



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TDK dolgozat

Az N-Cole7 metallonukleáz sejtmérgező hatása

KÉSZÍTETTE:

Schilli Gabriella Krisztina

I. Vegyész MSc hallgató

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi adjunktus

Németh Eszter, PhD hallgató

Szeged

2012

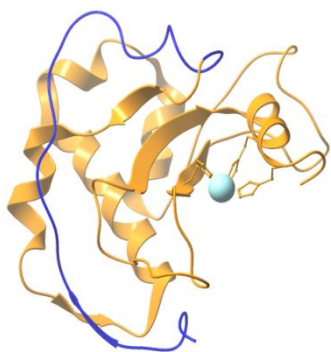
Tartalom

1. Bevezetés.....	1
2. Célkitűzés	2
3. Irodalmi összefoglaló	3
3.1. A nukleáz enzimekről általában	3
3.2. Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok.....	3
3.3. A ColE7 nukleáz előfordulása és felépítése.....	4
3.3.1. Az N-ColE7 szerkezete	5
3.3.2. HNH-motívum	6
3.3.3. Az N-ColE7 működési mechanizmusa.....	6
3.3.4. DNS kötés	7
3.3.5. Immunitásfehérje (Im7).....	8
3.3.6. A fémion szerepe az N-ColE7 szerkezetében és működésében	8
3.3.7. Allosztérikus szabályozás a fehérjékben.....	9
3.4. Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján	10
3.4.1. Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az N-ColE7- ben.....	10
3.4.2. A pontmutációk tervezésének előzményei	12
3.4.3. Probléma a mutáns fehérjék előállítása során	13
4. Kísérleti módszerek	15
4.1. Agaróz gélelektroforézis	15
4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	16
4.3. Rekombináns DNS technológia	17
4.3.1. Polimeráz láncreakció (PCR)	17
4.3.2. Hasítás	19
4.3.3. Ligálás	19
4.3.4. Transzformálás	20
4.4. UV-VIS spektrofotometria.....	20
4.5. A sejtekkel történő fehérjetermelés.....	21
4.6. GST (Glutathione Sepharose 4B) gyantán történő fehérje tisztítása	21
5. Eredmények	23

5.1.	A mutációk helyeinek megtervezése.....	23
5.2.	Pontmutánsok előállítása.....	25
5.3.	Az alaninmutánsok kifejezése az immunitásfehérjével együtt	30
5.3.1.	A mutánsok tisztítása GST-affinitás eljárással.....	31
5.3.2.	A tisztított fehérjék DNS hasításának vizsgálata	32
6.	Összefoglalás	34
7.	Hivatkozások.....	35
8.	Köszönetnyilvánítás.....	37
9.	Függelék.....	38
9.1.	A véletlen hibákat is tartalmazó előállított plazmidok.....	38
9.1.1.	A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája	38
9.1.2.	N-ColE7 szekvenciája	39
9.1.3.	Az általunk előállított mutáns plazmidok bázis- és aminosav szekvenciája a hasítási helyek közötti részben	39
9.2.	Kísérleti módszerek.....	41
9.2.1.	PCR-hez használt primerek	41
9.2.2.	1. PCR: az átfedő szakaszok előállítása	41
9.2.3.	Gél-extrakció:	42
9.2.4.	2. PCR: részek összetapasztása	42
9.2.5.	A DNS kinyerése a reakcióelegyből	43
9.2.6.	Hasítás EcoRI és XhoI enzimekkel	43
9.2.7.	Ligálás:	44
9.2.8.	Transzformálás:	44
9.2.9.	Kolónia PCR	44
9.2.10.	Plazmidtisztítás	45
9.2.11.	PCR a plazmidokról szekvenáláshoz	45
9.2.12.	DNS-minták koncentrációjának meghatározása	45
9.2.13.	SDS-PAGE	45
9.2.14.	OD ₆₀₀ mérés	46
9.2.15.	Agaróz gélelektroforézis	46

1. Bevezetés

A genetikai betegségeket a gének hibás szekvenciája okozza. Ezeket a betegségeket úgy lehetne gyógyítani, hogy a hibát kijavítjuk. Mivel az ilyen hibákat a sejtek DNS-javító mechanizmusa nem ismeri fel, a hibás bázisszekvenciánál vagy annak közvetlen közelében elhasítva a DNS-t indukálhatjuk a javító folyamatokat. A természetes javítómechanizmus észleli ezt a sérülést, és megfelelő templát jelenlétében a sérüléssel együtt a betegséget okozó hibát is kijavítja. Több specifikus (DNS hasítására alkalmas) nukleázt ismerünk, azonban ezek száma még így is kevés ahhoz, hogy tetszőleges helyen hasítsuk a genomialis DNS-t. Ehhez olyan nukleázra van szükség, amelyben szabadon változtatható a tapadási rész specifikussága. Ilyen céllal állították elő a cinkujj-Fok-I nukleázokat, melyekről azonban kiderült, hogy citotoxikusak. Ennek feltehetőleg az az oka, hogy a sejtben a fehérje



1.1. ábra: Az N-ColE7 Röntgen-diffrakciós szerkezete. [8]

esetleges sérülésének következtében az már nem-specifikusan kötődhet a DNS-hez. Amennyiben az aktivitását a sérülés okozta változások ellenére sem veszíti el, a DNS-t több helyen is elhasíthatja, amivel a sejt halálát okozza. Kutatócsoportunk célja egy pozitív allosztérikus szabályozással rendelkező nukleáz létrehozása, amire a colicin E7 bakteriális toxin nukleáz doménje (N-ColE7) tűnt alkalmasnak (1.1. ábra). Az N-ColE7 ugyanis csak akkor rendelkezik nukleáz aktivitással, ha a szekvencia mindkét vége, azaz az N-, és a C-terminális részei egymáshoz képest megfelelően közel helyezkednek el. Egy ilyen fehérje N-, és C-terminális szakaszát megőrizve, közéjük a DNS-t specifikusan kötő cinkujj fehérjét beépítve, az új enzim csak a DNS megkötődése után rendelkezhet az aktivitáshoz szükséges konformációval. Egy ilyen újszerű cinkujj nukleáz létrehozása bonyolult folyamat. Pontosán kell tudni, hogy hová és hogyan építsük be a cinkujjakat ahhoz, hogy az új nukleáz aktív legyen a kívánt körülmények között. Mindenekelőtt fontos tudnunk, hogy a terminális részek megfelelő elhelyezkedését mely aminosavak kölcsönhatásai biztosítják. Ennek érdekében azt vizsgáltam, hogy az N-ColE7 N-terminális részén lévő aminosavak közül melyik lehet szükséges az aktivitás megtartásához.

2. Célkitűzés

Kutatócsoportunk célja egy a DNS-hez tetszőlegesen választott szekvenciánál specifikusan kötődő, pozitív allosztérikus kontrollal rendelkező nukleáz létrehozása. Ehhez a colicin E7 nem-specifikus metallonukleáz doménjét (N-ColE7) szeretnénk felhasználni cinkujj motívumokkal biztosítva a kívánt szekvenciához való kötődést.

Az N-ColE7 fehérje aktivitásához szükséges, hogy az N- és a C-terminális végei megfelelő közelségben helyezkedjenek el egymáshoz, és így a hasítási mechanizmushoz szükséges kölcsönhatások kialakulhassanak. Az N-terminális részen levő aminosavak nélkül az enzim elveszíti az aktivitását, ezért fontos megvizsgálni, hogy a cinkujjak beépítése során mely aminosavakat szükséges az eredeti szekvenciából megtartani, hogy a fehérje csak a kívánt körülmények között legyen aktív.

Munkám célja a fentiek alapján annak vizsgálata volt, hogy az N-terminális részen kiválasztott aminosavak közül, melyeknek van jelentős szerepe az aktivitás kialakításában, valamint, hogy ezen kölcsönhatások hiánya elég-e ahhoz, hogy az N-terminális oldallánc elhelyezkedése megváltozzon, és így az aktivitás megszűnjön. Ennek érdekében terveink között szerepelt:

- az N-ColE7 N-terminális részén azon aminosavak kiválasztása, melyek fontosak lehetnek a C-terminális katalitikus központtal kialakított kölcsönhatások szempontjából, majd ezek cseréje alaninra a fehérjét kódoló DNS megváltoztatása révén;
- a mutáns gének baktériumban történő sokszorosítása;
- a módosított DNS molekuláról kifejezett fehérjék túltermelése *E. Coli* baktériumban;
- a fehérjék sejtmérgező hatásának vizsgálata DNS hasítási kísérletekben.

3. Irodalmi összefoglaló

3.1. A nukleáz enzimekről általában

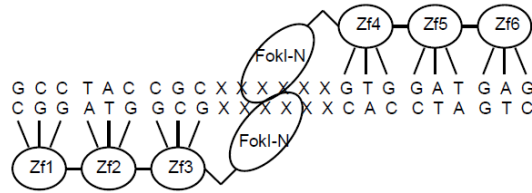
A nukleázok olyan enzimek, amelyek a DNS-ben és/vagy az RNS-ben a nukleotid egységek közötti foszfodiészter kötések hidrolitikus hasítását katalizálják. Az exonukleázok a terminális, míg az endonukleázok a láncközi kötések hidrolizálják. Ismerünk nem-specifikus és specifikus nukleázokat is. Utóbbiak csak adott DNS-szekvencia hasítására képesek, ilyenek pl. a restrikciós endonukleázok.

A nukleázok számos sejtfolyamatban vesznek részt, mint a DNS-javítás, replikáció, restrikció, rekombináció [1]. A katalízis mechanizmusa sokféle lehet, de a legtöbb esetben fémion szükséges hozzá. Leggyakrabban kétvegyértékű fémionok, pl. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} vesznek részt. A fémion a következő feladatokat láthatja el:

- 1) aktiválhatja a vízmolekulát, amely így általános nukleofil bázisként a hasadó foszfát támadásáért felelős;
- 2) szerepet játszhat a szubsztrát megkötésében és annak elektrosztatikus aktiválásában;
- 3) Lewis savként stabilizálhatja az ötértékű negatívan töltött foszforán átmeneti állapotot;
- 4) általános savként a fémion által kötött vízmolekula pedig protonálhatja a távozó csoportot [2].

3.2. Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok

A cinkujj-nukleázok olyan kimér fehérjék, melyek egy nem-specifikusan hasító nukleáz, és általában három specifikusan kötődő cinkujj doménből állnak, a teljes fehérje specifikusan hasítja a DNS-t az általunk tervezett helyen, és így a sejt saját javítómechanizmusával érzékeli és megfelelő templát jelenlétében korrigálja a génhibát. Erre a célra állították elő a FokI cinkujj nukleázokat. A FokI a természetben is előforduló nem-specifikus nukleáz doménnel rendelkező fehérje [3].

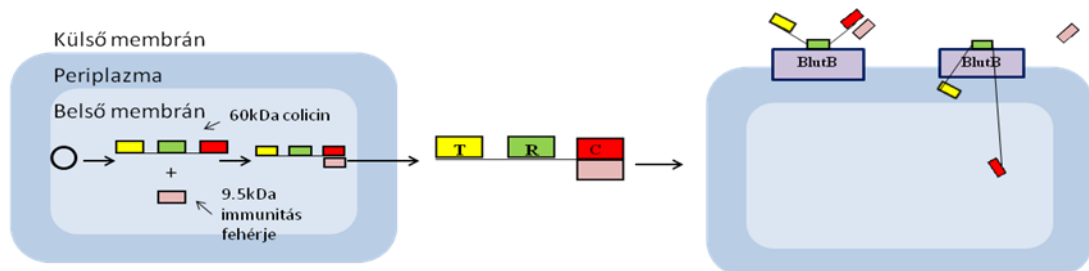


3.1. ábra. A DNS molekulához specifikusan kötődő cinkujjakkal összekapcsolt FokI nukleáz dimerként hasítja a DNS-t.

A 3.1. ábrán látható dimerként működő cinkujj nukleáz a DNS kettős szálát egyszerre hasítja el. Ez a mesterséges fehérje citotoxikusnak mutatkozott [4]. Ennek az lehet az oka, hogy a sejtben a fehérje megsérül, aminek hatására nem-specifikus módon is megkötődhet a DNS-en. Amennyiben az aktivitását a sérülés okozta változások ellenére sem veszíti el, a DNS-t több helyen is elhasíthatja, amivel a sejt halálát okozza. Feltételezzük, hogy ennél biztonságosabb mesterséges nukleázt lehetne előállítani, ha a FokI helyett egy módosított colicin E7 nukleáz domén szerepelne. Diákköri munkám során ezért az N-ColE7-ben kialakítható allosztérikus szabályozást tanulmányoztam.

3.3. A ColE7 nukleáz előfordulása és felépítése

Az *Escherichia Coli* baktérium colicin fehérjéket termel az idegen baktériumsejtekkel szembeni védekezés céljából. E fehérjék membránkötő, membrán transzlokációs és citotoxikus doménekből állnak [5]. A különböző colicinek az idegen baktériumsejtbe jutva eltérő módon fejtik ki citotoxikus hatásukat. Egyes típusuk DNáz vagy RNáz funkcióval rendelkezik, mások ionofórok. A gazdasejtek a nukleáz doménhez specifikusan kötődő immunitásfehérjéket termelnek, annak érdekében, hogy megvédjék magukat a citotoxikus hatástól.

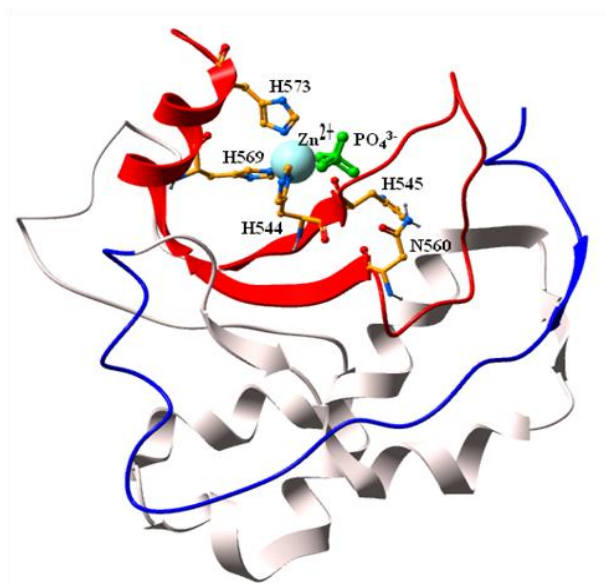


3.2. ábra. A colicin E7 működésének sematikus ábrája. Sárga szín a transzlokációs, zöld a receptorkötő, a piros a nukleáz domént jelöli [6].

