termeltetés nehézkes. Az APEX2 egy módosított változata a szójabab aszkorbát-peroxidáz enzimnek, ami a széles körben alkalmazott HRP-vel ellentétben akkor is megtartja aktivitását, ha redukáló környezetben (pl. mitokondrium vagy citoszol) fejeződik ki a sejtben. Az APEX2 enzim különlegessége, hogy rengeteg kis molekulájú szubsztrát hidrogén-peroxid (H_2O_2) függő egyelektronos oxidációját képes katalizálni. Ezen tulajdonságok miatt napjainkban széles körben alkalmazzák a biotechnológia számos területén [11].

1.4 Fúziós fehérjék

A fúziós fehérjék, vagy másnéven kiméra fehérjék olyan proteinek, amelyek két vagy több, eredetileg különálló fehérjéket kódoló gén összekapcsolásával jönnek létre. Ilyen kiméra fehérjék természetes módon is keletkezhetnek, de létrehozhatók rekombináns DNS-technológiával, amelyeket elterjedten használnak pl. biotechnológiai kutatásokban, terápiás célokra. A fúziós fehérjéknek nagy előnye, hogy két vagy több domén fúziója növeli az aktivitást, vagy akár új biotechnológiai funkciók is létrejöhetnek.

Elterjedten alkalmazznak peroxidáz enzimeket fúziós partnerként, mivel ezek szemmel is jól látható színreakciót adnak, így egydoménes antitesttel fuzionáltatva egyszerűen lehet detektálni egy antigén jelenlétét. Ez a módszer jól alkalmazható különböző immunanalitikai eljárások (pl. ELISA, bioszenzorok, vagy különböző gyorsteszték) során [11]. Fuzionáltatott sdAb-jelölőfehérje rendszert ezelőtt főként emlőssejtekben termeltettek. Y. Sheng és mtsai [12], valamint Y. Mu és mtsai [13] sikeresen alkalmaztak emlőssejtekben termeltetett sdAb-HRP fúziós fehérjét. Az emlőssejtekben történő fehérjetermelés hátrány, hogy lassú, illetve drága. Bár HRP-t már S. Chauhan és mtsai [14] sikeresen termeltettek *E. coli*-ban, azonban a benne található 4 db kénhíd miatt a citoplazmában történő termeltetés nehézkes. Az APEX2 azonban csak

egyetlen ciszteint tartalmaz. L.J. Sherwood és mtsai sikeresen termeltettek ilyen fúziós sdAb-APEX2 rendszert [15].

2. Célkitűzés

Napjainkban számos vírusfertőzés (így pl. a nyugat-nílusi láz) kimutatása PCR (polimeráz láncreakció) módszerrel történik, amelynek nagyon jó a hatékonysága, azonban emellett, hogy költséges szakképzettséget igényel, illetve időigényes folyamat.

Ezzel szemben antitest alapú egyszerű, színreakción alapuló megoldásokat, mint ahogy az a COVID-19 vírusjárvány kapcsán is már látható volt. Ezeknek nagy előnye, hogy szemmel is jól látható eredményt adnak, egyszerűek, így a laikusok is könnyen elvégezhetik. Mindezekon túl, a hagyományos antitesteket kiváltó, rekombináns fehérjeként bakteriális rendszerekben előállítható és könnyen módosítható egydoménes antitestek alkalmazása a kimutatási módszer további egyszerűsítését és gazdaságosabb kivitelezését is lehetővé teszi.

A munkám célja egy olyan fúziós sdAb-APEX2 jelölőfehérje rendszer előállítása, majd ennek felhasználásával egy egyszerű, színreakción alapuló módszer fejlesztése, amely specifikusan képes jelezni a nyugat-nílusi láz jelenlétét. Ebben a munkában a vírus kimutatási módszer kivitelezéséhez szükséges fehérje komponensek előállítását mutatom be.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Szükséges anyagok és eszközök

Az aWNV-APEX2-6HIS génszekvenciát a megfelelő restrikciós vágóhelyekkel a SnapGene Viewer [16] programmal terveztem meg, majd a pET-28a(+) plazmidba beépítve a Twist Bioscience szintetizálta. A gének restrikciós emésztéséhez a New England Biolabs által gyártott NotI, XhoI és NdeI enzimeket használtam, a hozzájuk tartozó pufferekkel, a gyártó által megadott protokoll szerint. A különböző tápoldatokat és eszközöket Sanyo Labo Autoclave-val sterilizáltam. A fehérje expresszióhoz használt BL21(DE3) rekombináns *E. coli* sejtek a New England Biolabs-tól származtak. A baktériumok tenyésztéséhez LB/Kan tápoldatokat használtam (Luria Bertani - AppliChem és Kanamicin - Sigma Aldrich). A TOP10 sejtekben felsokszorozított plazmid DNS-t Monarch Plasmid MiniPrep Kit-tel (New England Biolabs) tisztítottam. A DNS-eket agaróz gélen Cleaver Scientific LTD Power Pro gélelektroforézis készülék segítségével választottam el. Az agaróz port a Nippon Genetics Europe GmbH gyártotta. Az agaróz géleket GelRed DNA gel stain (1000×) (Izinta) festékkel készítettem. A DNS molekulák méretének meghatározására a Thermo Scientific által gyártott GeneRuler 1 kb DNA Ladder DNS markert alkalmaztam. Az agaróz gélekből a DNS fragmensek tisztítását Monarch DNA Gel Extraction Kit-el végeztem el. A sejtekkel Merck Novagen Calbiochem Biosciences lamináris fülkében dolgoztam. A sejtek fehérjetermelését a Biosynth AG által gyártott IPTG-vel (Izopropil-béta-D-tiogalaktopiranozidot) indukáltam. A baktériumok szaporításához és indukciójához szükséges hőmérsékletet és oxigénellátást Edmund Bühler TH15 rázóinkubátorral állítottam be. A baktériumok felszaporodását a zavarosság változásának mérésével követtem nyomon, amelyhez Jasco V-630 spektrofotométert alkalmaztam. A sejteket Eppendorf centrifuge 5415R centrifugával szedimentáltam. Az affinitáskromatográfiás vizsgálatokat ÄKTA Start FPLC készülékkel végeztem el, amelyhez a használt HiTrap Chelating oszlopokat a GE Healthcare gyártotta.

3.2. Bakteriális klónozás és fehérje expressziós rendszerek

A plazmid bakteriális eredetű, kettős szálú, cirkuláris, extrakromoszomális DNS, mely olyan géneket is tartalmaz, amely képes valamilyen szelekciós előnyt biztosítani a

gazdasejt számára (pl. antibiotikum rezisztencia). A rekombináns DNS technológiai gyakorlatban *in vivo* plazmid DNS amplifikálására és fehérje termelésére a legelterjedtebben *E. coli* sejteket alkalmaznak [17].

A fehérje termelésre kifejlesztett expressziós vektorok olyan DNS szakaszokat tartalmaznak, amelyek szabályozhatóvá teszik a beépített idegen DNS szakaszcól fehérje termelését. Található még bennük egy ún. többszörös klónozóhely, ami tartalmazza több restriktációs endonukleáz hasítóhelyét egy rövid szakaszon belül, és ide illeszthető be az adott gén a megfelelő enzimek segítségével. Számos vektorban találhatóak még más olyan fehérjét vagy peptidet kódoló oligonukleotidok, amelyek az expresszálandó fehérje tisztítását segítik elő: ilyenek a fúziós „tag”-ek [18].

A pET vektorcsaládba olyan vektorok tartoznak bele, melyekben a fehérjék expresszálandása során a génátírást a T7 promóter garantálja, ennek a transzkripcióját kizárólag a T7 RNS polimeráz végzi. A rendszernek nagy előnye, hogy a T7 RNS polimeráz transzkripció sebessége nagyobb, mint az *E. coli* saját RNS polimerázának sebessége, így hatékony szelekció érhető el vele [29].

A BL21(DE3) az egyik legszélesebb körben alkalmazott *E. coli* sejt a rekombináns fehérjék előállítására. A DE3 jelölés itt azt jelenti, hogy ezek a törzsek tartalmazzák a DE3 lizogént, amely a T7 RNS-polimeráz génjét hordozza magában. A T7 RNS polimeráz indukciójához IPTG szükséges. Ez a törzs emellett nem tartalmazza sem az *Ion*, sem a külső membrán proteázt, az *OmpT*-t. Ezen két kulcsfontosságú proteáz hiánya csökkenti a törzsekben kifejezett heterológ fehérjék lebontását. A törzs T7 lizozimot is termel, hogy csökkentse a kívánt gén alapszintű expresszióját, illetve rezisztensek a klóramfenikollal szemben [20].

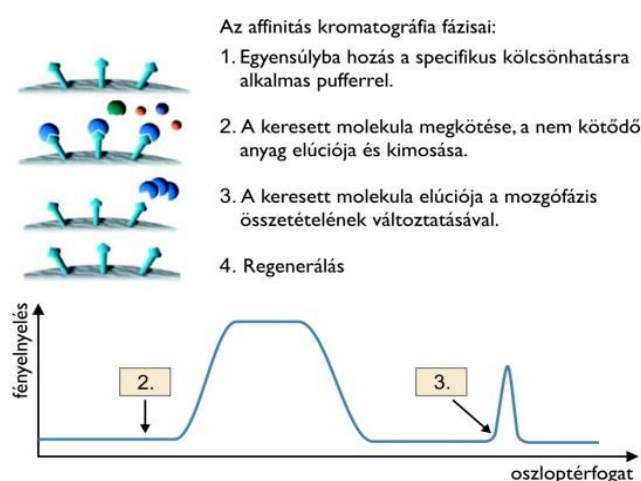
A transzformáció egy gyakori módja a rekombináns DNS molekulák gazdaszervezetbe juttatásának. Ehhez a DNS számára átjárhatóvá, azaz kompetenssé kell tenni a sejtek membránját, hogy képesek legyenek felvenni plazmidot. Mivel a plazmidok rendelkeznek antibiotikum rezisztenciáért felelős génnel, antibiotikumot tartalmazó táptalajon túlélnek azok a sejtek, amelyek azt tartalmazzák. A táptalajon lévő minden telep egyetlen sejtől keletkezett, tehát klónoknak tekinthetők.