A colicin E7 nem-specifikus DNáz és RNáz [7] aktivitással rendelkező fehérje. A gazdasejtből kijutva az idegen baktériumsejt külső membránján lévő BtuB-receptoron megkötődik és a transzlokációs domén segítségével a nukleáz domén (N-ColE7) bejut a sejtbe (3.2. ábra). Itt nem-specifikus módon elhasítja a kromoszómális DNS molekulát, elpusztítva az idegen sejtet. Ez a folyamat azért nem következik be a gazdasejtben, mert az a ColE7 mellett az Im7 nevű immunitásfehérjét is termeli, amely a colicin E7 nukleáz doménjének szubsztrátkötő részével alakít ki kölcsönhatást, megakadályozva a nukleáz DNS-hez történő kötődését [8].

3.3.1. Az N-ColE7 szerkezete

Az N-ColE7 egy $\beta\alpha$ -fémion-kötő motívumot tartalmaz, amely a DNS nem-specifikus hasításáért felelős. Aktív központban Zn^{2+} -ion található, amely három hisztidinhez (His544, His569 és His573) koordinálódik torzult tetraéderes szerkezetben. A negyedik, szabad koordinációs helyet betöltheti egy vízmolekula, egy foszfátion vagy a szubsztrát DNS hasadó foszfátja. Ez az aktív központ az N-ColE7 C-terminális részén helyezkedik el az utolsó 30 aminosav által alkotott ún. HNH-motívumban (3.3. ábra) [9].



446 - K R N K P G K A T G K G K P
V N N K W L N N A G K D L G S P
V P D R I A N K L R D K E F K S F
D D F R K K F W E E V S K D P E L
S K Q F S R N N N D R M e t K V G K
A P K T R T Q D V S G K R T S F E
L H H E K P I S Q N G G V Y D M e t
D N I S V V T P K R H I D I H R G K
– 577

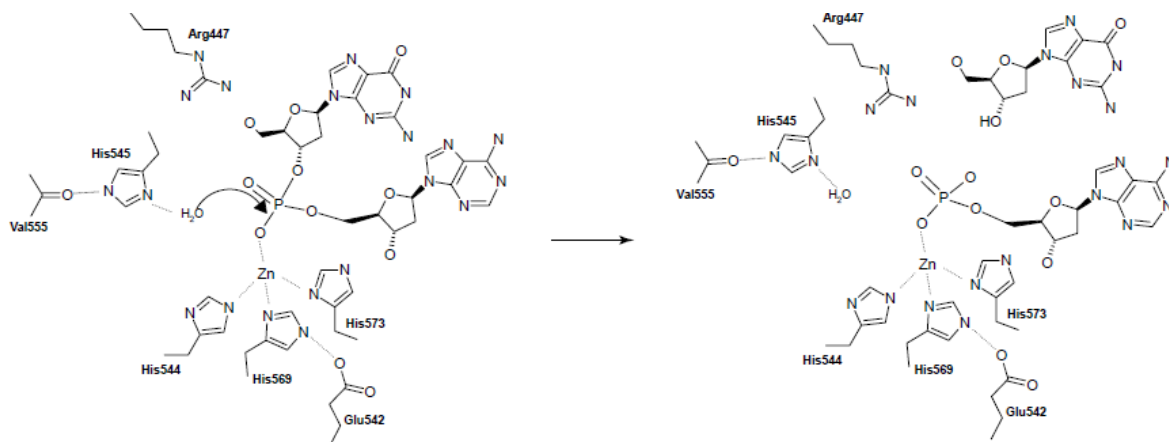
3.3. ábra: Az N-ColE7 szerkezete (PDB kód: 1M08, [8]) és aminosav-szekvenciája. Kék színnel az N-terminális, míg piros színnel a C-terminális szakaszt jelöltük. A világos kék gömb a cinkiont és a zöld szín a foszfátcsoportot jelöli. Az aminosav-szekvencia számozása megegyezik a ColE7 számozásával.

3.3.2. HNH-motívum

A colicinek nukleáz doménjei nagy szekvencia-hasonlóságot mutatnak. A C-terminális részen egy EXHHX₁₄NX₈HX₃H konszenzus szekvenciát tartalmaznak [2], mely a benne lévő aminosavakról a HNH-motívum nevet kapta: a HNH motívumban mindig jelen van két megőrződött hisztidin és egy aszparagin [10]. A motívum két antiparalell β -redőzött lánc egy α -hélixhez kapcsolódik, a központjában egy kétértékű fémion található. Szerkezete nagyon hasonló a cinkujj motívumhoz, azonban a fémiont itt három hisztidin koordinálja. Emellett a HNH motívumban rövidebb az α hélix, hosszabb hurok köti össze a két β redőt és a cinkion negyedik liganduma nem a fehérje hanem egy vízmolekula vagy a szubsztrát [2].

3.3.3. Az N-ColE7 működési mechanizmusa

Az N-ColE7 molekula hidrolitikusan hasítja a DNS foszfodiészter kötéseit. A pontos reakciómechanizmus még nem tisztázott. Feltételezett mechanizmusát a 3.4. ábra szemlélteti [11].



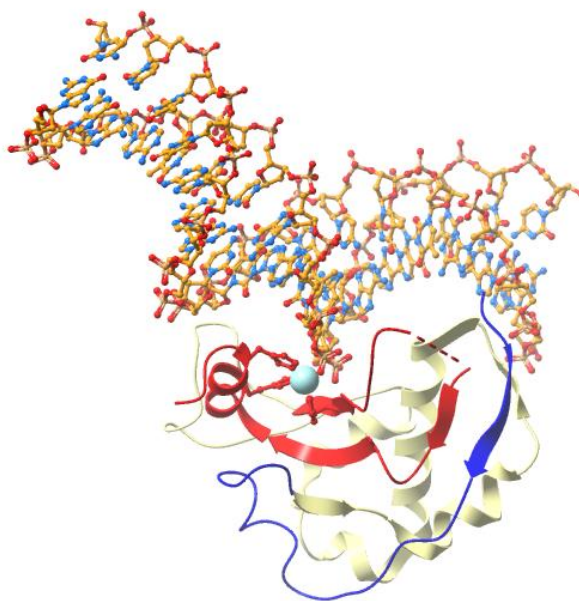
3.4. ábra Az N-ColE7 feltételezett működési mechanizmusa [11]

Első lépésben az 545-ös hisztidin (H545) általános bázisként deprotonál egy vízmolekulát. Az így képződő hidroxidion nukleofil támadást indít a hasadó foszfátcsoporra. A cinkion megköti a hasadó foszfátcsoportot és stabilizálja a reakció átmeneti állapotát. A hidrolitikus reakciókban szükség van még egy általános savra, amely protont szolgáltat a távozó csoport 3'-oxigénjének. A Mg^{2+} -tartalmú nukleázoknál ezt a

funkciót a hat koordinációs hellyel rendelkező fémionhoz kötődő vízmolekula látja el. Azonban ebben a fehérjében a cinkion tetraéderes koordinációs szférával rendelkezik: három hisztidin és a foszfátion koordinálódik hozzá. Több elmélet létezik arra vonatkozóan, hogy mi látja el az általános sav szerepét. A DNS megkötődése során a Zn^{2+} -ionnak kialakulhat egy ötödik koordinációs helye [2], ahová megkötődhet egy vízmolekula. Mások szerint a HNH-motívum közelében megjelenő megőrződött 447-es arginin oldallánca tölti be feltételezhetően ezt a szerepet [11].

3.3.4. DNS kötés

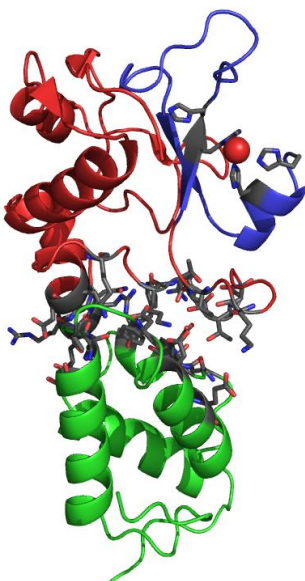
Az N-ColE7 nem-specifikus módon kötődik a DNS molekulához az α -hélix részek révén a nagyárokban, míg a HNH-motívum a DNS molekula kisárkába kerül (3.5. ábra), közrefogva a DNS egyik szálát [7]. A fehérje szerkezetét különböző hosszúságú DNS-hez való kötődés során vizsgálva kiderült, hogy a hidrolízishez minimum 8 bázispárra van szükség. A vizsgálatok során azt is megállapították, hogy az N-ColE7 képes RNS molekula hasítására is.



3.5. ábra. Az N-ColE7 DNS molekulával kialakított komplexe (PDB kód: 2IVH, [12])

3.3.5. Immunitásfehérje (Im7)

Az immunitásfehérje (Im7) specifikusan kötődik az N-ColE7 nukleáz doménjének a hélixeket tartalmazó DNS kötő részéhez, ezzel akadályozva a szubsztrát megkötését és szüntetve meg az enzim aktivitását. Ez egy erős kölcsönhatás, amelyért hidrogénkötések és elektrosztatikus kölcsönhatások felelősek. Az ionos kölcsönhatások az immunitásfehérje felületén elhelyezkedő negatív töltésű savas aminosav oldalláncok (aszparaginsavak) és a nukleáz pozitív töltésű felületi oldalláncai (pl.: lizin és arginin) között alakulnak ki [9].



3.6. ábra. Az NColE7 Im7-el kialakított komplexe. A 3 α -félixből álló zöld színnel jelölt rész az immunitásfehérjre (PDB kód: 7CEI, [9]).

3.3.6. A fémion szerepe az N-ColE7 szerkezetében és működésében

Az N-ColE7 aktív központjában cinkion található, ami a szerkezet stabilitásáért [13] és a katalitikus hidrolíziséért [14] egyaránt felelős. Az aktivitás feltétele egy kétvegyértékű fémion jelenléte az aktív központban [14]: nemcsak cinkion, hanem pl. Ni^{2+} , Mn^{2+} és Co^{2+} , és alkáliföldfémionok is (pl. Ca^{2+} , [13]) elősegíthetik az aktivitást [7].

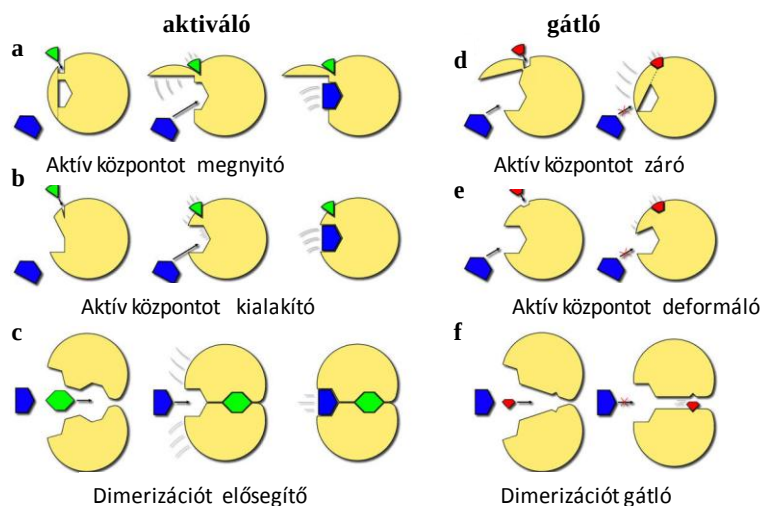
Az N-ColE7-ről készült olyan kristályszerkezet, melyben a cinkiont a fehérje DNS-sel alkotott komplexéből a kristályosítás során EDTA-hozzáadással eltávolították. A három hisztidin közül kettő megőrizte a konformációját a cinkion távollétében is, a harmadik orientációja megváltozott, de a fehérje általános szerkezete nem változott meg jelentősen [7].

A cinkion részt vesz a hidrolitikus reakcióban: a 3.1. fejezetben említett feladatok közül a szubsztráthoz kötődik aktiválva azt, valamint stabilizálja az ötértékű negatívan töltött foszforán átmeneti állapotot. Vitatott, hogy el tudja-e látni az általános sav szerepét is, ugyanis nincs szabad koordinációs helye a vízmolekula megkötésére.

Magnéziumion hozzáadása az N-ColE7-hez növelte a fehérje aktivitását. Ez alapján feltételezhető, hogy az N-ColE7 tartalmaz egy második fémkötő helyet a Mg^{2+} -ion számára, amely csak DNS jelenlétében kötődik meg [2].

3.3.7. Allosztérikus szabályozás a fehérjékben

A fehérje allosztérikus szabályozásáról akkor beszélünk, ha az effektorként vagy inhibitorként szolgáló ligandum megkötődése az aktív centrumtól jól elkülöníthető helyen történik meg. Ez a távolság néhány Å-tól több 10 Å-ig terjedhet. Különböző mechanizmusú allosztérikus szabályozással rendelkező fehérjék vannak. Néhány típus működési elvét a 3.6. ábra szemlélteti [15]. A 3.7. ábra **a** pontjában a ligandum megkötődésének a hatására a fehérje konformációja megváltozik, oly módon, hogy a szubsztrátkötőhely hozzáférhetővé válik. A **b** pontban a ligandum-fehérje kötés kialakulásának következtében, a fehérje aktív központjának szerkezete megváltozik, szubsztrátkötésre alkalmassá válik.



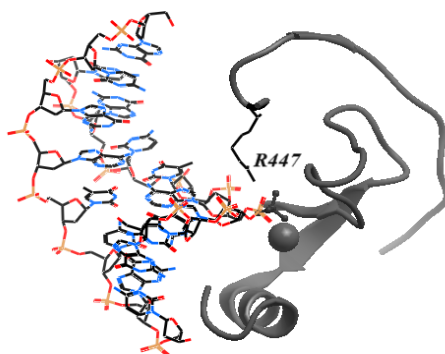
3.7. ábra Allosztérikus szabályozás mechanizmusának néhány típusa. Zöld és piros szín a ligandumot, kék szín a szubsztrátot, a sárga szín a fehérjét jelöli [15].

A **c** pont a dimerizációt elősegítő ligandumok mechanizmusát szemlélteti: a ligandum fehérjéhez való kötődését követően a fehérje könnyebben dimerizálódik és a dimer kialakulása során létrejön az új fehérjében egy szubsztrátkötőhely.

3.4. Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján

3.4.1. Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az N-ColE7-ben

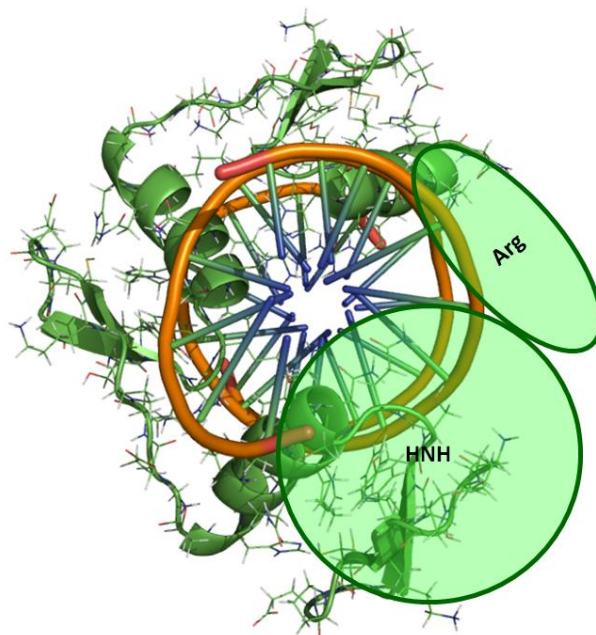
Kutatócsoportunkban mutációanalízis segítségével kimutatták, hogy az N-ColE7 C-terminális részén levő aktív centrum kölcsönhatásban van az N-terminális részen lévő pozitív töltésű aminosavakkal. Az utolsó négy aminosav (KRNK) nélkül a fehérje elveszíti az aktivitását. Ezek közül az argininnek (R447) fontos szerepet tulajdonítanak a hasadó foszfátcsoport megkötésében a térbeli közelség és az erős elektrosztatikus kölcsönhatások révén (3.8. ábra). Mivel azonban a fenti négy aminosav egy mozgékony hurok része, felmerül a kérdés, hogy milyen kölcsönhatások teszik lehetővé, hogy a C-terminális rész közelébe kerülhessenek.



3.8. Ábra. Az R447 szerepét szemléltető N-ColE7-DNS komplex szerkezete [16]. A képen az N-ColE7 szerkezetének C-terminális (HNH-motívum) és N-terminális (hurok) része van csak feltüntetve

A pozitív allosztérikus szabályozással rendelkező mesterséges fehérje szerkezetének kialakítását úgy képzeljük el, hogy az N-ColE7 N-terminális szakaszához 3-4 cinkujj-motívumból álló specifikus DNS-kötő domént kapcsolunk, majd cinkujj fehérjéhez hozzákapcsoljuk az N-ColE7-ből származó HNH-motívumot, ahogy azt a 3.9. ábra szemlélteti. Ez az új fehérje a cinkujjoknak köszönhetően specifikusan megkötődve

körülöleli a DNS-t, miközben a fehérje terminális részei megfelelő térszerkezetbe kerülnek. Ennek hatására a nukleáz aktívvá válik és elhasítja a DNS-t.

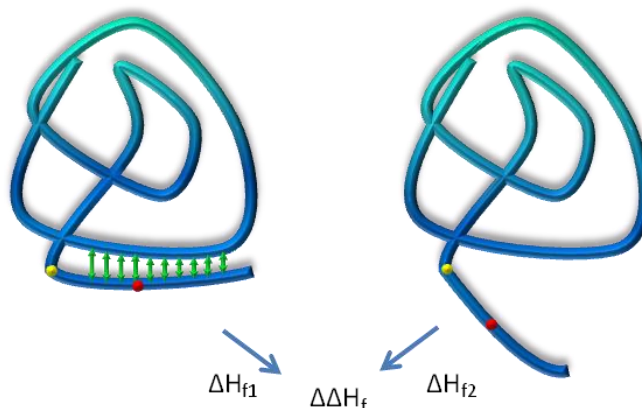


3.9. ábra. A mesterséges cinkujj-N-ColE7 kimér fehérje szerkezetének sematikus terve DNS komplexében. A DNS felülnézetből látható középen, a *HNH* jelű rész utal az N-ColE7 aktív központjára, míg az *Arg* jelű egység az N-ColE7 N-terminális végéből származó, arginin tartalmú szabályozó rész.

A 3.9. ábrán látható N-ColE7 nukleáz domént tartalmazó tervezett fehérjének az aktiváló jellegű allosztérikus szabályozási mechanizmusa a 3.7. ábrán látható **b** típusra hasonlít leginkább. Ennek lényege, hogy az ott zölddel jelölt ligandum megkötődésének a hatására (ami esetünkben maga a szubsztrátmolekula, mely az aktív központtól távol elhelyezkedő cinkujjakhoz kapcsolódik) a fehérje konformációja megváltozik: az aktív központot alkotó C- és N-terminális részek egymáshoz közel kerülnek a szubsztrát átalakítására alkalmas helyzetet kialakítva. Ez megfelelne annak a célkitűzésnek, hogy egy olyan nukleázt hozzunk létre, amely a DNS szubsztrát specifikus kötődése nélkül nem rendelkezik az aktivitáshoz szükséges konformációval. Egy ilyen enzim ugyanis a fehérje esetleges sérüléseinek következtében nem lesz képes a DNS-t nem-specifikus helyen elhasítani.

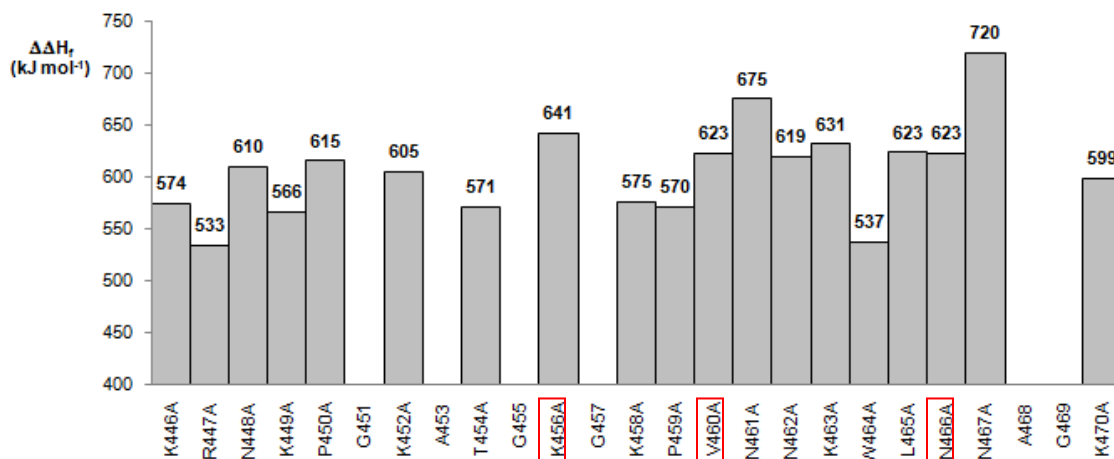
3.4.2. A pontmutációk tervezésének előzményei

A munkám során tervezett pontmutációk helyének kiválasztása egyrészt az irodalomban közölt Röntgen-diffrakciós szerkezetek alapján feltételezhető kölcsönhatások, másrészt a tanszéken korábban elvégzett kvantumkémiai számítások alapján történt. Az N-ColE7 fehérje N-terminális részén lévő utolsó 25 aminosav oldalláncainak a fehérje többi részével kialakított kölcsönhatásait szemiempirikus kvantumkémiai számításokkal tanulmányozták. Az ún. virtuális alanin-scan során minden egyes oldallánc alaninra történő cseréjét követően kiszámították a gombolyag képződési entalpiáját, majd a láncban a K470 és a D471 aminosavnál (az 3.10. ábrán sárga körrel jelölve) mesterséges torziót hoztak létre és az így keletkezett, torz szerkezetű alanin-mutánsoknak is kiszámították a képződési entalpiáját (3.10. ábra).



3.10. ábra. Alanin-scan számítások sematikus ábrája. A sárga kör a K470 és a D471 közötti torzió helyét, piros kör a mutáció helyét, míg a zöld nyilak az N-terminális részen lévő aminosavak oldalláncai és a fehérjegombolyag közötti kölcsönhatásokat jelölik.

Páronként az entalpia értékek különbsége (3.11. ábra) alapján becsülhető az egyes oldalláncok és a fehérjemolekula többi része közötti kölcsönhatás erőssége.

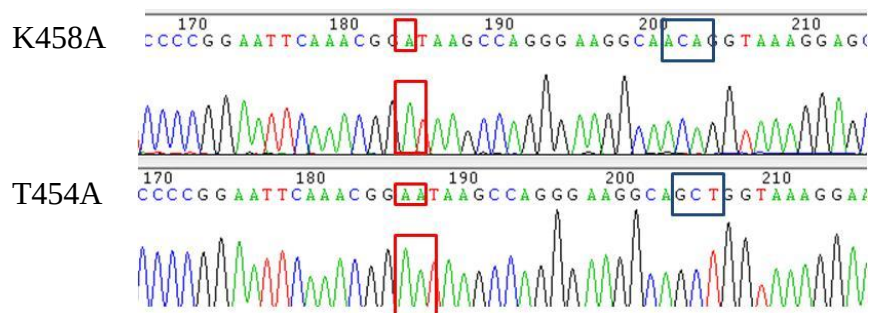


3.11. ábra. Kvantumkémiai számítások eredményeként kapott entalpia-különbségek az egyes mutánsokra nézve [16].

Minél kisebb a entalpiakülönbség értéke, a csere annál nagyobb változást okozott a lánc kötődésében, vagyis a kicserélt aminosav-oldallánc annál erősebb kölcsönhatást alakított ki az eredeti fehérjemolekulában. Feltételezhető tehát, hogy annál fontosabb a szerepe az aktivitás kialakításában.

3.4.3. Probléma a mutáns fehérjék előállításánál

Előző helyi TDK munkám során a fentiek alapján kiválasztott aminosavak alaninra történő cseréjét terveztem. A transzformált baktériumokból kinyert plazmidokról készült PCR alapján a reakciók sikeresnek tűntek. A szekvenálás alapján a vizsgált három mutáns esetében sikerült a ligálás és a tervezett mutáció (3.12. ábra), azonban véletlenszerű hibák jelentek meg a szekvenciákban. Ezen fehérjék vizsgálatát annak feltételezésével végeztük el, hogy a véletlenszerű mutáció nem okoz problémát, ha az így módosított aminosav várhatóan nincs jelentős hatással az aktivitásra. Emellett több esetben találtunk bázishiányt a szekvencia kezdő részletében (3.12. ábra). Ez a fehérjetermelés során egy stop kód gyors megjelenéséhez vezet, és így nem a kellő hosszúságú fehérje fejeződik ki.



3.12. ábra A K458A és T454A plazmidok szekvenálása. Piros négyszöggel jelöltem a K458A és a W464A plazmidban fellépő hibák helyét. Kék négyszögben a T454A mutáció helye látható.

A T454A és a W464A előállítás során a DNS-szekvenciában több báziscsere történt, melyek elhelyezkedése véletlenszerű volt. Ezeknek az oka lehet, hogy a DreamTaq polimeráz megbízhatósága korlátozott, mert nem rendelkezik javítómechanizmussal, ezért a körülmények optimálistól való kismértékű eltérése is zavarokat okozhat a működésében. Mivel a mutációkat két lépésben hoztuk létre, felmerült a kérdés, hogy a hibák melyik PCR során keletkeztek. Ennek kiderítésére szisztematikus vizsgálatot végeztünk. Az egyik hibás T454A plazmidot és az arról készült két párhuzamos PCR-elegyet szekvenáltatva kiderült, hogy az előállított plazmid hibás volt, és hibái ugyanúgy jelentek meg az erről készült PCR-termékekben. Ezután azt feltételeztük, hogy gént előállító PCR során történnek a hibák, és azok a hőmérséklet növelésével megszüntethetők. A hibridizációs hőmérséklet emelésének hatására a hibák száma nem változott egyik mutánsnál sem.

4. Kísérleti módszerek

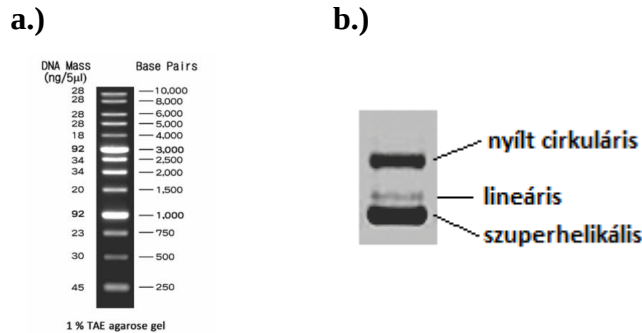
A kísérletek részletes leírása a függelékben, a 8.2. fejezetben található meg, az alábbiakban csak az egyes módszerek elvi hátterét mutatjuk be.

4.1. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis DNS fragmensek tisztítására, hosszának és formájának (szuperhelikális, lineáris, nyílt cirkuláris) vizsgálatára szolgáló technológia. Elektromos térben a DNS molekula a negatív töltéseinek hatására a pozitív pólus felé vándorol. A gél üregeiben az áramlás sebessége fordítottan arányos a DNS méretével: a kisebb molekulák gyorsabban haladnak. Az elválasztáshoz agaróz gél-t használunk, amely egy agarobióz diszacharid egységekből felépülő poliszacharid. Meleg TAE (tris, ecetsav és EDTA-tartalmú) pufferoldatban feloldva, majd megfelelő formába öntve megszilárdul, és egy üreges gél alakul ki. Általában 1 g/100ml (1%) koncentrációjú gél-t állítunk elő, de az agaróz koncentrációjának növelésével a gél üregeinek mérete csökken, ami lassítja a benne áramló DNS molekulákat. Így alkalmas koncentráció megválasztásával elérhető a vizsgálni kívánt DNS molekulák méret szerinti elválása.

A gélben a DNS láthatóvá tehető pl. fluoreszcens jelölő molekulával (etídium-bromid), amely a kettősszálú DNS molekulába interkalálódva UV fénnel gerjeszthető és a látható fény tartományában emittál.

A minta mellé felvitt ún. marker DNS különböző, ismert hosszúságú lineáris DNS molekulákat tartalmaz. A minta sávjának helyét összevetve a marker sávjaival becsülhető a minta DNS mérete (4.1.a. ábra). Ha plazmid DNS-t tartalmazó mintát futtatunk, az lehet helikális, szuperhelikális és cirkuláris, a különböző konformációjú DNS molekulák eltérő sebességgel haladnak (4.1.b. ábra).



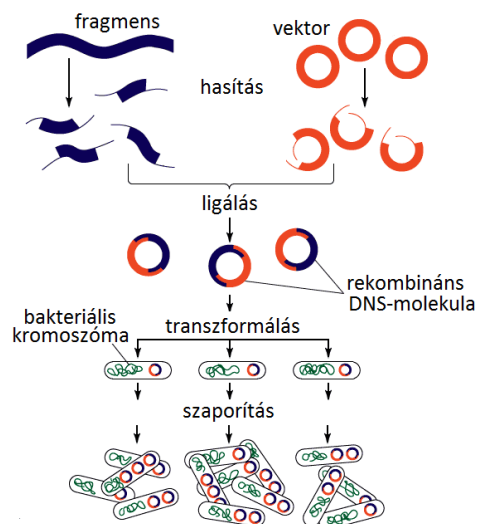
4.1. ábra a) Lineáris DNS agaróz gélelektroforézis alapján történő méretbecsléséhez használt marker és **b)** példa a DNS térszerkezetének hatására történő elkülönítésre.