3.4. Ni-affinitás kromatográfia

Az affinitáskromatográfia egy különleges elválasztástechnika, mely a biomolekula biológiai funkcióján vagy egyedi kémiai szerkezetén alapul. Az eljárás során az adott

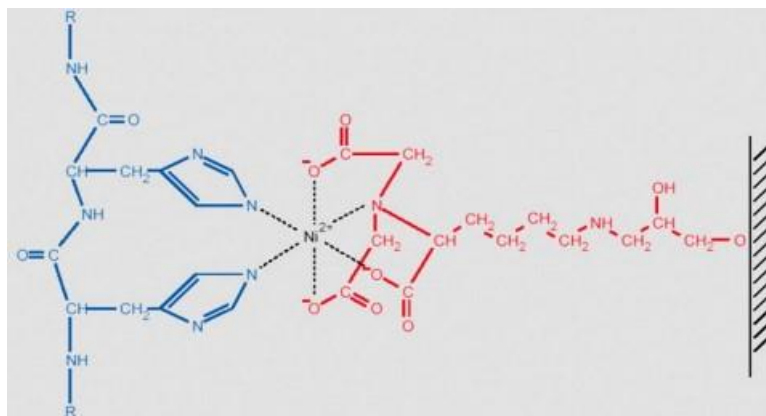
biomolekula kölcsönható partnerét kirögzítik egy szilárd hordozó felületére, ami képes reverzibilisen kikötni a keresett biomolekulát, akár egy sokkomponensű mozgófázisból is. Ezután a kikötődött biomolekulát egyszerűen eluálhatjuk az oszlopról a mozgófázis összetételének megváltoztatásával (5. ábra).

Az affinitáskromatográfiának nagy jelentősége van a molekuláris biológiában, a rekombináns fehérjék tisztítása során. Gyakran a termeltetett fehérjét az N-terminális vagy a C-terminális végen egy ún. fúziós „címkével” is ellátják géntechnológiai módszerek segítségével, és ennek segítségével ez a fehérje affinitáskromatográfia segítségével elválasztható [21].



5. ábra Az affinitáskromatográfia kivitelezésének fázisai [18]

A nikkel-affinitás kromatográfiás eljárással a terminális oligohisztidinnel ellátott biológiai molekulák nagy hatékonysággal szeparálhatók. Az ebben a munkában előállított fehérjék egy 6His „tag”-et tartalmaznak. Ez a „címké” egy viszonylag kisméretű peptid, ami a kromatográfiás oszlopon immobilizált nikkel ionok szabad koordinációs helyeihez köt. Minden Ni(II) két hisztidin molekulával lép kölcsönhatásba (6. ábra), így a fehérje egy lépésben elválasztható az elegy többi komponensétől. A hordozóra Ni(II)-ionokat rögzítünk ki, amelyeknek szabad koordinációs helyei erős kötést képesek kialakítani a hisztidinek imidazol oldalláncaival. Mivel egy nikkel-ion 6 koordinatív kötést képez, így a többi vegyértékével a gyantára kötött hordozóra kapcsolódik. A fuzionált fehérje specifikusan kötődik a nikkel ionokhoz (vagyis oszlophoz). Az oszlopról aztán a fehérje először egy kis koncentrációjú (~60 mM) imidazolos mosás után magasabb imidazol koncentráció mellett (300-600 mM) eluálható [19].



6. ábra A hisztidin oldalláncok kötődése a Ni^{2+} -kötőoszlophoz [19]

3.5. Gélelektroforézis

Az elektroforézis módszerével elektromosan töltött részecskék választhatóak el aszerint, hogy az elektromos térben a vándorlási sebességük a méretüktől, alakjuktól és töltésüktől függően különböző lesz. Az elektroforézis során a töltéssel rendelkező részecskék az ellentétes töltéssel rendelkező elektród felé vándorolnak.

3.5.1. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis egy általánosan használt molekuláris biológiai technika, amellyel pl. DNS molekulák választhatók el és tisztíthatók. Ennek a módszernek nagy előnye, hogy gyorsan, egyszerűen megvalósítható, és közvetlenül láthatóvá tehető a DNS az agaróz gélben. UV fény segítségével már kis mennyiségben jelenlévő DNS is jól látható fluoreszcens festékek (pl. ethidium-bromid festék) használatával. A DNS molekulák vándorlásának sebességmeghatározó paraméterei:

- a DNS mérete, egy lineáris kettős szálú DNS vándorlási sebessége fordítva arányos a molekulatömeg tízes alapú logaritmusával,
- a DNS molekula szerkezete (alakja),
- az alkalmazott pH, ami befolyásolja az elválasztandó molekulák töltését,
- az alkalmazott feszültség értéke,
- az agaróz gél koncentrációja.

Az agaróz gél térhálós szerkezetű, amelyet a poliszacharid egységek közötti másodlagos kötések tartanak össze. Mivel a gél szerkezetének kialakulásában hidrogénkötések vesznek részt, ezért magas hőmérsékleten fázisátalakuláson megy

keresztül, azaz szol állapotba kerül és a megfelelő formába történő töltés és kihülés után kialakul a gél [21].

3.5.2. Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A poliakrilamid gélelektroforézis elsősorban a fehérjék elválasztására alkalmazott módszer. Az elválasztás alapja, hogy a proteinek eltérő töltéssel, alakkal és mérettel rendelkeznek, vándorlási sebességük az elektromos erőterben eltérő. Ugyanakkor a sok változó paraméter miatt pusztán a vándorlási sebesség alapján nem lehet azonosítani egy adott fehérjét.

Erre a problémára nyújt megoldást az úgynevezett SDS-PAGE módszer, ugyanis ebben az esetben a fehérjék elválasztása denaturált állapotban történik. Az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) egy anionos detergens, ami kitekeri a fehérjéket és ellátja őket a polipeptidlánc hosszával arányos mennyiségű negatív töltéssel. A fehérjét tartalmazó oldathoz redukálószer (pl. β -merkaptóetanolt) is adagolva a polipeptidláncok közötti diszulfidhidak felszakadnak, amely szintén a fehérje „kicsomagolását” segíti elő. Ezáltal az SDS-sel kezelt fehérjék a molekulatömegük szerint szétválnak a poliakrilamid gélen, a vándorlás sebessége fordítva arányos a molekulatömeg logaritmusával. Pontosan ismert molekulatömegű kalibráló fehérjéket (ún. „létra”) alkalmazva a mintában lévő fehérjék molekulatömege megbecsülhető. Mivel a fehérjéhez kötött SDS mennyisége közel független a polipeptidlánc szekvenciájától, azonban arányos a lánc hosszával, vagyis a molekulatömegükkel, ezért az SDS-es kezelés után a fehérjék relatív töltése közelítőleg azonos. A fehérjék alakja is hasonló lesz a kezelés hatására, hiszen a negatív töltésű SDS részecskék taszítják egymást, ezért az SDS-sel kezelt fehérjék megközelítőleg lineárisak lesznek. Ez azt eredményezi, hogy a fehérjék kizárólag a méretük alapján elválaszthatóak [22], [23].

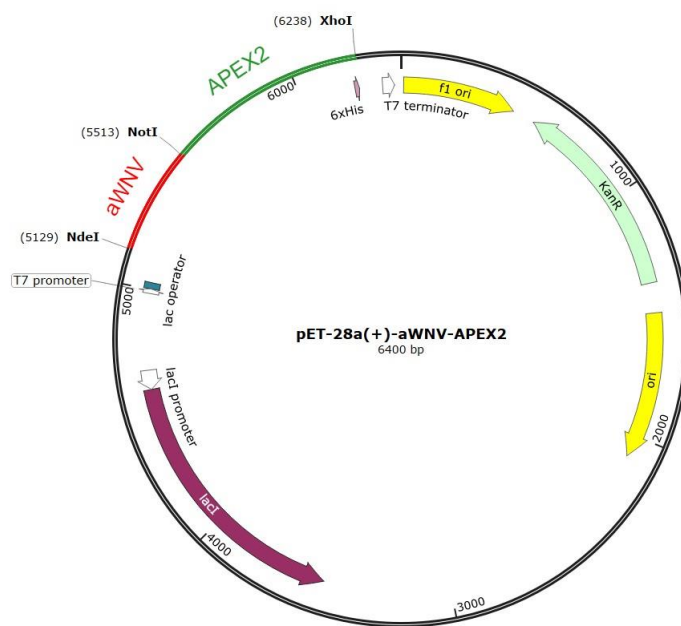
4. Eredmények és értékelésük

4.1. Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje előállítása

Egy vírusfertőzés kimutatásához szükséges teszt összeállításához három különböző fehérjekomponensre van szükség. Egyrészt szükség van az aWNV egydoménes antitestre, amely felületre kirögzítve képes megkötni a mintában jelenlévő WNV antigént. Emellett szükség van az aWNV-APEX2 fúziós fehérjére, amely szintén az antigénhez kötődve színreakcióval képes jelezni annak jelenlétét. Szükség van még az APEX2 peroxidáz enzimre, amely az antigén jelenléte nélkül színreakcióval jelzi a teszt működését.

4.1.1 Az aWNV-APEX2-6HIS génszekvencia megtervezése

Az aWNV-APEX2-6HIS génszekvencia tervezésének alapja az Addgene adatbázisban [24] elérhető pCDNA3 APEX2-NES volt, és a SnapGene [16] programmal valósítottam meg. Ezt a szekvenciát Sherwood és mtsai munkája [15] alapján módosítottam a [16] programmal oly módon, hogy 32. pozícióban lévő egyetlen ciszteint egy szerinre cseréltem annak érdekében, hogy baktériumok citoplazmájában könnyebben tudjam termeltetni. A génen lévő NES tagot levágtam, mivel ez egy exportszignál, ami a baktérium periplazmájában szekretálná a fehérjét. Eltávolítottam a génből a FLAG címkét is, amelyet általánosan fehérjék jelölésére használnak, valamint a belső PstI és HindIII vágóhelyeket is. Az ehhez a génhez hozzáillesztett aWNV antitest szekvenciája Hruškovicová és mtsai munkájából [25] származik. Az így megtervezett gént a pET-28a(+) plazmid vektorba beépítve rendeltük meg, amely a 7. ábrán látható.



7. ábra Az aWNV-APEX2 gén a pET-28a(+) plazmidban sematikusan ábrázolva

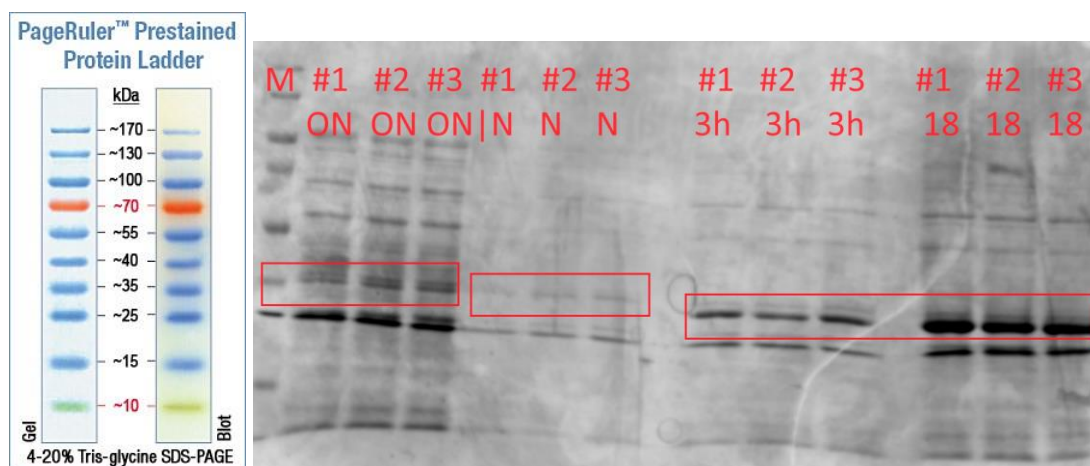
4.1.2 Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje termeltetési körülményeinek optimalizálása

Munkám során egy antitesttel fuzionáltatott jelölőfehérje rendszert próbáltam BL21(DE3) *E. coli*-ban termeltetni. Ehhez kompetens BL21(DE3) sejteket transzformáltam az aWNV-APEX2-6HIS-pET28 plazmiddal [26].

Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje expressziójának optimalizálásához először az LB/Kan szelekciós táptalajról 3 kolóniát kiválasztottam, amelyet átoltottam 3 ml LB tápoldatba, és hozzáadtam 3 µl, steril 50 mg/ml-es koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot.

Ezt a sejtszuszpenziót 16 órán át 37°C-on 275 rpm-mel rázatva növesztettem. A 16 óra után 5 ml LB/Kan tápoldatba 1 V/V% sejtszuszpenziót inokuláltam. A mintákat addig növesztettem 37°C-on, és 275 rpm-en -en, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitása 0,6 és 0,8 közé nem került. Ezután a sejt kultúrákat beindukáltam 0,5 mM IPTG-vel (Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid), és mindegyik tenyészet mintából 2,5 ml-t 3 óráig, 2,5 ml-t 18 óráig inkubáltam 30°C-on.

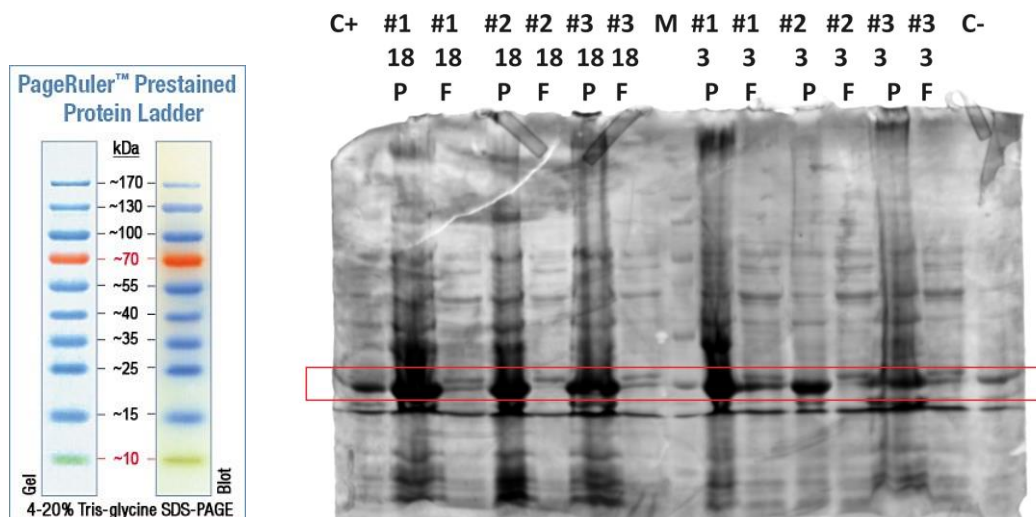
Minden lépés után 20 μ l mintát vettem, hozzáadtam 20 μ l SDS PAGE mintapuffert (ez SDS-t, merkaptotetanolt, glicerint és brómfenolkéket tartalmaz megfelelően pufferálva), és 10 percig főztem lobogó vízfürdőben és 12,5%-os gélen elektroforézissel elválasztottam (8. ábra).



8. ábra Az *aWNV-APEX2-6HIS* (MW~39,59 kDa) fehérje termeltetési eredményei 30 °C-on, 0,5 mM IPTG-vel, ahol piros keretben látható az *aWNV-APEX2-6HIS* fehérje. Az ábrán látható rövidítések magyarázata: M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); #1, #2 és #3 az egyes kolóniákat jelölik; ON - a nem indukált 16 órás növesztés; N - 3 órás, nem indukált növesztés; 3h - 3 órás indukció; 18 - 18 órás indukció.

A gélképen látható, hogy mindegyik kolónia termeli fehérjét elég nagy mennyiségben, már 3 óra alatt is. Ezután sejtfeltárást végeztem, hogy leellenőrizzem, milyen körülmények között termelődött a fehérje oldható formában, és hogy milyen paraméterek mellett célszerű nagyobb volumenű termeltetést megvalósítani. A sejtfeltáráshoz először a tápoldatot lecentrifugáltam 13.000 rpm (~ 16.000 g) fordulaton, 6 °C-on, 10 perc alatt. A csapadékot szuszpendáltam 2,5-2,5 ml PBS pufferben (A.4. függelék). A sejtfeltárást aztán a következő módon végeztem: a sejteket -80 °C-ra helyeztem be 10 percre, majd 37 °C-os vízfürdőbe, amíg ki nem olvadtak, és ezt háromszor megismételtem. A mintákat ezután újra lecentrifugáltam 13.000 rpm-en, 6 °C-on 10 perc alatt. Minden lépés után 20

μl mintát vettem, hozzáadtam 20 μl mintapuffert, és 10 percig főztem lobogó vízfürdőben, majd SDS-PAGE-n elválasztottam. Ennek eredménye a 9. ábrán látható.



9. ábra Az aWNV-APEX2-6HIS (~39,59 kDa) fehérje 30 °C-os, 0,5 mM IPTG-vel történő indukálás utáni sejtfeltárás eredményei, ahol piros keretben látható a keresett fehérje. Az ábrán látható rövidítések magyarázata: M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); #1, #2 és #3 az egyes kolóniákat jelölik; 3 - 3 órás indukció; 18 - 18 órás indukció; P - csapadék; F - felülúszó.

A gélképen látható, hogy bár termelődött az aWNV-APEX2-6HIS fehérje, de oldhatatlan formában, zárványtestbe kicsapódva, mivel a csapadékban található. Emiatt úgy döntöttem, hogy az IPTG koncentrációját lecsökkentem 0,1 mM-ra.

4.1.3. Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje nagyobb léptékű termeltetése

A #2 glicerines törzsből leoltottam 5 ml LB/Kan tápoldatba, hozzáadtam 5 μl 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot, és 37 °C-on 16 órán át növesztettem őket, 275 rpm-en rázatva. Ezt az 5 ml oldatot beinokuláltam 11 LB/Kan tápoldatba, és hozzáadtam 1 ml 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot, majd addig növesztettem 37 °C-on, 275 rpm-en rázatva, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitása el nem érte a 0,6-0,8 értéket. Ezután beindukáltam 0,1 mM IPTG-vel, és mivel ez a peroxidáz hem kofaktort is tartalmaz, ezért 250 μl, 70 mg/l koncentrációjú, 1,4 M ammónium-acetát pufferben hemint adtam hozzá, és 30 °C-on 275 rpm-en rázatva 3 órás indukció inkubálás után 500 ml-t kivettem a mintából, amelyet 4500 rpm-en, 6 °C-on, 20 perc alatt lecentrifugáltam. A maradék 500 ml-t 18 órán át indukáltam, majd ezt is lecentrifugáltam 4500 rpm-en, 6 °C-on, 20 perc alatt. Ezután a sejtszapadékokat

visszaszuszpendáltam 20-20 ml 'A' pufferben (A.5. függelék). Hozzáadtam 2 db EDTA-Free Complete tablettát, ami a proteázok inhibeálására szolgál, majd elvégeztem az ultrahangos sejtfeltárást jégen, a sejteket 30 másodpercig 40-50-es amplitúdójú ultrahangnak tettem ki, majd 1 percig jégen pihentettem, és ezt nyolcszor megismételtem. Ezután a szuszpenziót centrifugáltam 4500 rpm-en 6 °C-on 20 percig, majd a felülúszót újra centrifugáltam 40.000 rpm-en 30 percig 10 °C-on. A felülúszót átszűrtem 0,45 µm-es PES (poliéterszulfon) membránon a kromatográfiás tisztítás előtt. Az aWNV-APEX2-6HIS fehérjék tisztításához kereskedelmi forgalomban is kapható 5 ml-es HiTrap Chelating HP Ni²⁺ affinitás oszlopot használtam.

Mivel az oszlopot 20%-os etanolban tároljuk, ezért ezt 4 először oszloptérfogatnyi desztillált vízzel kimostam belőle (különben a puffer sója eltömítheti az oszlopot), majd 4 oszloptérfogatnyi 'A' pufferrel egyensúlyba hoztam.

4.1.4. Az aWNV-APEX2-6HIS kromatográfiás elválasztása

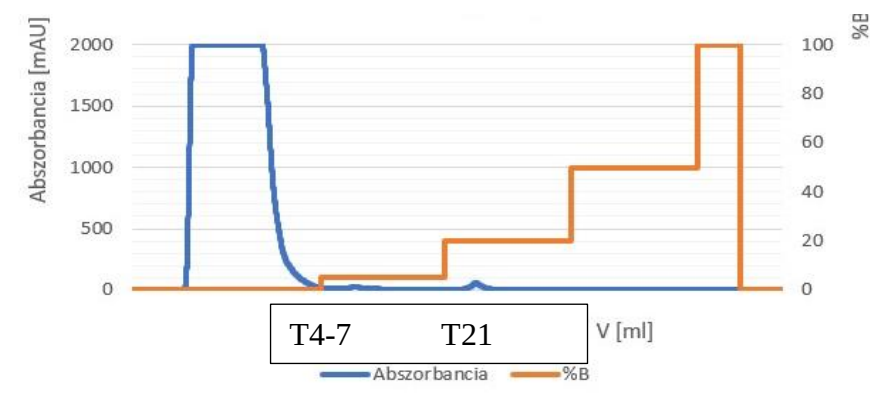
A fentiekben leírt módon előkészített szűrt sejtsuszpenziót 2,5 ml/perc áramlási sebességgel vittem az oszlopra, majd addig mostam 'A' pufferrel, amíg az összes nem kötődő fehérjét a rendszerből. Ez a 280 nm-en mért kromatogram lefutásán volt követhető.

Az aWNV-APEX2-6HIS fehérjék leszoríthatóak az oszlopról a magasabb imidazol tartalmú 'B' puffer segítségével, az imidazol koncentráció fokozatos növelésével mostam az oszlopot. Az eluált fehérjéket frakciókba gyűjtöttem.