4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis) a fehérjék méret-szerinti elválasztására alkalmas módszer. A nátrium-dodecil-szulfát (SDS) olyan felületaktív anyag, amely a fehérjemolekulát denaturálja (a nemkovalens kötések elhasításával megszünteti a natív szerkezetet), és a polipeptidláncok felületét a méretükkel arányos mennyiségű negatív töltéssel körbevonja. Az SDS segítségével negatív töltéssel ellátott fehérjék oldatát a futtatókádban lévő pufferoldatba merülő gél zsebeibe juttatva egyenáramú elektromos feszültség hatására a fehérje a pozitív pólus felé vándorol. A gél üregeiben történő vándorlás sebességét a molekula mérete szabja meg: a kisebb méretű fehérjék gyorsabban haladnak. A gél a következő komponensekből áll: akrilamid, bisz-akrilamid, nátrium-dodecil-szulfát, trisz(hidroximetil)-aminometán, HCl, ammónium-perszulfát (APS) és N,N,N,N-tetrametil-etiléndiamin (TEMED). Az APS és a TEMED a vinil addíciós polimerizációs folyamatok megindításáért felelősek. A bisz-akrilamid és az akrilamid molekulák között keresztkötések jönnek létre, aminek fontos szerepe van a pórusszerkezet kialakulásában. A fehérjék megjelenítése festékekkel történhet. Különböző, de ismert méretű fehérjéket tartalmazó marker egyidejű futtatásával, a vizsgált fehérje hozzávetőleges molekulatömege meghatározható.

4.3. Rekombináns DNS technológia

A rekombináns DNS technológia lehetővé teszi módosított DNS előállítását, sokszorosítását. Első lépésben polimeráz láncreakcióval (PCR) előállítjuk a mutáns DNS-t kis mennyiségben, melyet baktériumsejtbe juttatva sokszorosíthatunk. A PCR során keletkező gén lineáris, azonban a baktérium csak cirkuláris DNS-t vesz fel. Ezért cirkuláris DNS hordozóba, ún. plazmidba építjük be. Ennek egy módja, hogy a plazmidot és az új DNS szakaszt azonos restrikciós endonukleázzal elhasítva összeillő „ragadós” végeket alakítunk ki, melyeket ligáz enzimmal összekapcsolunk. Ha a plazmid a sejt által felismert replikációs origóval rendelkezik, képes a sejtben sokszorozódni. A sejteket táptalajon szaporítva nagymennyiségű DNS állítható elő, melyet kinyerhetünk, majd fehérjetermelésre optimalizált sejtbe juttatva kifejezhetjük a gén által kódolt módosított fehérjét. A folyamatot a 4.2. ábra szemlélteti.



4.2.Ábra A rekombináns DNS technológia

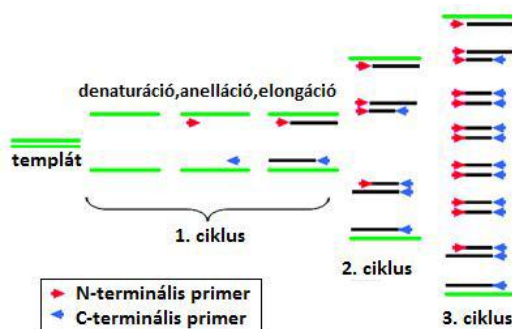
4.3.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (PCR) során egy kettősszálú DNS kívánt szakaszát megsokszorozzuk. A reakcióelegy elkészítéséhez az alábbiakra van szükség.

1. DNS templát, amely tartalmazza a sokszorosítani kívánt DNS szakaszt.
2. Hőstabil DNS polimeráz enzim, amely katalizálja a komplementer nukleotidok beépülését. Ilyen például a Taq polimeráz.

3. A polimeráz enzimnek szüksége van a reakció elindulásához egy rövid kettősszalú részre a templát DNS-en, melyet meghosszabbíthat. Ezt biztosítják a primerek. Ezek a mesterséges oligonukleotidok a templáthoz kötődve egyben határolják is a célszekvenciát. Ha a primerek végére mutációkat építünk be, akkor a PCR során az eredeti templát helyett az adott részen mutáns gén sokszorozódik.
4. dNTP (dezoxi-nukleotid-trifoszfát) keverék: citozin-, adenozin-, guanozin- és timidin-trifoszfátok.
5. Magnéziumion.
6. Pufferoldat, mely a polimeráz optimális működését biztosítja.

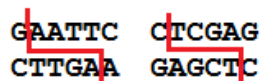
A reakciót három lépésre lehet elkülöníteni. Elsőként 98 °C-ra melegítjük fel az oldatot, aminek hatására a kettősszalú DNS bázisai közötti hidrogénkötések felszakadnak, a DNS-szálak elválnak egymástól. A következő lépés az anellálás. Ekkor az oldatot lehűtjük a primerek olvadáspontja környékére. Ennek hatására a primerek specifikusan hozzátapadnak a szétvált DNS komplementer szakaszaihoz, kijelölve a megsokszorozandó szakaszt. A harmadik lépés során a hőmérsékletet 72°C-ra emelve a DNS-polimeráz enzim megkezdí dNTP-k felhasználásával az új szálak felépítését 5'→3' irányban. A fenti három lépés egy ciklust alkot, melyet addig ismételhetünk, amíg kívánt mennyiségű DNS-t kapunk vagy az oldatból el nem fogy valamely komponens, illetve a hatékonyság csökkenéséig. Az általunk alkalmazott körülmények között (templát, primer és dNTP-k mennyisége) általában 30 ciklust állítottunk be. A cél-DNS mennyisége mindegyik ciklus alatt megkétszereződik a replikációs folyamat során (4.3. ábra).



4.3.Ábra PCR működési elve

4.3.2. Hasítás

A klónozó vektor (plazmid) és a PCR-elegyből származó, sokszorozni kívánt DNS szakasz hasítása során a restriktációs endonukleáz a kettősszálú DNS molekulák mindkét szálát elhasítja úgy, hogy összeillő, úgynevezett ragadós végek keletkeznek. Ezek az enzimek ún. palindrom szekvenciákat ismernek fel. Ilyen szekvenciák például az általunk is alkalmazott, a 4.4. ábrán látható EcoRI és XhoI enzimek hasítási helyei.



4.4. ábra. Az *EcoRI* és *XhoI* restriktációs endonukleáz hasítási sémája

Ezek a hasítási helyek a pGEX-6P-1 vektorban megtalálhatók, a fehérje génjében viszont nem szerepelnek, ezért annak végére a PCR során kellett beépíteni őket előzetesen, a primerek segítségével. A restriktációs endonukleázokat a hasítási reakció után magas hőmérsékleten (80°C-on) inaktiváltuk.

4.3.3. Ligálás

A hasítás során keletkezett ragadós végekkel rendelkező fragmensek összekapcsolása ligáz enzim segítségével történik. Annak érdekében, hogy a megfelelő végek tapadjanak össze, a vektort és a cél-DNS molekulát megfelelő arányban kell összekeverni. Ehhez meg kell határozni a ligálni kívánt DNS szakaszt és a vektort tartalmazó oldatok koncentrációit, amit spektrofotométerrel végeztünk. Ezt követően a következő képlettel számoltuk ki a ligálási elegy megfelelő összetételét:

$$\text{inwert molekulatömege (ng)} = 6 \cdot \frac{\text{inwert hossza (bp)}}{\text{vektor hossza (bp)}} \cdot \text{vektor molekulatömege (ng)}$$

A képletben *bp* a bázispárok számára utal. A ligálási reakció sikerének akkor a legnagyobb a valószínűsége, ha a plazmid:inwert anyagmennyiségének aránya 1:6. További feltétel, hogy 20 µl ligálási elegyben ne legyen több 20 ng vektornál.

4.3.4. Transzformálás

A transzformálás során a cél-DNS-t tartalmazó vektort bejuttatjuk a baktériumsejtbe, majd táptalajon szaporítva sokszorosítjuk a kívánt DNS-t előállító sejteket. A baktériumokat előzőleg CaCl_2 -dal kezelve, majd hősokk hatására a sejtfal a cirkuláris DNS számára könnyen átjárhatóvá válik. A transzformált baktériumok antibiotikumot tartalmazó táptalajra kikenve szaporíthatók. Az antibiotikum rezisztenciáért felelős gént a vektor tartalmazza, így az antibiotikum hatására a vektort nem tartalmazó sejtek elpusztulnak. Egy éjszakán át 37°C -on inkubálva a táptalajon baktériumtelepek nőnek.

A ligálás sikerességét pl. úgynevezett kolónia PCR-rel ellenőrizhetjük. Ennek során kismennyiségű baktériumsejtet juttatunk a PCR elegybe valamely telepről templát gyanánt. Amikor a PCR során az oldatot első alkalommal 98°C -ra melegítjük, bekövetkezik a sejtek lízise, felszabadul a DNS, mely a folyamat további részében templátként szolgál és róla a primerek által határolt szakasz sokszorozódik. Ha gélelektroforézissel megvizsgálva a PCR termék a megfelelő méretű DNS, akkor a ligálás feltehetőleg sikeres volt. Erről egyértelműen a minták szekvenálásával győződhetünk meg, melynek eredményeképp a teljes bázisszekvenciát megkapjuk.

4.4. UV-VIS spektrofotometria

Az UV-látható spektroszkópia a DNS vagy RNS molekulát tartalmazó oldat pontos koncentrációjának meghatározására alkalmas módszer. A nukleotidokban lévő nitrogéntartalmú bázisoknak 260 nm-nél van az elnyelési maximuma. A következő képlet alapján az ismert adatok behelyettesítésével meghatározható a DNS koncentráció.

$$c_{\text{DNS}}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{hígítási faktor} \times \frac{A_{260} \times \text{hígítási faktor} \times 50 \mu\text{g DNS/ml}}{1 A_{260} \text{ egység}}$$

A 280 nm-nél mért abszorbancia alapján meghatározható a DNS-t tartalmazó oldat tisztasága, ugyanis a triptofánnak, amit a legtöbb fehérje tartalmaz, 280 nm-nél van az elnyelési maximuma. Ha a 260 nm és a 280 nm-nél mért abszorbancia értékeknek a hányadosa 1,65 és 1,85 között van, akkor megfelelő tisztaságú a DNS oldatunk.

4.5. A sejtekkel történő fehérjetermelés

A BL21 baktériumsejtek nagymennyiségű fehérjetermelésre specializáltak. Ezekben a sejtekben a fehérjetermelés gátolt, így a sejtek gyorsabban szaporodnak, mindaddig, amíg IPTG-t (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) nem adunk a tápoldatba. E vegyület hatására megindul a transzformálással bejuttatott plazmidról – mely tartalmazza a vizsgálni kívánt fehérjénk génjét is – a fehérjekifejezés a sejtben. A plazmidot tartalmazó sejteket 5ml-es ampicilin tartalmú LB tápoldatban felszaporítjuk. Ha nagyobb mennyiségű fehérjét szeretnénk kifejezni, akkor ezt az 5 ml oldatot a 50 ml ampicilintartalmú oldatba öntjük. Az OD₆₀₀ (600 nm-en mért optikai sűrűség) ~ 0,5-0,6 körüli értéknél IPTG-vel indukáljuk a fehérjetermelést. 50 ml tápoldathoz 50 μ l IPTG-t adunk (a végkoncentráció ~ 0,4 mM). A fehérjetermelés indukálását követően 2-3 órán keresztül rázatva inkubáljuk 37 °C-on.

A centrifugálást követően leöntjük a felülúszót és a sejteket -80°C-on tároljuk további feldolgozásig. A fehérjéhez a sejtek roncsolásával jutunk. Ennek során PBS puffert (attól függően, hogy mennyi LB tápoldatban szaporítottuk a sejteket 300 μ l-1 ml-ig) adunk a sejtekhez, majd ezeket jégen tartva ultrahangos szonikátorral ~ 60 Hz-en roncsoljuk 3-szor 15 másodpercen keresztül. Vigyázni kell arra, hogy közben a fehérjék ne csapódjanak ki (felmelegedés, felhabzás elkerülése). A szonikálást követően a teljes fehérje frakciót kapjuk, amely tartalmazza az oldható és az oldhatatlan fehérjéket is. Ezt követően 4°C-on történő centrifugálással elválasztjuk az oldhatatlan frakciót. A felülúszót félretesszük, ez tartalmazza az oldható fehérjéket. Az oldhatatlan frakciót PBS-ben újraszuszpendáljuk, 15 másodperces szonikálással. A fehérjéket SDS-PAGE kísérletben mutatjuk ki.

4.6. GST (Glutathione Sepharose 4B) gyantán történő fehérje tisztítása

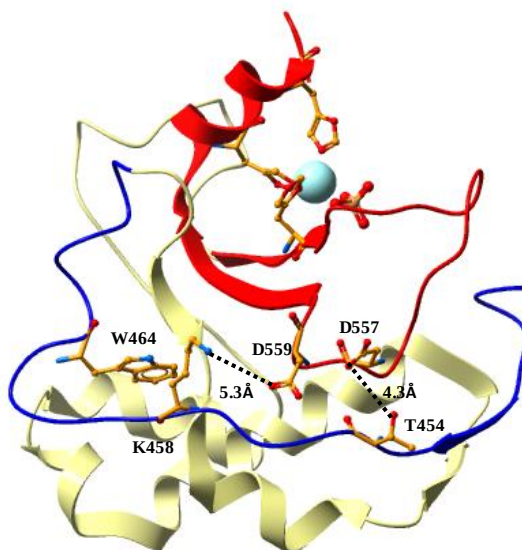
A fehérje előállítása során kapott oldatok tartalmazzák a sejt saját fehérjeit is. Annak érdekében, hogy kinyerjük a célfehérjét GST gyantán történő tisztítást alkalmaztunk. A pGEX-6P-1 plazmid tartalmazza a GST nevű fehérje génjét is. Ez a szekvencia közvetlenül az általunk rekombináns DNS technológiával a plazmidba épített szakasz előtt helyezkedik el. Így a fehérjekifejezés során a GST-t hozzákapcsolódik a célfehérjéhez.

GST tisztítás során elsőként a gyanta előkészítése történik. A gyanta 75%-os etanolos szuszpenzióban található. Mivel az etanol gátolja a további lépéseket ezért fontos az eltávolítása. Centrifugálást követően eltávolítjuk a felülúszót, majd hideg PBS oldattal többször mossuk, majd 50% (v/v) gyantatartalmú szuszpenziót készítünk PBS oldat segítségével. Az így előkészített 20 μ l gyantát az oldható fehérjefrakcióhoz adjuk. A mutánsokhoz kapcsolt GST specifikusan megkötődik a gyantán. PBS pufferrel többszöri mosással eltávolítjuk a GST-hez nem kapcsolódó fehérjéket, majd redukált glutation oldat segítségével eluáljuk a tisztított fehérjét a gyantáról. A redukált glutationtól dialízis során szabadulunk meg.

5. Eredmények

5.1. A mutációk helyeinek megtervezése

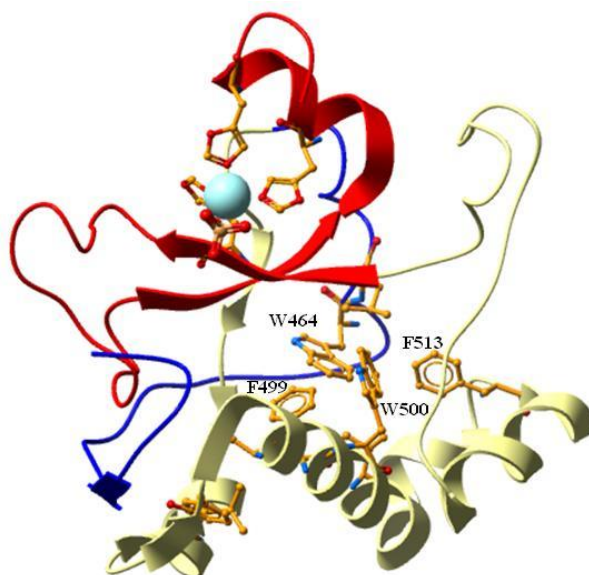
Munkánk során olyan mutációkat terveztünk az N-ColE7 N-terminális hurok részében, melyeken keresztül vizsgálható a C- és N-terminális részek kölcsönhatása. A korábbi kvantumkémiai számítások (alanin-scan, 3.9. ábra) alapján várhatóan a 464-es triptofán, a 459-es prolin, a 458-as lizin és a 454-es treonin oldalláncai játszanak fontos szerepet az enzim aktivitásához szükséges N-terminális lánc elhelyezkedésében. Kristályszerkezeti képek alapján következtetni lehet arra, hogy ezek az oldalláncok, melyik aminosavakkal alakíthatnak ki kölcsönhatásokat, amelyeknek hiányában a fehérje elveszítheti aktivitását. A kristályszerkezetben nem szerepelnek a hidrogén atomok, így a hidrogénkötések sem látszanak, azonban ezek elhelyezkedése feltételezhető a kötéstávolságok és kötésszögek alapján. Az alanin-scan során kiválasztott aminosavakat részletesen megvizsgáltam irodalmi kristályszerkezeti adatok alapján, melyek felbontása 2-4 Å között változik (5.1. ábra).



5.1. ábra Választott mutációk (W464A, K458A és T454A) helye és az eredeti aminosavak lehetséges kölcsönhatásai az N-ColE7-ben (PDB-kód: 1M08).

A 459-es prolin alanin-mutáns (P459A) lecsökkent entalpiakülönbség értéke az alanin scan számításokban feltehetőleg a peptidkötés gerincében okozott feszültség hatása, ugyanis ezen oldallánc gyűrűs szerkezete kb. -75° -ra rögzíti a diéderes szöget.

A 464-es triptofán alanin-mutáns (W464A) kis entalpiakülönbsége abból származhat, hogy a fehérje belsejében az 500-as triptofánnal (W500) és az 513-as fenilalaninnal (F513) egy hidrofób zsebben helyezkedik el, többek között ún. *stacking* kölcsönhatásokat alakíthatnak ki egymással (5.2. ábra).



5.2. ábra W464 elhelyezkedése az N-CoIE7 belsejében lévő aromás és apoláris oldalláncú aminosavak által kialakított hidrofób zsebben (PDB-kód: 1M08).

Az ilyen hidrofób kölcsönhatások a vizes közegben nagy szerepet játszanak a fehérje szerkezetének összetartásában annak ellenére, hogy gyenge kölcsönhatások, erősségük 2-4 kJ/mol körül van.

A 458-as lizin (K458) egyrészt pozitív töltésével elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthat ki a C-terminális részen elhelyezkedő negatív töltésű 559-es aszparaginsavval, másrészt hidrogénkötésben is részt vehet (5.1. ábra). Az ionos kötés erőssége akár tízszerese lehet a hidrogénkötésnek, értéke átlagosan 42 kJ/mol, míg a hidrogénkötés 4-30 kJ/mol között változik és szintén fontos szerepet játszik a fehérjék szerkezetének stabilizálásában. Emiatt fontosnak tartottam ennek az aminosav oldalláncnak a további vizsgálatát is.

Az 5.1. ábrán jól látszik, hogy a 454-es treonin (T454) hidrogénkötést alakíthat ki a tőle 4,3 Å távolságra levő 557-es aszparaginsavval (D557). A D557 is a HNH motívumban, a

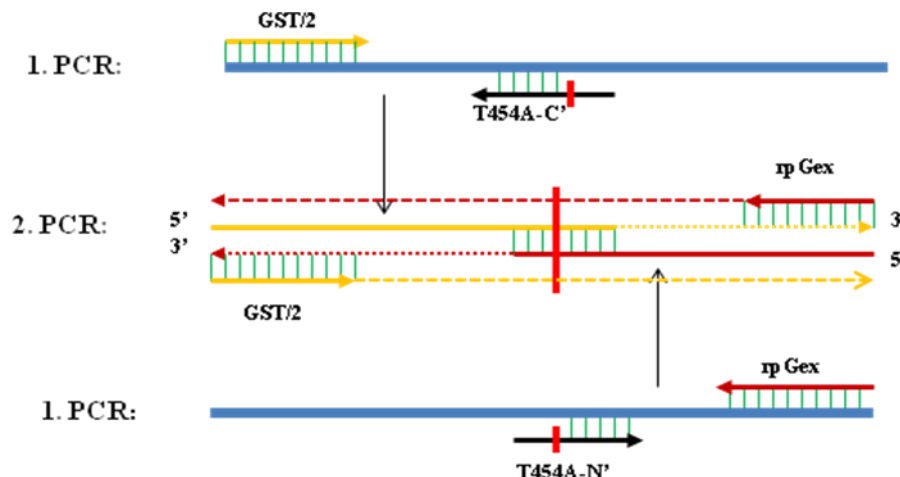
két β -lemezt összekötő hurokban található, így ez a kölcsönhatás feltehetőleg elősegíti az N-terminális szerkezet nélküli lánc kötődését a C-terminális végen található aktív központhoz. A T454 további vizsgálata információt nyújthat arról is, hogy egy, a C- és N-terminális részt összekötő hidrogénkötés megszűnése elegendő-e ahhoz, hogy az N-terminális lánc annyira elmozduljon, hogy inaktívvá váljon a nukleáz.

A három utóbbi oldallánc (W464, K458, T454) további vizsgálatára pontmutációs kísérleteket terveztünk. A kérdéses aminosav nem hagyható ki a szekvenciából, mert akkor a szekvencia rövidülne és a fehérje szerkezete teljesen megváltozna. Glicinnel helyettesíteni sem jó, mert az túl nagy flexibilitása révén megváltoztatja a fehérje adott részének dinamikáját. Az egyes aminosavak szerepe ezért úgy tanulmányozható legegyszerűbben, hogy azokat alaninra cseréljük, és vizsgáljuk, hogyan változik a fehérje viselkedése a mutáció hatására. Ez az irodalomban elfogadott módszer, kísérleti úton [17] és számítógépes modellezéssel [18] egyaránt vizsgálnak alanin mutánsokat a választott oldallánc szerepének tanulmányozására. Kísérleteinkben tehát első lépésben a három egyszeres alanin mutáns előállítását tűztük ki célul: W464A, K458A, T454A, majd a lehetséges kétszeres mutációkat, illetve a háromszoros mutánst hoztuk létre.

5.2. Pontmutánsok előállítása

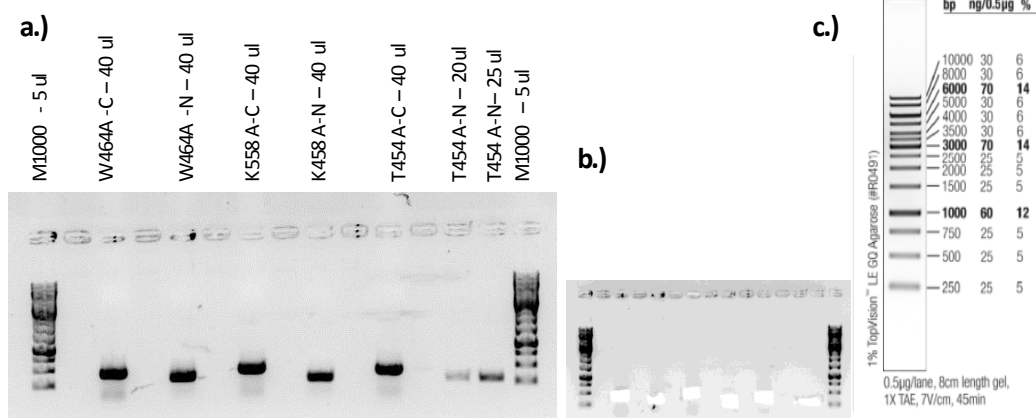
Elsőként a mutáns fehérjéket kódoló gént kellett előállítani, amelyhez az eredeti nukleáz domén templátként, azaz mintaként szolgálhat. A DNS templátot PCR segítségével lehet sokszorozni, a mutációk pedig a DNS másolását indító primerek segítségével alakíthatók ki.

Minden aminosav cseréhez négy primerre volt szükségünk. A primerek mindig a sokszorosított DNS-szakasz végeit határolják, a mutáció azonban ebben az esetben a szekvencia középső részére esik, és nem a végére. Ezért egy lépésben nem tudtuk előállítani a mutáns fehérje génjét. Előállítható viszont két olyan DNS-szakasz, melyek a mutáció helyének környezetében átfednek: az egyik szakasz az egyik, a másik a másik végen tartalmazza a mutációt. A két génrészlet egy újabb PCR segítségével “összetapasztható”, és a teljes hosszúságú DNS-szakasz sokszorosítható.



5.3. ábra A mutáns fehérje génjének előállítása két egymás utáni PCR-ben

A tervezett primerek pontos adatai megtalálhatóak a függelék 8.2.1. pontjában. A mutáns fehérjét kódoló teljes DNS szakaszt az 5.3. ábra sémája alapján két egymás utáni PCR segítségével állítottuk elő, a függelék 8.2.2.-8.2.4. fejezeteiben leírtak szerint. Elvileg a két reakció egy PCR-elegyben is elvégezhető, ha PCR során az oldat mind a négy primert tartalmazza, de ebben az esetben az eredeti templát is sokszorozódna, ami csökkentené az előállítás hatékonyságát. Annak érdekében, hogy a második PCR, melynek templátja az 1. PCR-ből származik, ne tartalmazzon egy molekulát sem az eredeti templátból, a két PCR között gél-extrakcióval tisztítottuk a mintát (5.4. ábra, a részletes leírás a függelék 5.2.3. pontjában megtalálható).

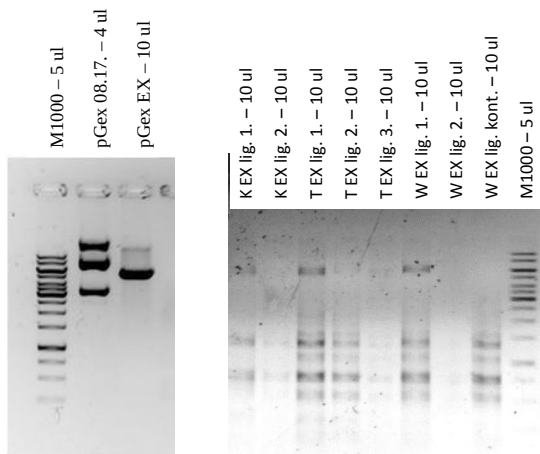


5.4. ábra Első PCR termék ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel és tisztítása gélből . **a)** első PCR termékekről készült gélkép **b)** a megfelelő hosszúságú DNS-t tartalmazó gélrészlet kivágása után készült kép **c)** marker jelentése

A gélekpről (5.4.a. ábra) marker segítségével megállapítható, hogy az első PCR során képződött termékek a vártnak megfelelő hosszúságúak.

A második PCR során a templátot az első PCR-ben előállított és gélből tisztított szakaszok szolgálták. A reakció során a két szélső, a GST/2 és a rpGEX 3' primert alkalmaztuk. A primerek olvadáspontja 60 °C, az összetapadó részeké a gén közepén viszont csak 50 °C. Ezért célszerű volt olyan PCR-programot használni, amelyben először néhány ciklusban 50°C, majd a többiben 60°C tapadási hőmérsékletet állítottunk be. A második PCR eredményét is agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, melyből jól látszott, hogy megfelelő hosszúságú és tisztaságú termék képződött. Ezt követően fenol-kloroform eleggyel történő extrakció során eltávolítottuk az enzimet a reakcióelegyből, majd propán-2-ollal kicsaptuk a DNS-t, megszabadulva a maradék vízdoldható szennyeződésektől (pl. maradék dNTP-k) is. TE-ben (tris-EDTA oldatban) történő feloldás után meghatároztuk a DNS-minta koncentrációját. A kétszeres mutánsok, illetve a háromszoros mutáns génjeit a fentiekkel analóg módon állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy templátként az egyszeres, illetve az utolsó lépésben a kétszeres mutánsok egyikét használtuk fel.

Az így előállított DNS fragmenseket melyek a W464A és/vagy T454A és/vagy K458A mutációkat tartalmazták és a pGEX-6P-1 plazmidot az EcoRI (E) és XhoI (X) enzimekkel hasítottuk. Ezen enzimek ún. ragadós végeket hoznak létre (rendre G|AATTC és C|TCGAG).