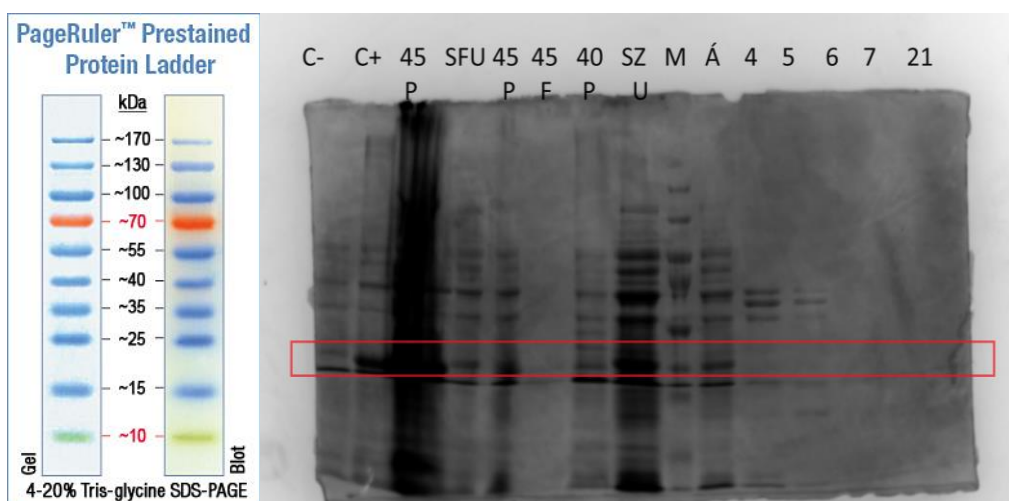
Az elúció lépcsőzetes gradiens szerint 5, 25, 50, és 100% B puffert alkalmazva történt, minden lépcső esetén 6 kolonnatérfogatnyi pufferrel.

4.1.5. A különböző indukciós körülmények hatásának összehasonlítása

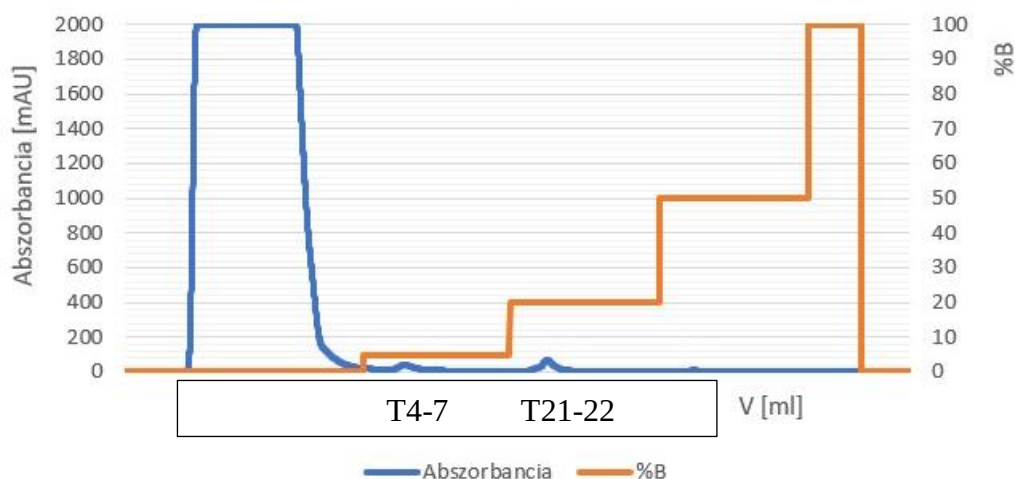
A tisztítás kromatogramjai a 10. és 11. ábrán láthatóak. A kromatogramokon az eluens puffer adagolásának megkezdése után két abszorbancia csúcs is látható, ami fehérje jelenlétére utal. Ahhoz, hogy megtudjam, melyik frakcióban és milyen tisztaságban található az aWNV-APEX2-6HIS fehérje megfuttattam a mintákat SDS-PAGE-n, ezek eredményei a 12., és 13. ábrán láthatók.



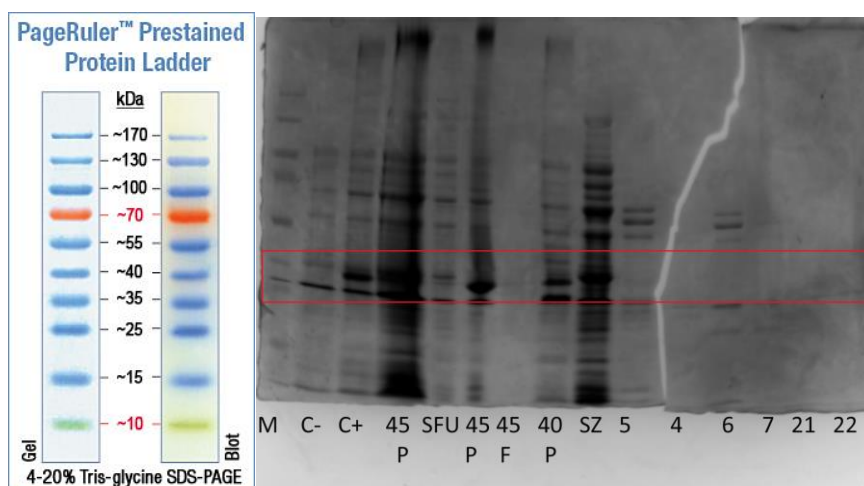
10. ábra Az α WNV-APEX2-6HIS fehérje indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények (30 °C, 18 óra, 0,1 mM IPTG) között 1 l-ben termeltetett fehérje tisztításának FPLC-s kromatogramja



11. ábra Az α WNV-APEX2-6HIS (MW~39,59kDa) fehérje indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények között (30 °C, 18 óra, 0,1 mM IPTG mellett) 1l-ben termeltetett fehérje, illetve FPLC-s tisztítás utáni mintáinak SDS-PAGE eredményei. A keresett minta sávja piros kerettel van jelölve. A rövidítések jelentése: C- a nem indukált, negatív kontroll; C+ az indukált, pozitív kontroll, 45 – a 4500 rpm-en történő centrifugálás után vett minta; P - csapadék; SFU - sejtfeltárás utáni minta; F - felülúszó; 40 - a 40000 rpm-en történő centrifugálás után vett minta; M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); Á - átfolyó; 4, 5, 6, 7, 21- az FPLC-ről lekövető minták, amelyek abszorbancia csúcsot



12. ábra Az *aWNV-APEX2-6HIS* fehérje indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények (30 °C, 3 óra, 0,1 mM IPTG) között 1 l-ben termeltetett fehérje tisztításának FPLC-s kromatogramja



13. ábra Az *aWNV-APEX2-6HIS* (MW~39,59kDa) fehérje indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények között (30 °C, 3 óra, 0,1 mM IPTG mellett) 1 l-ben termeltetett fehérje, illetve FPLC-s tisztítás utáni mintáinak SDS-PAGE eredményei. A keresett sáv piros kerettel van jelölve. A rövidítések jelentése: M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); C- a nem indukált, negatív kontroll; C+ az indukált, pozitív kontroll, 45 - a 4500 RPM-en történő centrifugálás után vett minta; P - csapadék; SFU - sejtfeltárás utáni minta; F - felüliszó; 40 - a 40000 RPM-en történő centrifugálás után vett minta; 4, 5, 6, 7, 21, 22- az FPLC-ről lejevő minták, amelyek abszorbancia csúcsot adtak

A gélképeken látható, hogy az FPLC-s tisztítás után nem kaptam oldható fehérjét, mind zárványtestben található. Emiatt úgy döntöttem, hogy más sejtvonalban is végzek próbatermeltetést. Emiatt az *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetens sejteket transzformáltam [26] alapján.

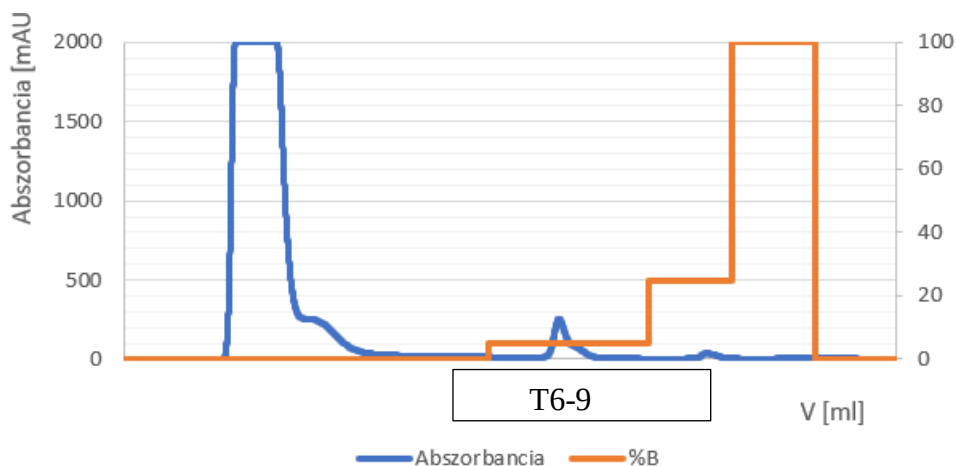
Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje expressziójának optimalizálásához először az LB/Kan szelekciós táptalajról 3 kolóniát kiválasztottam, amelyet átoltottam 3 ml LB tápoldatba, és hozzáadtam 3 µl, steril 50 mg/ml-es koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot. Ezt a sejtszuspenziót 16 órán át 37°C-on 275 rpm-mel rázatva növesztettem. A 16 óra után 5 ml LB/Kan tápoldatba 1 V/V% sejtszuspenziót inokuláltam. A mintákat addig növesztettem 37°C-on, és 275 rpm-en -en, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitása 0,6 és 0,8 közé nem került. Ezután a sejt kultúrákat beindukáltam 0,5 mM IPTG-vel (Izopropilβ-d-1-tiogalaktopiranozid), és mindegyik tenyészet mintából 2,5 ml-t 3 óráig, 2,5 ml-t 18 óráig inkubáltam 30°C-on.

Minden lépés után 20 µl mintát vettem, hozzáadtam 20 µl SDS PAGE mintapuffert (ez SDS-t, merkaptóetanolt, glicerint és brómfenolkéket tartalmaz megfelelően pufferálva), és 10 percig főztem lobogó vízfürdőben és 12,5%-os gélen elektroforézissel elválasztottam.

Ezután sejtfeltárást végeztem, hogy leellenőrizsem, milyen körülmények között termelődött a fehérje oldható formában, és hogy milyen paraméterek mellett célszerű nagyobb volumenű termeltetést megvalósítani. A sejtfeltáráshoz először a tápoldatot lecentrifugáltam 13.000 rpm (~ 16.000 g) fordulaton, 6 °C-on, 10 perc alatt. A csapadékot szuszpendáltam 2,5-2,5 ml PBS pufferben (A.4. függelék). A sejtfeltárást aztán a következő módon végeztem: a sejteket -80 °C-ra helyeztem be 10 percre, majd 37 °C-os vízfürdőbe, amíg ki nem olvadtak, és ezt háromszor megismételtem. A mintákat ezután újra lecentrifugáltam 13.000 rpm-en, 6 °C-on 10 perc alatt. Minden lépés után 20 µl mintát vettem, hozzáadtam 20 µl mintapuffert, és 10 percig főztem lobogó vízfürdőben, majd SDS-PAGE-n elválasztottam.

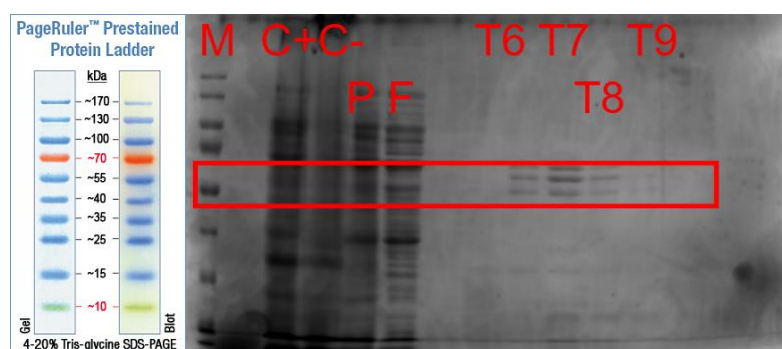
A #2 glicerines törzsből leoltottam 5 ml LB/Kan tápoldatba, hozzáadtam 5 µl 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot, és 37 °C-on 16 órán át növesztettem őket, 275 rpm-en rázatva. Ezt az 5 ml oldatot beinokuláltam 1 l LB/Kan tápoldatba, és hozzáadtam 1 ml 50 mg/ml koncentrációjú kanamicin antibiotikum oldatot, majd addig növesztettem 37 °C-on, 275 rpm-en rázatva, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitása el nem érte a 0,6-0,8 értéket. Ezután beindukáltam 0,1 mM IPTG-vel, 250 µl, 70 mg/l koncentrációjú, 1,4 M ammónium-acetát pufferben hemint adtam hozzá és 30 °C-on 275 rpm-en rázatva 3 órás indukció után 4500 rpm-en, 6 °C-on, 20 perc alatt lecentrifugáltam. A sejtcsapadékokat visszaszuszpendáltam 20-20 ml 'A' pufferben (A.5. függelék). Hozzáadtam 2 db EDTA-Free Complete tablettát, ami a proteázok inhibíálására szolgál, majd elvégeztem az ultrahangos sejtfeltárást. Az ultrahangos

sejtfeltárás után egy kétlépéses centrifugálás következett, első lépésben a szuszpenziót lecentrifugáltam 4500 rpm-en 6 °C-on 20 perc alatt, majd a felülúszót újra centrifugáltam 40.000 rpm-en 30 perc alatt 10 °C-on. Az itt kapott felülúszót átszűrtem 0,45 µm-es PES (poliéterszulfon) membránon, majd Ni-affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottam (14. ábra).



14. ábra Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje 1l-es termeltetése utáni FPLC-s tisztítás kromatogramja

A kromatogramon az eluens puffer adagolásának megkezdése után egy abszorbancia csúcs látható, ami arra utal, hogy fehérje jött le az oszlopról, de ahhoz, hogy megtudjam benne van-e a keresett fehérje megfuttattam a mintákat SDS-PAGE-n, ezek eredményei a 15. ábrán láthatók.



15. ábra Az aWNV-APEX2-6HIS (MW~40 kDa) fehérje indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények között nagyobb térfogatban termeltetett fehérje FPLC-s tisztítás utáni mintáinak SDS-PAGE eredményei. A rövidítések jelentése: M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); C+-pozitív kontroll, C- pozitív kontroll, P-a minták 4500 rpm-en történő centrifugálása után a sejtsapadékból vett minta, F- a minták 4500 rpm-en történő centrifugálása után a felülúszóból vett minta, T6,T7,T8,T9- FPLC-s frakciók

4.2 aWNV-6HIS és APEX2-6HIS fehérjék előállítása

4.2.1. aWNV-6HIS fehérjét kódoló plazmid előállítása

Mivel a gyorseszthez szükség van a jelölőenzim nélküli antitestre is, ezért génsebészeti módszerekkel az aWNV fehérje génjét NotI és NdeI restrikciós enzimekkel kiemésztettem APEX2 génje mellől a pET-28a(+) vektorból, majd a pET-23b(+) vektorba illesztettem be. Az emésztési reakcióelegyet az alábbiak szerint mértem össze:

- Insert (aWNV)
 - 7 μ l DNS (aWNV)
 - 1 μ l cutsmart puffer
 - 1 μ l enzim (NotI és NdeI)
- Plazmid (pET-23b)
 - 5 μ l DNS (pET-23b)
 - 2 μ l SDV
 - 1 μ l cutsmart puffer
 - 1 μ l enzim (NotI és NdeI)

Az egyes DNS-eket 37 °C-on, 1 óra alatt megemésztettem, majd az emésztési elegyet 1%-os agaróz gélen futtattam meg, hiszen, ha az emésztési elegyet egyből megpróbáltam volna ligálni, a benne levő restrikciós enzimek mindig elhasították volna, amit a ligáz összekapcsolt. A megfuttatott gélből Monarch DNA Gel Extraction Kit-el kipucoltam a megemésztett DNS fragmenteket, végül az emésztett fragmenteket összeligáltam. A ligálás során az emésztett pET-23b vektorba beillesztettem az aWNV-t kódoló DNS fragmentet. A ragadós végek összeillesztése T4 ligáz enzim segítségével történt. A ligálási elegy összetétele a következő volt:

- 2 μ l rapid puffer
- 1 μ l ligáz enzim
- 1 μ l vektor
- 6 μ l insert

A rapid ligálás Eppendorf csőben, 22 °C-on inkubálva 10 perc alatt történt. Az így kapott DNS-sel a TOP10 *E. coli* sejteket transzformáltam a [28] szerint, amelyekkel a kapott plazmidot felsokszorozíthatom.

Ehhez 50 μ l TOP10 *E. coli* sejtet és 5 μ l ligátumot egy Eppendorf csőbe pipettáztam, és 30 percig jégen inkubáltam. Ezután 1,5 percig 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre újra jégre helyeztem a csövet. Majd 500 μ l 42 °C-ra melegített SOC törzsoldatot adtam hozzá. Ezt követően 37 °C-on 45 percig 225 rpm-en rázattam. Az oldatból 50 és 450 μ l-t LB/Amp

lemezre szélesztettem ki és 37°C-on ON növesztettem. Másnap a kinőtt kolóniákból véletlenszerűen kiválasztottam 3 darabot, amelyeket LB/Amp tápoldatban felszaporítottam, és ezekből a plazmidot kitisztítottam, majd próbaemésztéssel és szekvenálással leellenőriztem, hogy megfelelő volt-e az aWNV egydoménes antitestet kódoló génszekvencia plazmidba történő beillesztése.

4.2.2. APEX2-6HIS fehérjét kódoló plazmid előállítása

A teszt elkészítéséhez szükség volt még az antitest nélküli jelölőfehérje előállítására is, ezért a génszűrés módszereivel az APEX2 fehérje génjét kiemésztettem a pET-28a(+) vektorból, és a pET-23b(+)vektorba beillesztettem. Ehhez az emésztési reakcióelegyet a következőképpen mértem össze:

- Insert (APEX2)
 - 7 μ l DNS (APEX2)
 - 1 μ l cutsmart puffer
 - 1 μ l enzim (NotI és XhoI)
- Plazmid (pET-23b)
 - 5 μ l DNS (pET-23b)
 - 2 μ l SDV
 - 1 μ l cutsmart puffer
 - 1 μ l enzim (NotI és XhoI)

Az egyes DNS-eket 37 °C-on, 1 óra alatt megemésztettem, majd az emésztési elegyet 1%-os agaróz gélen futtattam meg, hiszen, ha az emésztési elegyet egyből megpróbáltam volna ligálni, a benne levő restrikciós enzimek mindig elhasították volna, amit a ligáz összekapcsolt. A megfuttatott gélből Monarch DNA Gel Extraction Kit-el kipucoltam a megemésztett DNS fragmenseket, végül az emésztett fragmenseket összeligáltam. A ligálás során az emésztett pET-23b vektorba beillesztettem az APEX2-t kódoló DNS fragmentet. A ragadós végek összeillesztése T4 ligáz enzim segítségével történt. A ligálási elegy összetétele a következő volt:

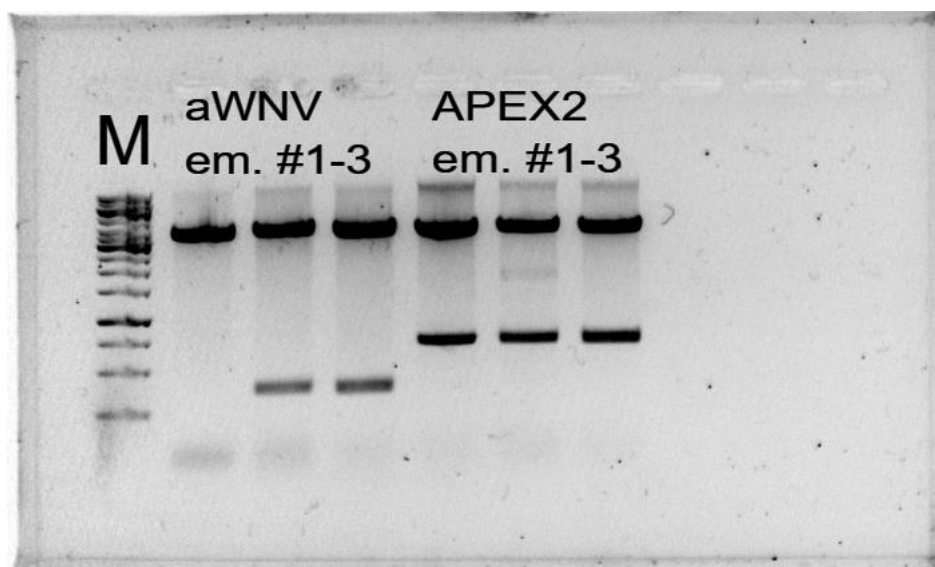
- 2 μ l rapid puffer
- 1 μ l ligáz enzim
- 1 μ l vektor
- 6 μ l insert

A rapid ligálás Eppendorf csőben, 22 °C-on inkubálva 10 perc alatt történt. Az így kapott DNS-sel a TOP10 *E. coli* sejteket transzformáltam a [27] szerint, amelyekkel a kapott plazmidot felsokszorozíthatom.