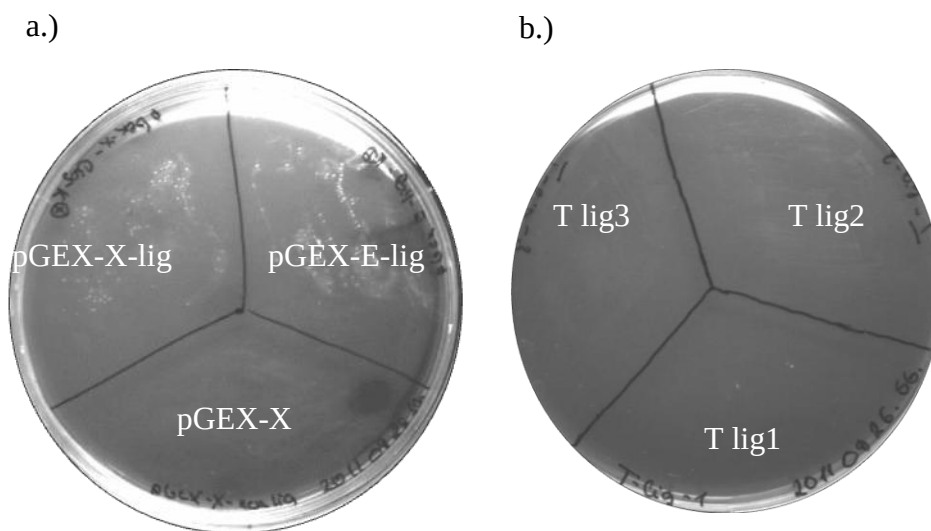
5.5. ábra. Hasítás és ligálás ellenőrzése: az EX az EcoRI és XhoI enzimekkel történő hasítást jelzi. A ligált fragmensek esetén a pGEX-6P-1 plazmid méretének tartományában megjelenő sávok jelzik a ligálás sikerességét.

A fragmensek esetén EcoRI hasít az N-terminális, XhoI a C-terminális véget kódoló részen. A ragadós véggel rendelkező DNS fragmenseket ligálással építettük be a pGEX-6P-1 plazmidba. A hasítási és ligálási reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (5.5. ábra).

Az így kapott cirkuláris szerkezetű plazmidok tartalmazzák az új fehérjék génjét, és a megfelelően előkészített, kompetens sejtek (*E. coli* DH10B) képesek felvenni őket az ún. transzformálás során. A táptalaj, amelyen a sejteket növesztettük, ampicillint tartalmazott. A pGEX-6P-1 plazmidban van ampicillin antibiotikum rezisztencia gén, ezért ezen a táptalajon csak azok a sejtek életképesek, melyekbe a transzformálás során bejutott a DNS.

Előzetes kísérleteink során azonban az így létrejött telepekből izolált plazmidokban véletlenszerű mutációk, illetve bázishiányok jelentkeztek. Az, hogy a lemezen nőtt baktériumtelepek száma rendszeresen nagyon kicsi volt a transzformálás kis hatékonyságára utalt. A transzformálás ellenőrzése érdekében négy összehasonlító kísérletet végeztünk: az első a pGEX-6P-1 plazmid, a másik három pGEX-6P-1 plazmidot egy enzimmel (EcoRI-el vagy XhoI-el) és mindkét enzimmel hasítottuk majd ligáltuk (5.6. ábra).

	telepek száma
Lot.	
W lig1	2
W lig2	6
W lig3	7
T lig1	2
T lig2	0
T lig3	0
K lig1	2
K lig2	3
K lig3	2
W (K-)L	0
pGEX-EX (K)L	12
pGEX-X (K+)L	30
pGEX-E (K+)L	25
pGEX	60
sejt	0



5.6. ábra: Összehasonlító reakciók a transzformálás hatékonyságának ellenőrzésére

A legtöbb telep (60) a pGEX-6P-1 transzformálása során nőtt, ennek a fele volt az egy enzimmel (pGEX-E-lig és pGEX-X-lig) és az ötöde a két enzimmel hasított és ligált plazmidoknál keletkező telepszám. Amennyiben inzertet adtunk a ligálási elegybe, az minden esetben csökkentette a telepszámot.

Miután kísérleteinket egy másik laboratóriumban megismételve ugyanilyen eredményeket kaptunk, gyanúnk arra terelődött, hogy az előállított génekről egy minimális fehérjekifejeződés történik, és a mérgező fehérjék elpusztítják a transzformált sejteket. Így csak azon sejtek képesek telepeket formálni, melyekben a véletlen hibák inaktív fehérjét eredményeztek. Annak érdekében, hogy megállapíthassuk, hogy az polimeráz enzim működése során keletkeznek-e a hibák, témavezetőm Gyurcsik Béla megismételte a plazmidok előállítását Japánban, egy olyan enzim segítségével, amely rendelkezik javítómechanizmussal. Az általa elvégzett kísérletek során bázishibák csak a primerek tapadási helyén alakultak ki, ami arra utalt, hogy a primerek között is vannak hibásak, és csak az ilyen primer segítségével képződő hibás gének eredményeztek életképes baktériumokat. A fentiek alapján mindenképpen megállapíthatjuk, hogy az alanin-mutáns fehérjék nem veszítették el az aktivitásukat, arra nézve viszont nem tudunk semmit sem mondani, hogy okoztak-e, illetve milyen mértékű aktivitás-változást a mutációk.

Ezen probléma kiküszöbölésére több megoldás is kínálkozik:

- Biztonságosan szabályozott plazmid alkalmazása.
- Cinkion-mentes közegben történő munka (kompetens sejtek).
- Immunitásfehérjével történő fehérjekifejezés.

Vannak olyan plazmidok, amelyeknél egyáltalán nem történik nemkívánt fehérjekifejezés annak indukálása előtt, azonban mi nem rendelkezünk ilyennel.

Mivel az NColE7 cinkion nélkül inaktív, ez lehetővé tenné nagyobb mennyiségű fehérje előállítását. Cinkion-mentes kompetens sejtek előkészítése olyan tápoldatban történik, amely nem tartalmaz cinkiont. Ezen kompetens sejtek transzformálása azonban kis hatékonyságú, így nem sikerült a mutált gének plazmidjait tartalmazó sejtek kialakítása. Egy éjszakai inkubálás során a lemezekken nem nőtt telep egyik esetben sem.

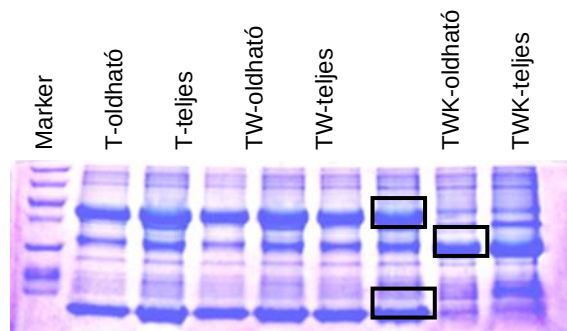
Így a fenti nemkívánt folyamat megelőzésére a továbbiakban a mutáns fehérjénk génjeit átültettük egy olyan plazmidba, mely a ColE7 fehérje antagonistájának, az ún. Im7 immunitásfehérjének a génjét is tartalmazza, és így a célfehérje az Im7 fehérjével együtt

fejezhető ki. Ezzel a lépéssel viszont elvesztettük azt az egyszerű ellenőrzési lehetőséget, miszerint, ha egy NColE7 mutáns aktív, akkor a sejtek elpusztulnak.

Az új eljárást alkalmazva lényegesen megnőtt a transzformálás hatékonysága, azaz a transzformált baktériumok életben maradva telepeket képeztek. Azt, hogy ezek a baktériumtelepek a megfelelő plazmid DNS-t tartalmazták-e, kolónia PCR segítségével ellenőriztük. Ennek során a baktériumsejteket alkalmaztuk templátként. Az első 98°C-os lépésben ugyanis bekövetkezik a sejtek lízise és szabaddá válik a bennük lévő DNS. Amennyiben a kolónia PCR terméke az agaróz gél elektroforézis eredménye alapján megfelelő hosszúságú volt, a DNS-t tartalmazó baktériumtelepeket átoltottuk tápoldatba és felszaporítottuk a sejteket. Ezekből a sejtekből centrifugálás után a QIAGEN MINI KITTEL nyertük ki a plazmid DNS-t a 8.2.9. fejezetben leírtak alapján. Ezután PCR segítségével DNS mintát készítettünk szekvenálás céljából. A PCR-terméket kicsaptuk és tisztítottuk. UV-látható spektrométerrel meghatároztuk a DNS-oldat koncentrációját majd a mintákat szekvenáltattuk. Ennek eredményeként kimutattuk, hogy munkám során mind a hétféle mutáns gént tartalmazó plazmidot sikerült előállítani. Így a további vizsgálatainkhoz rendelkezésünkre álltak a W464A, T454A, illetve K458A egyszeres mutációkat, a W464A és T454A, a W464A és K458A, illetve a T454A és K458A kétszeres mutációkat, és a W464A, K458A és T454A háromszoros mutációt tartalmazó fehérjék génjei.

5.3. Az alaninmutánsok kifejezése az immunitásfehérjével együtt

Az Im7 és a tervezett mutációkat hordozó géneket tartalmazó plazmidokat ezek után transzformálással BL21-es sejtekbe jutattuk. A telepekről baktériumokat juttattunk 5ml LB tápoldatot és 5 µl ampicillint tartalmazó tápoldatokba. Ezeket 37° C-on rázatás közben inkubáltuk amíg az OD₆₀₀ el nem érte a ~ 0,6-os értéket, majd indukáltuk a célfehérjék termelését 5µl IPTG hozzáadásával. További 3 órán át inkubáltuk rázatás közben, majd a sejteket lecentrifugáltuk. A felulúszó eltávolítása után szonikálással rocsoltuk a sejteket 300-300 µl PBS pufferben. A teljes fehérje frakcióból mintát vettünk, majd újabb centrifugálással elválasztottuk egymástól az oldható és oldhatatlan fehérjefrakciókat. Kísérletünk eredményét SDS-PAGE eljárással ellenőriztük (5.7. ábra).



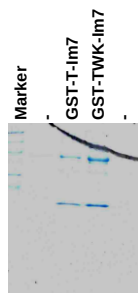
5.7. ábra SDS-PAGE gélkép. A legfelső bekeretezett sáv az NColE7 alaninmutáns, a középső a GST míg a legalsó az Im7 fehérjéhez rendelhető. A marker fehérjekeverék sávjaihoz rendelhető molekulatömegek fentről lefelé haladva rendre: 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 és 14,4 kDa.

A marker fehérjék sávjaival valamint a csak pGEX-6P-1 plazmidot (összehasonlító kísérlet) tartalmazó baktériumokban kifejezett fehérjékkel összehasonlítva jól látható az 5.7.ábrán, hogy a mutáns fehérjét sikeresen kifejeztük. A gélképen a legalsó inenzív sáv mutatja, hogy az összehasonlító kísérlet kivételével az immunitásfehérje is jelen van a sejtekben. Az is megfigyelhető, hogy a célfehérjék többsége az oldható frakcióba került, ami biztató a további tisztítási folyamatok szempontjából. Az N-terminális részen található GST fúzió lehetővé teszi, hogy első lépésben a GST-affinitás eljárást alkalmazzuk. Felmerül a kérdés, hogy vajon az Im7 fehérje is a glutation-szefaróz gyantán marad-e a célfehérjéhez kötötten. Annak érdekében ugyanis, hogy a további kísérleteinkben nukleáz aktivitást mutathassunk ki, el kell választani a mutáns fehérjeinket az immunitásfehérjétől.

5.3.1. A mutánsok tisztítása GST-affinitás eljárással

Következő lépésként a glutation-szefaróz gyantán először a fentiekben előállított fehérjék közül az egyszeres mutációt tartalmazó T és a hármas mutációt tartalmazó TWK jelzésű fehérjéket tisztítottuk. Azt reméltük, hogy a tisztítás során a fizikai vagy kémiai hatások következtében az immunitásfehérje egy része a mosás során távozik és így legalább részben szabad mutáns fehérjékhez juthatunk. A tisztítás hatékonyságát és a fenti feltételezést SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. A gélképről megállapíthattuk (5.8. ábra), hogy a célfehérjét sikerült tisztítani, azonban az eluátumban és a gyantán is a mutáns

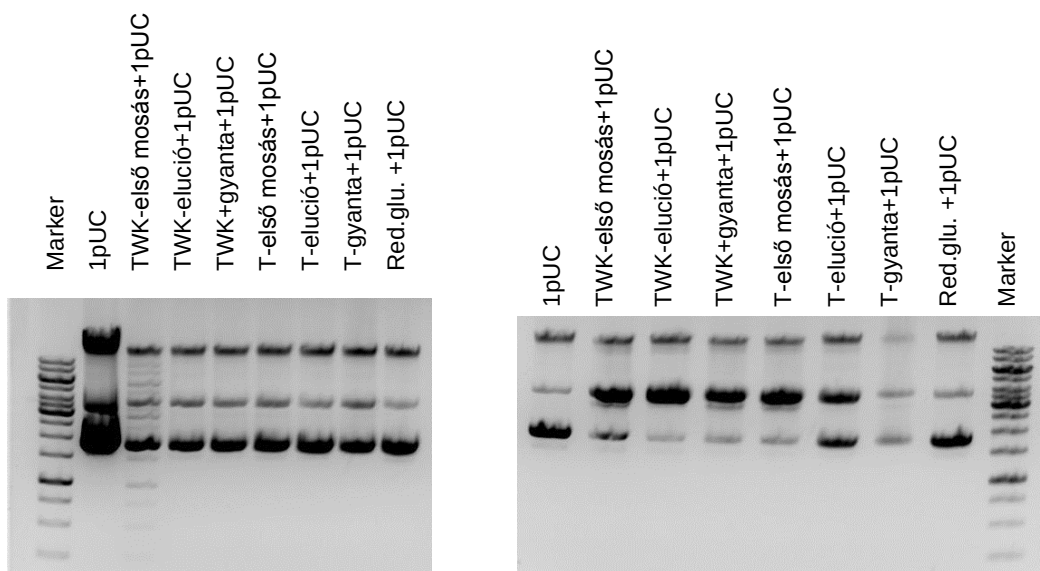
fehérje mellett megjelent az Im7 fehérje sávja. Az irodalmi adatok alapján ez várható is volt, hiszen az Im7 fehérje és az NColE7 között kialakuló kölcsönhatás igen erős.



5.8. ábra A GST-affinitás eljárás eluátumainak SDS-PAGE képe.

5.3.2. A tisztított fehérjék DNS hasításának vizsgálata

Mivel a továbbiakban egy enzimatikus folyamatot szerettünk követni, ezért nem szükséges nagy mennyiségű fehérjét alkalmaznunk kísérleteinkben. A GST kötő gyantán tisztított fehérjék 10µl-es oldatához 2µl 1pUC plazmidot adtam.



5.9. ábra A DNS hasítási kísérletek agaróz gélelektroforézis képei. A bal oldali kép a DNS hozzáadását követően 1 órával készült. A jobb oldali gélkép a 3 nappal későbbi állapotot mutatja.