Ehhez 50 µl TOP10 *E. coli* sejtet és 5 µl ligátumot egy Eppendorf csőbe pipettáztam, és 30 percig jégén inkubáltam. Ezután 1,5 percig 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre újra jégre helyeztem a csövet. Majd 500 µl 42 °C-ra melegített SOC törzsoldatot adtam hozzá. Ezt követően 37 °C-on 45 percig 225 rpm-en rázattam. Az oldatból 50 és 450µl-t LB/Amp lemezre szélesztettem ki és 37°C-on ON növesztettem. Másnap a kinőtt kolóniákból véletlenszerűen kiválasztottam 3 darabot, amelyeket LB/Amp tápoldatban felszaporítottam, és ezekből a plazmidot kitisztítottam, majd próbaemésztéssel és szekvenálással ellenőriztem, hogy megfelelő volt-e az APEX2 jelölőfehérjét kódoló génszekvencia plazmidba történő beillesztése.

4.2.3 Ellenőrző emésztés és DNS szekvenálás

A tisztított rekombináns pET-23b-aWNV-6HIS és pET-23b-APEX2-6HIS DNS-eket az emésztéshez is használt restrikciós endonukleázokkal emésztettem, majd az emésztési elegyeket agaróz gélen elválasztottam, hogy ellenőrizsem megfelelően beépültek-e az inzertek a plazmidba.

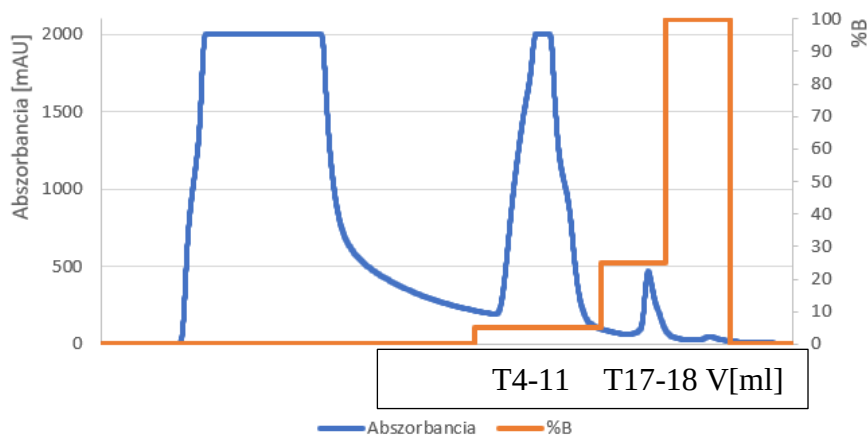


16. ábra pET-23b-aWNV-6HIS és pET-23b-APEX2-6HIS plazmidok ellenőrző emésztése

A mintákat elküldtem szekvenáltatni. Az elektroferogram alapján az aWNV-6HIS fehérjét kódoló plazmidba nem került inzert a #1-es kolónia esetén, csak üresen visszazáródott, az APEX2-6HIS-t kódoló DNS-ben pedig a #3-as kolónia esetén pontmutáció lépett fel, így mindkét esetben a 2-es kolóniából tisztított DNS-ekkel dolgoztam tovább.

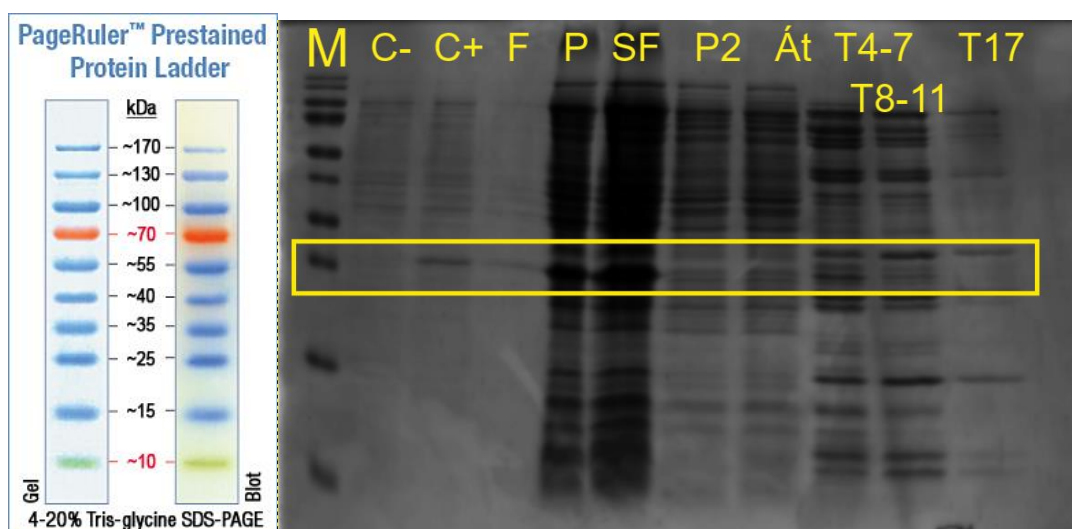
4.2.4. aWNV-6HIS és APEX2-6His fehérjék termeltetési körülményeinek optimalizálása

A pET23b-aWNV-6HIS és pET23b-APEX2-6HIS plazmiddal a BL21(DE3)pLys kompetens *E. coli* sejteket transzformáltam, hogy az általa kódolt fehérjét expresszáltassam [27]. A transzformált sejteket ON növesztettem LB/Amp táplemezen. Az aWNV-6HIS és APEX2-6HIS fehérjék előállításához az aWNV-APEX2-6HIS fúziós fehérje termeltetése során bemutatott körülményeket (30°C, 0,1mM IPTG koncentráció, 3 órás indukálás 250 µl, 70 mg/l koncentrációjú hemin) alkalmaztam. Az expresszáltatott aWNV-6HIS és APEX2-6HIS fehérjék FPLC-s tisztításának kromatogramjai a 18. és 20. ábrán láthatóak.

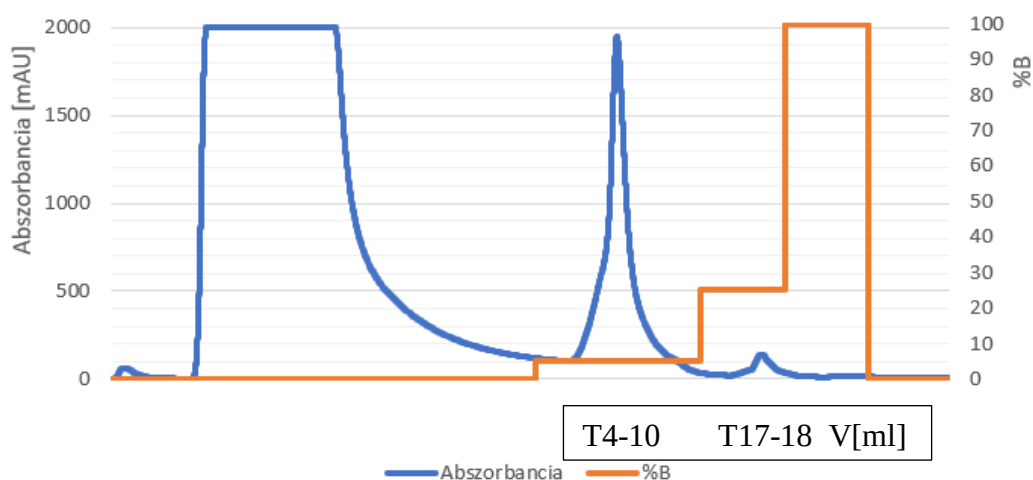


17. ábra Az APEX2-6HIS fehérje FPLC-s tisztításának kromatogramja

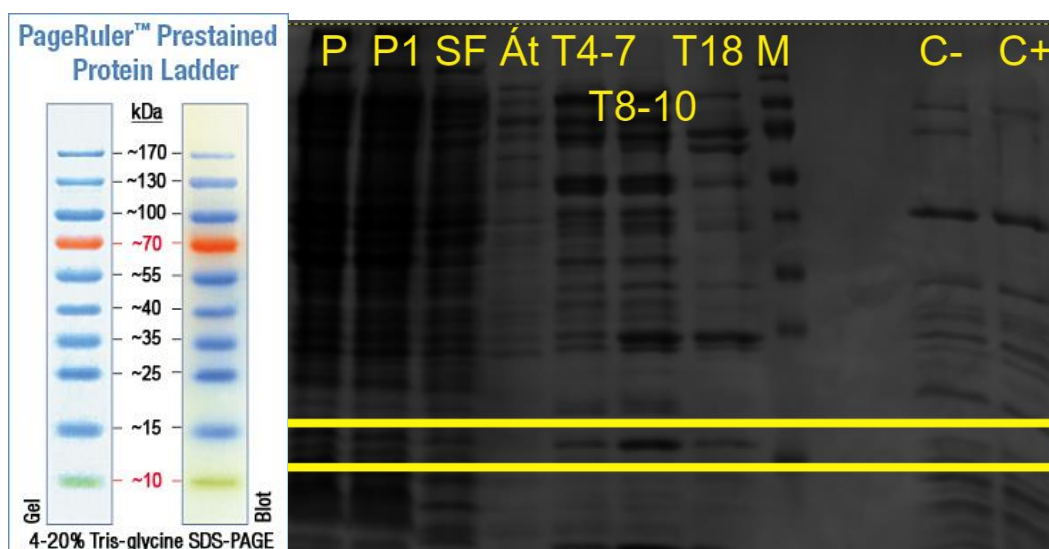
Ezután a mintákat megfuttattam 15%-os SDS-PAGE gélen, aminek eredménye a 18. és 19. ábrán látható.



18. ábra Az APEX2-6HIS (MW~25,66 kDa) fehérje termeltetési és FPLC-s tisztítás utáni mintáinak SDS-PAGE eredményei. A rövidítések jelentése: M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); C- negatív kontroll, C+ pozitív kontroll, F-a minták 4500 rpm-en történő centrifugálása után a felülúszóból vett minta, P-a minták 4500 rpm-en történő centrifugálása után a csapadékból vett minta, SF-sejtfeltárás utáni minta, P2- a minták 40.000 rpm-en történő centrifugálása után vett minta, Át- az FPLC átfolyóból vett minta, T4-7, T8-11, T17 pedig az FPLC-ről lejöő frakciók, amelyek az UV detektorban jelet adtak



19. ábra aWNV-6HIS fehérje FPLC-s tisztításának kromatogramja



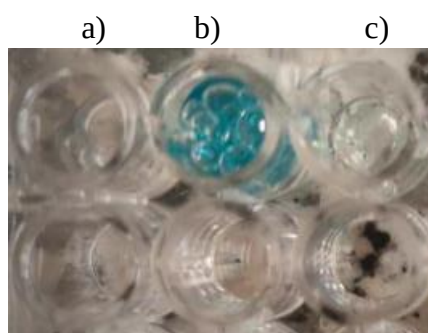
20. ábra Az aWNV-6HIS (MW~14,42) fehérje termeltetési és FPLC-s tisztítás utáni mintáinak SDS-PAGE eredményei. A rövidítések jelentése: P-a sejtuszpenzióból vett minta, P1-a minták 4500 rpm-en történő centrifugálása után a csapadékból vett minta, SF-sejtfeltárás utáni minta, Át- az FPLC átfolyójából vett minta, T4-7, T8-10, T18 pedig az FPLC-ről lejövő frakciók, amelyek az UV detektorban jelet adtak M-marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder); C- negatív kontroll, C+ pozitív kontroll

A gélképeken látható, hogy az APEX2-6HIS és az aWNV-6HIS fehérjék FPLC-s tisztítása után a frakciókban oldható fehérjét kaptam.

4.3 A termeltetett fehérjék aktivitásának vizsgálata

4.3.1 Az aWNV-APEX2-6HIS és az APEX2-6HIS peroxidáz aktivitásának igazolása

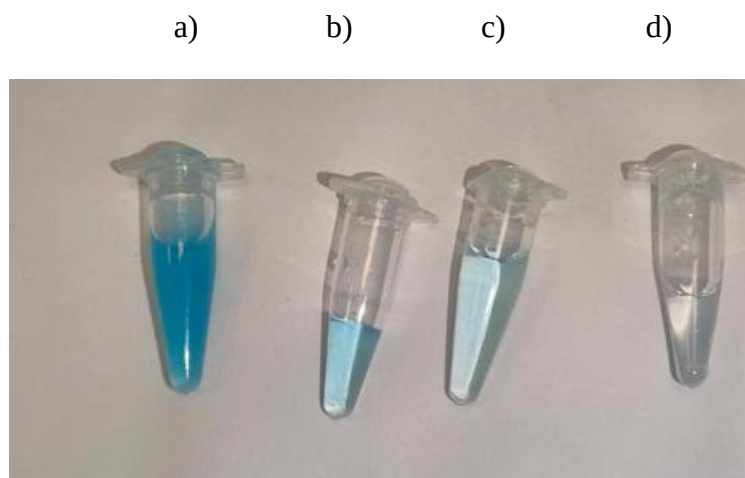
Az aWNV-APEX2-6HIS és APEX2-6HIS fehérjék aktivitásának ellenőrzése ugyanazon protokoll szerint zajlott. Első lépésként a tisztított aWNV-APEX2-6HIS fehérje aktivitását ellenőriztem TMB-vel (21. ábra).



21. ábra aWNV-APEX2-6HIS fehérje aktivitásának ellenőrzése TMB-vel. Az egyes well-ek tartalma: a) TMB+FPLC A puffer, b) TMB+tisztított aWNV-APEX2-6HIS c) tisztított aWNV-APEX2-6HIS

Az ábrán látható, hogy az aWNV-APEX2-6HIS fehérje az 1:1 arányban hozzáadott, eredetileg színtelen TMB-t kékszínűre változtatta, tehát van peroxidáz aktivitása.

A ~0,175 mg/ml-es fehérjékből 10×-es, 100×-os és 1000×-es hígításokat készítettem, és ezeknek is ellenőriztem az aktivitását 1:1 arányú TMB hozzáadásával. Ennek eredménye a 22. ábrán látható.



22. ábra Az aWNV-APEX2-6HIS fehérje peroxidáz aktivitásának tesztelése. a) 0,175 mg/ml-es fehérje + TMB, b) 10×-es térfogatra kihígított fehérje + TMB c) 100×-os térfogatra kihígított fehérje + TMB 1000×-es térfogatra kihígított fehérje + TMB

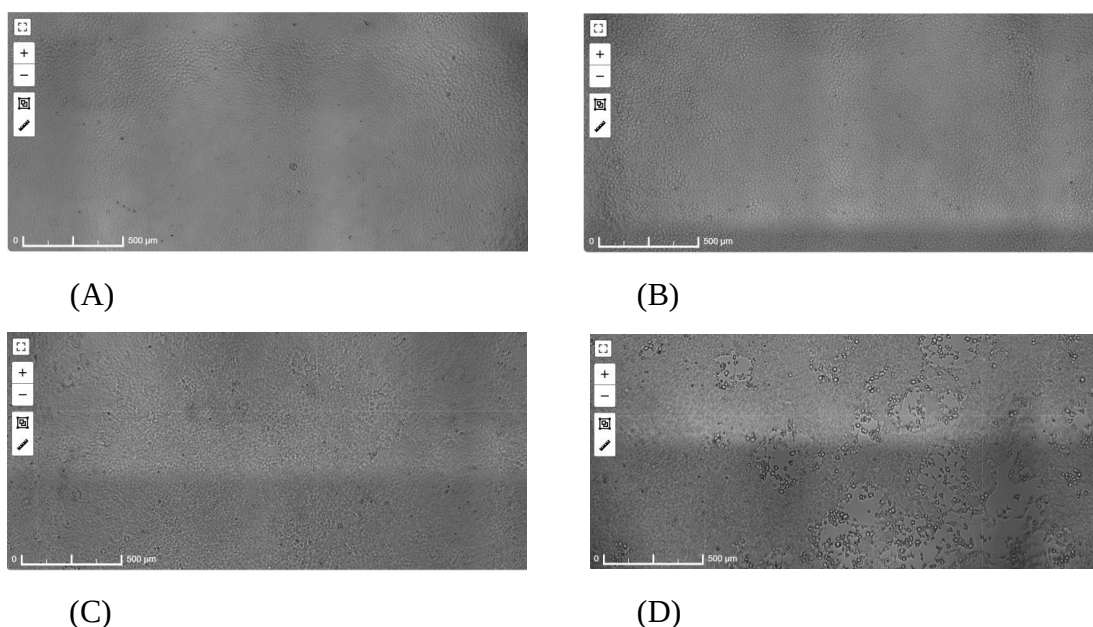
Az ábrán látható, hogy a tisztított, 0,175 mg/ml-es aWNV-APEX2-6HIS fehérje szemmel jól látható, intenzív színreakciót ad, de a 100×-os hígításnál (0,00175 mg/ml)-es koncentrációnál is ad színreakciót, vagyis nagyon nagy az érzékenysége.

4.3.2 Az aWNV-6HIS és az aWNV-APEX2-6HIS víruskötő képességének igazolása

A fúziós fehérje sdAb tagjának, illetve az aWNV egydoménes antitest funkcionális aktivitásának ellenőrzését a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpontjának Virologiai Kutatócsoportjában végezték el, mivel az élő vírussal történő munkavégzés szigorú jogszabályokhoz kötött, és az ottani 4-es biztonsági szintű víruslaborban voltak meg hozzá a megfelelő feltételek. Az aWNV-6HIS és aWNV-APEX2-6HIS fehérjék 0,5 mg/ml koncentrációjú oldataiból, felező hígítással 6-tagú hígítási sor készült, minden koncentráción 3 párhuzamos mintával. VeroE6 majomvese sejtvonalon először a fehérje oldatok citotoxicitását vizsgálták, amely 0,0312 mg/ml koncentrációnál minimális volt mindkét fehérje esetén, 0,0156 mg/ml-nél pedig már nem volt észlelhető, ezért a neutralizációs kísérletekhez az utóbbi koncentrációjú fehérje oldatokat használták. Az élő, héjából származó és felszaporított WNF vírust (30 000 db/reakcióedény) 37°C-on 1 órán át inkubálták aWNV-6HIS és aWNV-APEX2-6HIS fehérjék 50 µl térfogatú oldataival, elegendő időt biztosítva a fehérje-vírus kötés kialakulásának. Ezután az eleggyel megfertőzték a sejteket, 30 percig 37°C-on állni

hagyták, hogy egyenletes eloszlást kapjanak, majd a felesleget eltávolították és friss tápoldatot pipettáztak a sejtekre. Pozitív kontrollként nem fertőzött sejtvonalat, negatív kontrollként a fehérjékkel nem kezelt vírusokkal fertőzött sejtvonalat használtak. Ezután a megfertőzött sejteket 6 napig 37°C-on inkubálták, hogy az esetlegesen aktív vírusok ki tudják fejteni hatásukat. A sejtvonalatokat végül CytoSmart inverz laboratóriumi élősejtképzőre kifejlesztett mikroszkóp segítségével vizualizálták.

A 23. ábrán látható képek egyértelműen igazolják, hogy a vírusfertőzés és ennek következményeként a sejtek lízise csak a fehérjékkel nem kezelt élő vírusok hatására következett be, tehát mind az aWNV-6HIS, mind az aWNV-APEX2-6HIS fehérjék rendelkeznek a vírus megkötésének (és így inaktiválásának) képességével.



23. ábra A vírus neutralizációs vizsgálatok eredményét tükröző mikroszkópos felvételek

- (A) aWNV-APEX2-6HIS fúziós fehérje komplex + WNV vírus, kezelt és fertőzött VeroE6 sejtek
- (B) aWNV-6HIS egydoménes antitest + WNV vírus, kezelt és fertőzött VeroE6 sejtek
- (C) Negatív kontroll, nem fertőzött VeroE6 sejtek
- (D) WNV fertőzés VeroE6 sejteken

5. Összefoglalás

Az immunoanalitikai alapú teszteknek napjainkban egyre nagyobb jelentősége van az orvosi diagnosztika, a környezeti monitorozás és az élelmiszeranalitika területén is. Az ilyen tesztek kulcs komponensei leggyakrabban a hagyományos antitestek, azonban ezek előállítása költséges és bonyolult. Az egy polipeptid láncból felépülő, génsebészeti eljárásokkal egyszerűen módosítható és bakteriális rendszerekben gazdaságosan előállítható egydoménes antitestek a hagyományos antitestek kiváló alternatívái. Jelölőenzimmel fuzionálva ráadásul a kimutatási eljárások tovább egyszerűsíthetők.

Ebben a munkában a Nyugat-nílusi láz vírusának (WNV) kimutatására alkalmas teszt kialakításához szükséges fehérjéket állítottam elő, a WNV egydoménes antitestet, egy módosított szójabab aszkorbát peroxidázt (APEX2) és ezek a WNV-APEX2 fúziós fehérjét. A fehérjék génjének megtervezése után optimalizáltam azok termeltetési és nikkel-affinitás kromatográfiás tisztítási protokolljait, majd teszteltem azok aktivitását. A vizsgálatok igazolták, hogy a minden fehérje esetén jelentős mennyiségben oldható formában előállított fehérjék közül az APEX2 és a fúziós aWNV-APEX2 rendelkezik peroxidáz aktivitással. Élő Nyugat-nílusi láz vírussal fertőzött majomvese sejtvonalon igazoltuk, hogy mind az aWNV, mind a fúziós aWNV-APEX2 hatékonyan neutralizálja a vírust, ami a víruskötő képesség meglétét támasztja alá.