Egy összehasonlító kísérletben 10 μ l redukált glutationt tartalmazó elúciós oldathoz adtam ugyanennyi DNS-t. Az oldatokat szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltam. Ezután két részre osztottam mindegyik oldatot és az egyik részletet agaróz gélelektroforézisnek vettem alá. Ezen kísérlet eredményeként nem tapasztaltam eltérést az összehasonlító kísérlet eredményéhez képest, azaz nem történt DNS hasadás (5.9. ábra). Ezért a maradék oldatokat további 3 napon át inkubáltam 4°C-on. Ebben az esetben jól látható, hogy az oldatok nagy részében csökkent a plazmid DNS szuperhelikális formához rendelhető alsó sáv intenzitása, nőtt a relaxált cirkuláris forma mennyisége, és esetenként megjelent a kettő között látható lineáris forma jele is. Nem játszódtak le hasonló folyamatok a csak redukált glutationt tartalmazó PBS oldat hatására. Ezek alapján feltételezhető, hogy a mutációkat tartalmazó plazmidok egy nagyon kis hányada megszabadult az Im7 fehérjétől a tisztítási folyamat során, és kismértékű katalitikus aktivitást mutat. Azonban további szisztematikus vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az egyes mutációk milyen mértékben befolyásolták az aktivitást az Im7 fehérjétől elválasztott fehérjékkel. A tisztítási eljárás optimalizálása HPLC segítségével folyamatban van.

6. Összefoglalás

Kutatócsoportunk távlati célja a DNS molekulához specifikusan kötő pozitív allosztérikus szabályozási mechanizmussal rendelkező mesterséges cinkujj nukleáz előállítása. A Colicin E7 nukleáz doménje alkalmas lehet egy ilyen enzim kialakítására. Úgy gondoljuk, hogy az NColE7 N- és C-terminális szakaszai közé beépített cinkujjakkal specifikussá és szabályozottá tehető az új nukleáz. Az aktivitáshoz szükséges, hogy az N- és C-terminális részek egymáshoz közel helyezkedjenek el. Emiatt fontos, hogy pontosan ismerjük az NColE7 N- és C-terminális részein lévő egyes aminosavak szerepét az aktivitásban és a fehérje szerkezetének kialakításában. Munkám során azt vizsgáltam, hogy az N-terminális részen elhelyezkedő 25 aminosav közül, melyik oldallánca alakít ki jelentős kölcsönhatást a molekula többi részével.

Első lépésben korábbi kvantumkémiiai számítások alapján kiválasztottam a fontosabbnak tűnő aminosavakat. A nukleáz publikált kristályszerkezete alapján megvizsgáltam, hogy ezek oldalláncai a fehérje melyik részével alakíthatnak ki kölcsönhatást. Kísérleteimhez a következő aminosavakat választottuk: K458, W464 és T454. Ezen aminosavak helyére alanint építettünk be, és így vizsgáltuk hiányuk hatását a fehérje aktivitására. A mutációt tartalmazó plazmidok előállítása során azonban véletlenszerű génhibák is képződtek. Megállapítottuk, hogy a hibák oka az, hogy a fehérjék génjeiről a fehérjetermelés indukálása nélkül is minimális kifejeződés történik, és a képződő fehérjék toxikus hatást fejtenek ki a baktériumsejtekre. Több megoldás közül az Im7 immunitásfehérje jelenlétében történő fehérjekifejezés bizonyult a leghatékonyabbnak. Ennek hátránya azonban az, hogy az immunitásfehérjétől nem egyszerű megszabadulni, jelenlétében pedig nem tanulmányozható a nukleáz aktivitás. Az irodalmi adatok alapján a pH csökkentése az Im7 disszociációját idézi elő, azonban savas közegben a fémion is eltávozik az aktív központból.

További céljaink között szerepel ezért az előállított fehérjék további tisztítása során megszabadulni az immunitásfehérjétől, és a tiszta fehérjék fémion, illetve DNS-kötő sajátságainak, valamint hidrolitikus aktivitásuk tanulmányozása.

7. Hivatkozások

- [1] N. C. Mishra, "Nucleases-molecular biology and applications," *John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey*, 2002.
- [2] M.-J. Sui et al., "Metal ions and phosphate binding in the H-N-H motif: crystal structures of the nuclease domain of ColE7/Im7 in complex with a phosphate ion and different divalent metal ions.," *Protein Science*, vol. 11, no. 12, pp. 2947-57, 2002.
- [3] B. Gyurcsik; A. Czene, "Towards artificial metallonucleases for gene therapy: recent advances and new perspectives," *Future Med. Chem.* vol 3., No 15, pp. 1935-1966, 2011.
- [4] E.M. Händel, T. Cathomen, "Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity". *Curr. Gene Ther.* vol 11., pp. 28-37, 2011.
- [5] R. James, C. Kleanthous, and G. R. Moore, "The biology of E colicins: paradigms and paradoxes," *Microbiology*, no. 1, 1996, pp. 1569-1580, 1996.
- [6] C. Kleanthous and D. Walker, "Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, no. 10, pp. 624-631, 2001.
- [7] K.-C. Hsia, K.-F. Chak, P.-H. Liang, Y.-S. Cheng, W.-Y. Ku, and H. S. Yuan, "DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7.," *Structure (1993)*, vol. 12, no. 2, pp. 205-14, 2004.
- [8] Y.-sheng Cheng, K.-chiang Hsia, L. G. Doudeva, K.-fu Chak, and H. S. Yuan, "The Crystal Structure of the Nuclease Domain of Colicin E7 Suggests a Mechanism for Binding to Double-stranded DNA by the H – N – H Endonucleases," *Journal of Molecular Biology*, vol. 2836, no. 2, pp. 227-236, 2002.
- [9] T.-P. Ko, C.-C. Liao, W.-Y. Ku, K.-F. Chak, and H. S. Yuan, "The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein," *Structure*, vol. 7, no. 1, pp. 91-102, 1999.
- [10] H. Huang and H. S. Yuan, "The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, no. 3, pp. 812-21, 2007.
- [11] K.-C. Hsia, C.-L. Li, and H. S. Yuan, "Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense," *Current Opinion in Structural Biology*, pp. 126-134, 2005.

- [12] Y.-T. Wang, W.-J. Yang, C.-L. Li, L. G. Doudeva, and H. S. Yuan, "Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases.," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 2, pp. 584-94, 2007.
- [13] A. J. Pommer et al., "Homing in on the Role of Transition Metals in the HNH Motif of Colicin Endonucleases," *Biochemistry*, vol. 274, no. 38, pp. 27153-27160, 1999.
- [14] W. Ku et al., "The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 7, pp. 1670-1678, 2002.
- [15] R. A. Laskowski, F. Gerick, and J. M. Thornton, "The structural basis of allosteric regulation in proteins," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 11, pp. 1692-1698, 2009.
- [16] Németh E., "Allosztérikus szabályozás a colicin E7 fehérje nukleáz doménjében," *SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék*, Diplomamunka, 2011.
- [17] K. L. Morrison and G. A. Weiss, "Combinatorial alanine-scanning," *Current Opinion in Chemical Biology*, pp. 302-307, 2001.
- [18] A. M. El-assaad, C. A. Kieslich, R. D. Gorham, and D. Morikis, "Electrostatic exploration of the C3d – FH4 interaction using a computational alanine scan," *Molecular Immunology*, vol. 48, no. 15-16, pp. 1844-1850, 2011.
- [19] H. Huang and H. S. Yuan, "The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, no. 3, pp. 812-821, 2007.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén dolgozzak.

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Dr. Gyurcsik Béla egyetemi adjunktusnak és Németh Eszter Ph.D. hallgatónak, akik sokat segítettek a kísérleti munkában és az eredmények kiértékelésében.

9. Függelék

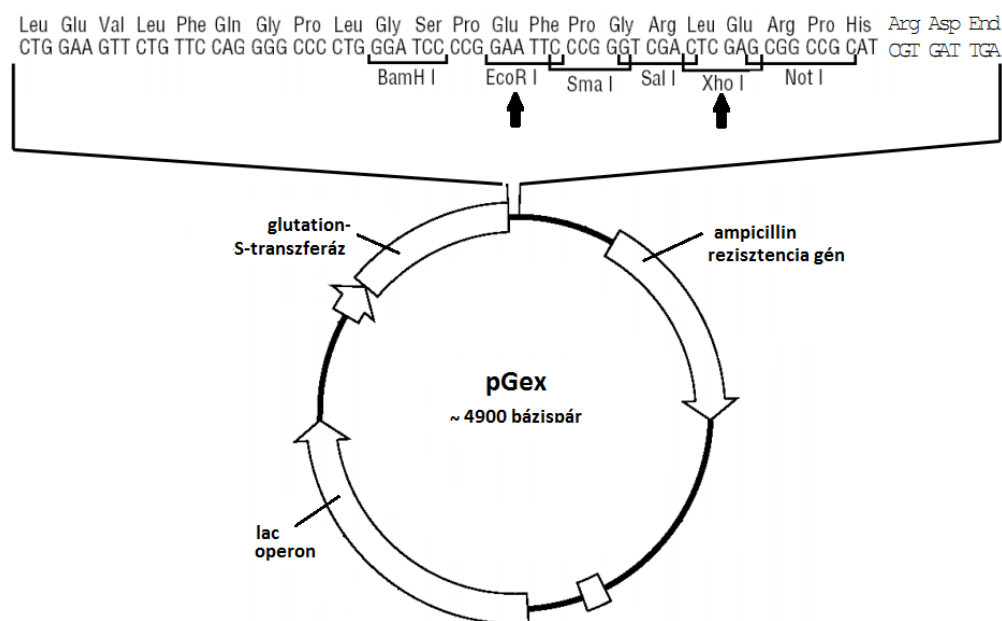
9.1. A véletlen hibákat is tartalmazó előállított plazmidok

8.1.táblázat. Tervezett és véletlen mutációk az előállított plazmidokban. A hiányzó bázist tartalmazó minták esetén a fehérje szekvenciáját a hiányt pótolva fordítottuk.

Tervezett mutációk	Hibák száma a bázisszekvenciában	Bázis hiány	Előállított plazmidban lévő mutációk	Fehérje kifejezés
T454A	3	0	T454A, N560D, R568G	*
	2	1	T454A, N517S, R538G	
	3	0	T454A, F489L, S535P	*
W464A	1	1	W464A, F449S	
	0	1	W464A	
K458A	0	1	K458A	
	0	1	K458A	

9.1.1. A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája

A mutáns fehérjék génjét a pGEX-6P-1 vektorba építettük be. Ez a vektor a fehérje kifejezés során hozzáfűzi a GST (glutathion-S-transzferáz) fehérjét a nukleázhoz, ami a további tisztítás céljából fontos.



9.1.ábra. A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája, a kinagyított rész a klónozó régió

9.1.2. *N-ColE7 szekvenciája*

A templátként használt pGEX-N-ColE7 bázisszekvenciája az EcoRI és XhoI hasítási hely között a következő:

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTAAAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTTGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

Ebből a génből az alábbi szekvenciájú fehérje fejezhető ki:

EFKRNKPGKATGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKRTSFELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP** LE

9.1.3. *Az általunk előállított mutáns plazmidok bázis- és aminosav szekvenciája a hasítási helyek közötti részben*

T454A / N560D / R568G

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAGCTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTAAAAAGTTTC
GATGATTTTCGCAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATCACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

EFKRNKPGKAAGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKRTSFELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DISVVTPKCHIDIHRGK**STOP** LE

T454A / F489L / S535P

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAGCTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGCTTAAAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATCGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAGCGCCGCATCGTACTGACTGACGATCTGCCTC
GCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATCCAGCCTTCCCGGA

KRNKPGKAAGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEIKSFDDFRKKF
WEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVIGKRTSFELHHEKPISQNG
GVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LERPHRD**STOP**L TICLARFGDDGENL**STOP**

T454A / N517S / R538G - hiányos

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGAAGGCAGCTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTAAAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
CTAAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGGCAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

A hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKAAGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNSNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKGTSELFHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKR NKPGRQLVKENLSIISG**STOP**

W464A / F449S - hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACTGTCAATAATAAG**GC**TTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAAT**C**CTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

a hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKATGKGKPVNNK**A**LNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
SWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKRTSELFHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LE

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKEPLSIISG**STOP**

K468A – hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGA**GC**CCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

Az aminosavszekvencia jó lenne, ha nem hiányozna az adenin:

KR NKPGKATGKG**A**PVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKKF
WEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKRTSELFHHEKPISQNG
GVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LE

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKEPLSIISG**STOP**

W464A- hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACTGTCAATAATAAGGCCTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCA**C**CATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAG**CTCGAG**

A hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKATGKGKPVNNKALNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVGKAPKTRTQDVSGKRTSELFHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKENLSIIRP**STOP**

9.2. Kísérleti módszerek

9.2.1. PCR-hez használt primerek

9.1.táblázat. Primerek szekvenciája, tapadási tulajdonságai. A primer oldatok koncentrációja 10 nmol/mol

		teljes primer			tapadó rész		átfedő rész	
	szekvencia	gc%	T _m (°C)	bp	T _m (°C)	bp	T _m (°C)	bp
GST/2	GGTGATCATGTAACCCA TCCTGACTTCATG	46	62	30	62	30	-	-
rövid pGEX 3'	CCGGGAGCTGCATGTGT CAGAGG	65	62	23	62	23	-	-
rövid pGEX 5'	GGGCTGGCAAGCCACGT TTGGTG	65	62	23	65	23	-	-
W/A-C'	GCATTATTAAAGGCTT ATTATTGACAGGTTTC CTTTACCTGTGC	36	65	47	59	33	26	52
W/A-N'	GTCAATAATAAGGCTT AAATAATGCAGGTAAAG ACTTAGGTTCCTCG	37	66	49	60	34	26	52
K/A-C'	TGACAGGAGCTCCTTTA CCTGTGCTTCCTGGC	60	70	35	61	25	18	50
K/A-N'	GTAAGGAAGCCTGTC AATAATAAGTGGTTAAA TAATGCAGGTAA	37	65	46	59	35	18	50
T/A-C'	CTTTACCAGCTGCTTCC CTGGCTTATTCCGTTTG	51	67	35	59	25	18	50
T/A-N'	GGAAGGCAAGTGGTAA AGGAAAACCTGTCAATA ATAAGTGGTTAAA	39	66	46	59	35	18	50

9.2.2. 1. PCR: az átfedő szakaszok előállítás

9.2.táblázat. PCR keverék összetétele

	Lot.	MM (ul)	W/N (ul)	W/C (ul)	T/N (ul)	W/C (ul)	K/N (ul)	K/C (ul)
st. H ₂ O		207	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5
Dream puffer (MgCl ₂ +)	00068548	30	5	5	5	5	5	5
dNTP mix 2 mM	00078240	30	5	5	5	5	5	5
templát: 50x pGEX-Col		6	1	1	1	1	1	1
Dream Taq polimeráz	00069583	3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Térfogat		276	46	46	46	46	46	46
GST/2 primer			2		2		2	
rövid pGEX 3' primer				2		2		2
W/A-C' primer			2					
W/A-N' primer				2				
T/A-C' primer					2			
T/A-N' primer						2		
K/A-C' primer							2	
K/A-N' primer								2
Teljes térfogat		184	50	50	50	50	50	50

9.3.táblázat. PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	63 °C	1 min
Step 4.	72 °C	1 min
Step 5.	Cycle 30 Times To 2	
Step 6.	72 °C	4 min
Step 7.	10 °C	0 sec
Step 8.	End	

A „step 3” hőmérsékletét ebben a programban a különböző mutánsok előállításakor 63-68 °C között változtattuk a PCR optimalizálása céljából.