Mivel kísérleteim alapján bizonyítást nyert, hogy az általam előállított fehérjék rendelkeznek a szükséges víruskötő és peroxidáz aktivitással, további célom ezek felhasználásával a WNF vírus kimutatására alkalmas gyorseszteszt fejlesztése.

Hivatkozások

- [1] G. L. Campbell, A. A. Marfin, R. S. Lanciotti, and D. J. Gubler *West Nile virus*, The Lancet Infectious Diseases, 2(9), 519–529. doi:10.1016/s1473-3099(02)00368-7, 2002
- [2] <https://www.woah.org/en/disease/west-nile-fever/#:~:text=In%20horses%2C%20clinical%20signs%20of,and%20an%20inability%20to%20swallow> (2024.11.06)
- [3] D. De Vlieger, M. Ballegeer, I. Rossey, B. Schepens and X. Saelens *Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections*, Antibodies, 8, 2019
<https://doi.org/10.3390/antib8010001>, 1-3, 2008
- [4] Jurányi R., Vágvolgyi Á. *Általános kórtan, immunitástan, járványtan*, Egészségügyi Szakképző és Továbbképző Intézet, 2006
- [5] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, September 21). antibody. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/antibody> (2024.11.06)
- [6] Pállinger É., Buzás E., Falus A., Nagy Gy., Holub M. Cs., Tóth S., Kőhidai L., Pál Zs. *Immunológiai szemináriumok*, Semmelweis Egyetem, 2012
- [7] D. Marson, M. Russi, A. Fermeglia, E. Laurini, S. Pricl *Chapter 23 - Site-specific drug delivery utilizing monoclonal antibodies* Advanced and Modern Approaches for Drug Delivery, 649-681, 2023, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91668-4.00007-1>
- [8] S. Yu, G. Xiong, S. Zhao, Y. Tang, H. Tang, K. Wang, H. Liu, K. Lan, X. Bi, S. Duan *Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging*, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4817>, 2020
- [9] B. Liu and D. Yang *Easily Established and Multifunctional Synthetic Nanobody Libraries as Research Tools* Int. J. Mol. Sci. 2022 23(3), 1482; <https://doi.org/10.3390/ijms23031482>
- [10] Y. Sheng, K. Wang, Q. Lu, P. Ji, B. Liu, J. Zhu, Q. Liu, Y. Sun, J. Zhang, E. Zhou, Q. Zhao *Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay*, Journal of Nanobiotechnology, 35, 2019 <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0468-0>
- [11] Y. Han, T. C. Branon, J. D. Martell, D. Boassa, D. Shechner, M. H. Ellisman, and A. Ting *Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase*, ACS Chemical Biology 2019, 14, 4, 619–635, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00919>
- [12] K. Yu, C. Liu, B. Kim, D. Lee *Synthetic fusion protein design and applications* Biotechnology Advances Volume 33, Issue 1, February 2015, 155-164,
- [13] Y. Mu, C. Jia, X. Zheng, H. Zhu, X. Zhang, H. Xu, B. Liu, Q. Zhao and E. Zhou *A nanobody-horseradish peroxidase fusion protein-based competitive ELISA for rapid*

- detection of antibodies against porcine circovirus type 2*, Journal of Nanobiotechnology, 34, 2021 <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00778-8>, 2021
- [14] S. Chauhan and T. Jin Kang *Soluble expression of horseradish peroxidase in Escherichia coli and its facile activation*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 126(4),2018, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.004>
- [15] L. J. Sherwood and A. Hayhurst *Periplasmic Nanobody-APEX2 Fusions Enable Facile Visualization of Ebola, Marburg, and Me~n~glà virus Nucleoproteins, Alluding to Similar Antigenic Landscapes among Marburgvirus and Dianlovirus* Viruses 2019, 11, 364; doi:10.3390/v11040364
- [16] B. Glick, W. Stokes, J. Smith, J. Broms, R. Ziemlinski C. Kaufman, J. Leigh, E. Reid, A. Rickerby, A. Glick, E. Losev, M. Scott *Snapgene viewer*, GSL Biotech LLC, 2004-2022
- [17] Nyitray L., Pál G. *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*, Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013
- [18] Wunderlich L. *Molekuláris biológiai technikák*, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Semmelweis Egyetem, 2014
- [19] Novagen *pET System Manual* TB055 8th Edition 02/99
- [20] invitrogen *One Shot BL21(DE3), One Shot, BL21(DE3)pLysS, One Shot, BL21(DE3)pLysE Competent Cells*, User Manual, Catalog nos. C6000-03, C6565-03, C6060-10, and C6060-03, 2010 https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/oneshotbl21_man.pdf (2024.11.06)
- [21] Hegyi Gy., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Micsonai A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., és Venekei I. *Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet*, Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013
- [22] <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/biokemia/dnsklon/laborgyak/gelefo.pdf> (2024.11.06)
- [23] <https://www.studocu.com/hu/document/budapesti-muszaki-es-gazdasagtudomanyiegyetem/az-elvalasztastechnika-korszeru-modszerei/gelelektroforezis-gepeltjegyzet-reszletes-leirassal-kepekkel/3692326> (2024.11.06)
- [24] <https://www.addgene.org/49386/> (2024.11.06)
- [25] J. Hrušková, K. Bhide, P. Petroušková, Z. Tkáčová, E. Mochnáčová, J. Čurlík, M. Bhide, A. Kulkarni *Engineering the Single Domain Antibodies Targeting Receptor Binding Motifs Within the Domain III of West Nile Virus Envelope Glycoprotein* Front. Microbiol. 13:801466. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.801466
- [26] <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/transformation-protocol-for-bl21-de3-competent-cells-c2527> (2024.11.06)

- [27] <https://www.protocols.io/view/One-Shot-TOP10-Chemically-Competent-E-coli-Transfo-14egn8kqg5dy/v1> (2024.11.06)
- [28] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D.,Bairoch A.: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*

A. Függelék

A.1. LB (Luria-Bertani) tápoldat

- 20 g szilárd LB por
- 1 l víz
- 121°C-on 30 percig történő sterilizálás autoklávban

A.2. LB táptalaj

- 35 g LB por
- 1 l víz
- 121°C-on 30 percig történő sterilizálás autoklávban

A.3. SOC oldat

- 20 g bacto-tryptone
- 5 g élesztő kivonat
- 0,58 g NaCl
- 0,19 g KCl
- 10 ml 1 M-os MgCl_2
- 10 ml 1 M-os MgSO_4

A bemért elegyet 1 literre kiegészítjük 1 liter MQ vízzel, és autoklávban 121°C-on 30 percig sterilizáljuk. Majd steril fülke alatt a steril oldatból 100 ml-hez 1 ml 2 M-os steril glükóz oldatot adunk.

A.4. PBS puffer

- 800 ml MQ víz
- 8 g NaCl
- 1,44 g Na_2HPO_4
- 0,2 g KCl
- 0,24 g K_2HPO_4
- a pH-t 7,2 és 7,4 közé kell állítani HCl segítségével
- a térfogatot 1 literre kell kiegészíteni desztillált víz segítségével
- 121°C-on 30 percig történő sterilizálás autoklávban

A.5. FPLC 'A' puffer

- 20 mM NaH_2PO_4
- 500 mM NaCl
- pH=8,00

A.6. FPLC 'B' puffer

- 20 mM NaH_2PO_4
- 500 mM NaCl
- 500 mM imidazol
- pH=8,00

A.7. SDS-poliakrilamid-gél

1 db 12,5%-os SDS-poliakrilamid gél összetétele:

- Alsó, szeparál gél összetétele
 - 4 ml „szeparáló gél” oldat, amely tartalmaz:
 - * 2,8 ml A puffer (182 g Tris-HCl + 4 g SDS / liter, pH=8,8)
 - * 21,75 ml MQ H_2O
 - * 15,75 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 3 μl TEMED (Tetrametil-etilén-diamin) – 30 μl APS (10%-os ammónium-perszulfát oldat)
- Felső, koncentráló gél összetétele:
 - 1,67 ml „koncentráló gél” oldat, amely tartalmaz:
 - * 6,3 ml B puffer (61 g Tris-HCl + 4g SDS / liter, pH=8,8)
 - * 15,9 ml MQ H_2O
 - * 2,825 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 3 μl TEMED (Tetrametil-etilén-diamin)
 - 30 μl APS (10%-os ammónium-perszulfát oldat)

B. Függelék

B.1. Az aWNV-APEX2-6His fehérje tulajdonságai

MW: 39,59 kDa, pI: 6,70,

Extinkciós koefficiens: $46995 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Abszorbancia: 1,187 (1 g/l koncentráció esetén);
feltételezve, hogy minden cisztein-maradék oxidált állapotban van,

Extinkciós koefficiens: $46870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Abszorbancia: 1,184 (1 g/l koncentráció esetén);
feltételezve, hogy minden cisztein-maradék redukált állapotban van [28]

B.2. Az aWNV-6His fehérje tulajdonságai

MW: 14,42 kDa, pI: 8,98,

Extinkciós koefficiens: $32555 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Abszorbancia: 2,257 (1 g/l koncentráció esetén);
feltételezve, hogy minden cisztein-maradék oxidált állapotban van,
Extinkciós koefficiens: $32430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Abszorbancia: 2,248 (1 g/l koncentráció esetén);
feltételezve, hogy minden cisztein-maradék redukált állapotban van [28]

B.3. Az APEX2-6His fehérje tulajdonságai

MW: 25,66 kDa, pI: 6,23

Extinkciós koefficiens: $14440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Abszorbancia: 0,563 (1 g/l koncentráció esetén)
[28]

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom a témavezetőmnek Dr. Jankovics Hajnalkának szakmai irányításáért, hasznos tanácsaiért, támogatásáért és, hogy türelmével és alapos szakmai hozzáértésével segítette a munkámat. Köszönet illeti Szigeti Mártont is szakmai tanácsaiért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Kuczmog Anettnek illetve Dr. Kemenesi Gábornak, valamint a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpontjának Virologiai Kutatócsoportjának a vírustesztek elvégzéséért illetve szakmai segítségükért.

Őszinte hálával tartozom Tóth Évának és mérhetetlenül nagy segítségéért és támogatásáért a kísérleti munkám során, és a molekuláris biológiai munkához elengedhetetlen jártasságok átadásában.

Illetve szeretném megköszönni Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium minden jelenlegi és volt dolgozójának akik segítségemre voltak ennek a dolgozatnak a megírásában.