9.2.3. Gél-extrakció:

A gél-extrakciót a Toyobo cég MagExtractor (Lot. 93160G1, Code NPK-601) kittel végeztük (állvány: Toyobo Lot. 94030, Code MGS-101).

A mintákat nagysebességű gélen futtattuk 1%-os agaróz gélben (120 µl agaróz 2,4 ml TAE, 120 µl EtBr, 120 ml deszt. víz). A gélből UV-fény alatt kivágtuk a megfelelő méretű DNS sávját. A Mag Extractor kit előírásai alapján a megfelelő oldattal melegén kioldottuk a DNS-t a gélből. Ezután mágnes szuszpenziót adtunk a mintához, amely megkötötte a DNS-t, így egy mágneses állványban szeparálni lehetett az a szennyeződések tartalmazó oldattól. Végül TE-oldattal eluáltuk a DNS-t a mágnesről.

9.2.4. 2. PCR: részek összetapasztása

9.4.táblázat. PCR keverék összetétele az átfedő részek összetapasztásához

	Lot.	MM (ul)	T 1 (ul)	T2 (ul)	K1 (ul)	K2 (ul)	W1 (ul)	W2 (ul)
st. H ₂ O		201	33,5	33,5	33,5	33,5	33,5	33,5
Dream puffer (MgCl ₂ incl.)	00068548	30	5	5	5	5	5	5
dNTP mix 2 mM	00078240	30	5	5	5	5	5	5
GST/2 primer		12	2	2	2	2	2	2
rövid pGEX 3' primer		12	2	2	2	2	2	2
Dream Taq polimeráz		3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Térfogat		288	48	48	48	48	48	48
T/N templát			1	1				
T/C templát			1	1				
K/N templát					1	1		
K/C templát					1	1		
W/N templát							1	1
W/C templát							1	1
Teljes térfogat		300	50	50	50	50	50	50

A mesterkeveréket vékonyfalú PCR-csőben állítjuk össze. Az enzim hozzáadása előtt vortexeljük és röviden centrifugáljuk az asztali centrifugában.

9.5.táblázat. PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	55 °C	1 min
Step 4.	72 °C	1 min
Step 5.	Cycle 5 Times To 2	
Step 6.	98 °C	20 sec
Step 7.	65 °C	1 min
Step 8.	72 °C	1 min
Step 9.	Cycle 25 Times To 2	
Step 10.	72 °C	4 min
Step 11.	10 °C	0 sec
Step 12.	End	

9.2.5. A DNS kinyerése a reakcióelegyből

A fenol-kloroform eleggyel történő extrakció során az 50 µl-es elegyekhez 50 µl fenol-kloroformot adtunk, a mintát vortexeltük, majd 5 percig, 13500 rpm fordulatszámmal szobahőmérsékleten centrifugáltuk, és a felső fázisokat gyűjtöttük. Ezután etanollal végeztünk kicsapást: a vizes fázishoz 5 µl NaOAc-ot, majd 2,5-szeres mennyiségű (125 µl) hideg absz. etanolt adtunk. Alapos vortexelés után 20 percig -80°C-ra helyeztük a mintákat, majd 15 percig 13500 rpm fordulatszámmal 4 °C-on centrifugáltuk. A folyadék óvatos eltávolítása után 200 µl hideg, 70%-os etanolt adtunk a szilárd anyaghoz és rövid vortexelés után ismét centrifugáltuk 5 percig, 13500 rpm fordulatszámmal, 4 °C-on. A folyadék eltávolítása után zárt steril fülkében szárítottuk 20 percig a mintát és 30 µl TE-ben feloldottuk 4 °C-on.

9.2.6. Hasítás *EcoRI* és *XhoI* enzimekkel

A PCR-rel előállított fragmenseket és a pGEX-6P-1 plazmidot (162 ng/ul) hasítottuk az *EcoRI* és *XhoI* (Fermentas, 10 u/ul) enzimekkel. A mintákat 80 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Ezután 20 percig 80 °C-on inkubáltuk, hogy az enzimeket hővel inaktiváljuk.

9.6.táblázat. A hasítási elegy összetétele. A táblázatban E az *EcoRI* enzimmal, X az *XhoI* enzimmal, EX a mindkét enzimmal hasított mintát jelenti.

	DNS (ul)	<i>EcoRI</i> (ul)	<i>XhoI</i> (ul)	2xTango puffer (ul)	Steril H ₂ O(ul)	V (ul)
Lot.		66604	55884	73295		
K EX	8	1	1	5	10	25
W EX	8	1	1	5	10	25
T EX	8	1	1	5	10	25
pGEX E	1	1	-	5	18	25
pGex X	1	-	1	5	18	25
pGex EX	1	1	1	5	17	50

9.2.7. Ligálás:

A ragadós véggel rendelkező fragmenst ligálással (T4 ligáz, 1 Weiss u /ul, ~200 coh. end lig. u/ul) építettük be a pGEX- P-1 plazmidba. A plazmid mennyisége 20 µl-es ligálási elegyben ~20 µl vektor volt, az inzert:vektor molarány 6:1 és ettől kissé eltérő érték volt. A megfelelő arányt spektrofotométerrel mért koncentrációk alapján számítottuk. A ligálási elegyeket 4 °C-on inkubáltuk, majd DH10B sejtekbe transzformáltuk.

9.7.táblázat. Ligálási elegy összetétele

	W-EX (ul)	T-EX (ul)	K-EX (ul)	pGEX- EX (ul)	pGEX- X (ul)	pGEX- E (ul)	Puffer (ul)	T4 ligáz (ul)	St H ₂ O (ul)	V (ul)
W EX lig1	5			3.5			2	1	8.5	20
T EX lig1		5		3.5			2	1	8.5	20
K EX lig1			5	3.5			2	1	8.5	20
W EX lig2	5			1			2	1	11.5	20
T EX lig2		5		1			2	1	11.5	20
K EX lig2			5	1			2	1	11.5	20
T EX lig3		3		3			2	1	9.5	20
W EX (K-)	5						2	1	12	20
pGEX-EX (K)				3.5			2	1	13.5	20
pGEX-X (K+)					3.5		2	1	13.5	20
pGEX-E (K+)						3.5	2	1	13.5	20

9.2.8. Transzformálás:

A plazmid DNS-t, amely tartalmazza a mutáns fehérje génjét, az ún. transzformálás során juttattuk be az *E.coli* DH10B típusú, előzőleg CaCl₂-os kezelés révén kompetenssé tett sejtekbe. A30 µl jégen tárolt DH10B kompetens sejthez (-80 °C-on tárolva) 2 µl ligátumot adtunk. Ezután 0 °C (5 perc) – 42 °C (2 perc) - 0 °C (5 perc) hősokkot alkalmaztunk: a hidegen tartott sejtek hirtelen meleg környezetbe kerülve kitágítják pórusaikat, felveszik a DNS-t és hirtelen lehűtve bezárulnak a pórusaik. Az egyes mintákból 20 µl-t (1/3 lemez) vagy 30 µl-t (1/2 lemez) kikentünk ampicillines LB-táptalajra. A lemezeket “fejjel lefelé” elhelyezve 38 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

LB-táptoldat: 5g tripton, 2,5 g élesztő kivonat, 5g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, 500 ml deszt.víz (pH=7,0), sterilizés

LB-táptalaj 4-5 lemezhez (Amp+): 100 ml LB-táptoldat, 1,5 g agar-agar, sterilizés 100 µl ampicillin (sterilizés után kell belerakni, amikor 50 °C-os az oldat)

9.2.9. Kolónia PCR

9.8.táblázat. Kolónia PCR keverék összetétele

	Lot.	10xMM (ul)
st. H ₂ O		355
Dream puffer (MgCl ₂ incl.)	68548	50
dNTP mix 2 mM	78240	50
rövid pGEX 5' primer		20
rövid pGEX 3' primer		20
Dream Taq polimeráz	92065	5
Térfogat		500

9.9.táblázat. Kolónia PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	63 °C	30 sec
Step 4.	72 °C	1 min 20 sec
Step 5.	Cycle 30 Times To 2	
Step 6.	72 °C	4 min
Step 7.	10 °C	0 sec
Step 8.	End	

9.2.10. Plazmidtisztítás

Reggelre az előző nap beoltott 5 ml-es kultúrák zavarosak, ezeket Eppendorf csövekbe töltöttük és 13500 rpm fordulatszámmal 2 percig centrifugáltuk.

A fölülúszó leöntése után a sejtekből a QIAGEN Mini Kittel nyertük ki a DNS-t, majd a mintát 50 µl TE-oldatban oldottuk fel 4 °C-on.

9.2.11. PCR a plazmidokról szekvenáláshoz

A tisztított plazmidok szekvenálása nem mindig volt sikeres, ezért PCR-t készítünk róla a kolónia PCR-hez hasonló módon, de baktériumtelep helyett a plazmid templátból 1 µl-t adunk az elegyhez, amit fenol-kloroformos extrakció és etanolos kicsapást követően szekvenáltatunk.

9.2.12. DNS-minták koncentrációjának meghatározása

A DNS-minták koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg víz háttérrel, 260 nm-en. Meghatároztuk az $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ arányt is a tisztaság vizsgálata érdekében, ami megfelelő tisztaságú minta esetén 1,8 és 2,0 között van. A háttérrel korrigált 260 nm-es értékből kiszámítottuk a koncentrációt: $c(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{hígítás} * A_{260,\text{kor}}/0,02$

9.2.13. SDS-PAGE

9.10.táblázat. SDS gél összetétele

	desztillált víz	A-oldat	B-oldat	C-oldat
Alsó gél (12,5%)	5 ml	6,25 ml	3,75 ml	-
Felső gél	5,4 ml	2 ml	-	2,5 ml

Iniáljuk a polimerizációt a gél oldatában:

- alsó gél: hozzáadunk 125 µl APS-t és 18,75 µl TEMED-et
- felső gél: hozzáadunk 50 µl APS-t és 7,5 µl TEMED-et

Az oldatok:

- A-oldat: 29 w/v% akrilamid, 1 w/v% *N,N'*-metilén-biszakrilamidB-oldat (500 ml, pH=8,8): 90,75 g Trizma bázis, 2 g SDS, 12 ml HCl
- C-oldat (500 ml, pH=6,8): 30,3 g Trizma bázis, 2 g SDS, 20 ml HCl
- APS (ammónium-perszulfát): -20°C-on tároljuk
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametilén-diamin): 4°C-on tároljuk sötét üvegben
- 1 l elektroforézis puffer oldatot készítünk a 10x-es pufferből (10×SDS PAGE puffer: 30.2 g Trizma bázis, 144 g glicin, 10 g SDS / 1000 ml)

Mintaelőkészítés: 5 ml-es kultúra

- 1) Eppendorf csőben 1,5 ml-t centrifugálunk az egyes mintákból az asztali centrifugán 13500 rpm fordulatszámmal, 1-2 percig.
- 2) A sejteket alapos vortexeléssel felfuszpendáljuk 300 µl jéghideg 1xPBS-oldatban. (10× PBS: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7.3). Mindent mindig jégen tartunk.
- 3) Lízis: 3x15 s-ig szonikáljuk jégen a mintákat és 9 µl-t félreteszünk SDS-PAGE-re (teljes fehérje frakció). Amplitudó: 60%
- 4) Centrifugálással (10 min, 13500 rpm, 4 °C) eltávolítjuk az oldhatatlan anyagot. A fölülúszót új Eppendorfba pipettázzuk, 9 µl-t félreteszünk SDS-PAGE-re (oldható frakció).
- 5) Az oldhatatlan anyagot újra felfuszpendáljuk 200 µl 1xPBS-ben. 1x15 s szonikálással diszpergáljuk az anyagot. 9 µl-t félreteszünk SDS-PAGE-re (oldhatatlan frakció).

Ezután mindhárom frakciót SDS-gélen futtatjuk. A 9 µl-es mintához 3 µl merkaptotanol tartalmú festéket adunk és az így összekészített mintát 3 percig 100°C-on tartjuk és felvisszük a géltre. 30-60 mA-t használva futtatjuk a mintát. A gél előhívása előtt desztillált vízzel 3-4-szer lemossuk, majd annyi festékkoldatot öntünk rá, hogy ellepje. Lassú mozgatással szobahőmérsékleten tartjuk 1 óráig, vagy egy éjszakán át, amíg sötétkéék nem lesz. Végül ismét vízzel lemossuk a gél.

9.2.14. OD₆₀₀ mérés

BL21-es sejtekbe transzformáltuk a fragmenseket és egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően 5ml ampicillines tápoldatba áttöltöttük a kiválasztott telepeket és újabb egy éjszakán át inkubátorban hagytuk felszaporodni a sejteket. Másnap a kultúrából 1 ml-t új, 5 ml ampicillines tápoldatba öntöttünk. 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk és 30 percnként megmértük az oldat optikai sűrűségét DEN-1B McFarland Densitometer-rel. Ez a műszer mcF-ben adja meg az értéket, 3 mcF körülbelül 0,6 OD₆₀₀-nak felel meg. 0,4 és 0,6-os OD₆₀₀ között IPTG-t adtuk hozzá, ezzel indukálva a fehérjetermelést.

9.2.15. Agaróz gélelektroforézis

A kísérletek során minden lépés után agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük a mintákat. A gélelektroforézis során az elkészített gél elhelyezzük a futtatókádban, melyben annyi TAE pufferoldat található, amennyi ellepi a gél. A gélben a gélöntés során kialakított mélyedésekbe ún. zsebekbe juttatjuk pipetta segítségével a DNS-t tartalmazó oldatunkat. A DNS felvitele során glicerint is adunk hozzá annak érdekében, hogy a DNS a zsebben maradjon az elektroforézis kezdetéig. Ha követni akarjuk az elektroforézis előrehaladását, akkor festéket kell adagolnunk a DNS molekulákhoz. Erre alkalmas például a brómfenolkék és a xilén-cianol. Miután elhelyeztük a DNS-t tartalmazó oldatokat a zsebekben feszültséget kapcsolunk a készülékre, aminek hatására a DNS molekulák elmozdulnak a pozitív pólus felé. A vándorlás sebessége a DNS töltésétől, alakjától és méretététől, az elektromos térerőtől és a gél koncentrációjától függ.

