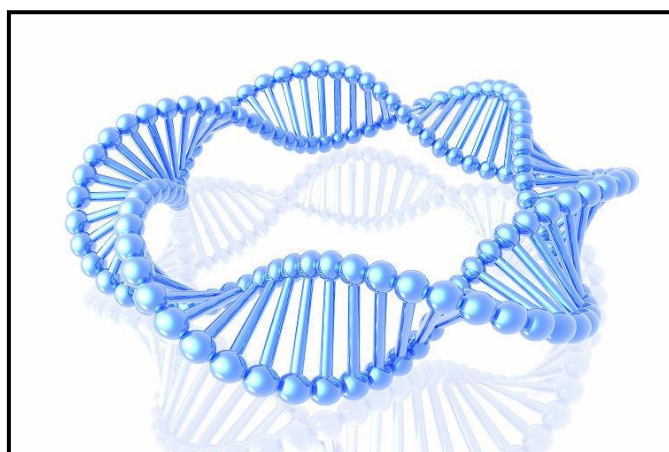

Biotin auxotróf *Aspergillus nidulans* törzsek létrehozása double-joint PCR segítségével



Témavezetők:

Dr. Fekete Erzsébet

egyetemi docens

Ág Norbert

PhD hallgató

Készítette:

Fekete-Szücs Enikő

I. éves Biomérnök MSc-s hallgató

Fekete Judit

II. éves Biomérnök MSc-s hallgató

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Célkitűzés.....	3
3.	Elméleti bevezető	4
3.1.	A double-joint PCR elméleti alapjai ¹	4
3.2.	Létrehozni kívánt mutánsok	8
3.3.	Agaróz gélelektroforézis ²	10
4.	Elvégzett kísérletek	12
4.1.	Double-joint PCR technika alkalmazása	12
4.1.1	Előkészületek	12
4.1.2.	Első körös PCR reakció.....	13
4.1.3.	PCR termék tisztítása	16
4.1.4.	Második körös PCR reakció.....	18
4.1.5.	Harmadik körös PCR reakció.....	20
4.2	<i>Aspergillus nidulans</i> transzformációs protokollja ⁴	21
4.2.1	Előkészületek	21
4.2.2	Protoplasztálás menete	25
4.2.3	Transzformálás menete	26
4.3	Növekedési teszt	27
5.	Összegzés	31
6.	Köszönetnyilvánítás	32
7.	Irodalomjegyzék.....	33

1. Bevezetés

Minden élőlény esetében elmondható, hogy az evolúció során kialakult és rögzített sejtbiológiai funkciók valamilyen módon elősegítik az adott funkcióval rendelkező faj túlélését, szaporodását, azaz adaptív előnyt biztosítanak az élőlény számára. Az eukarióták mozaikos génszerkezete, illetve magának a splicingnak a mechanizmusa alapvetően pazarlónak tűnik, hiszen rengeteg energia fordítódik olyan elemek szintézisére, melyek nem kódolnak funkciókat, illetve melyek előbb- utóbb kivágódnak vagy lebontásra kerülnek. Mint ahogy az kiderült ezeknek az elemeknek, az intronoknak jóval nagyobb jelentőségük van, mint azt első ránézésre gondolnánk. Az intronok megjelenése lehetővé tette, hogy egyazon génről több géntermék is keletkezzen, mégpedig az exonok kombinatorikus összeszerelődése révén. Ebből következik, hogy minél több intron szakítja meg az exonok láncolatát, annál több géntermék szintetizálódására van lehetőség. Ezt az eukariótáknál megfigyelt jelenséget nevezzük alternatív splicingnak. Az intronok más fontos szerepét is sikerült kimutatni a közelmúltban. Mobilis genetikai elemként ezek az intronok képesek akár a saját, akár más élőlény genomjába inzertálódni. A beékelődés eredményeképpen létrejöhetnek úgynevezett „intron az intronban” struktúrák, melyek twintron néven kerültek a tudományos köztudatba. Az „stwintron” hipotézis szerint a pre-messenger RNS érett mRNS-é válásához egy olyan mechanizmus szükséges, mely megköveteli először az úgynevezett belső intron kivágódását, mely elengedhetetlen feltétele a külső intron kivágódásának. A folyamat tanulmányozásakor fény derülhet az intronok autokatalitikus, önszabályzó szerepére a splicing folyamata során.

2. Célkitűzés

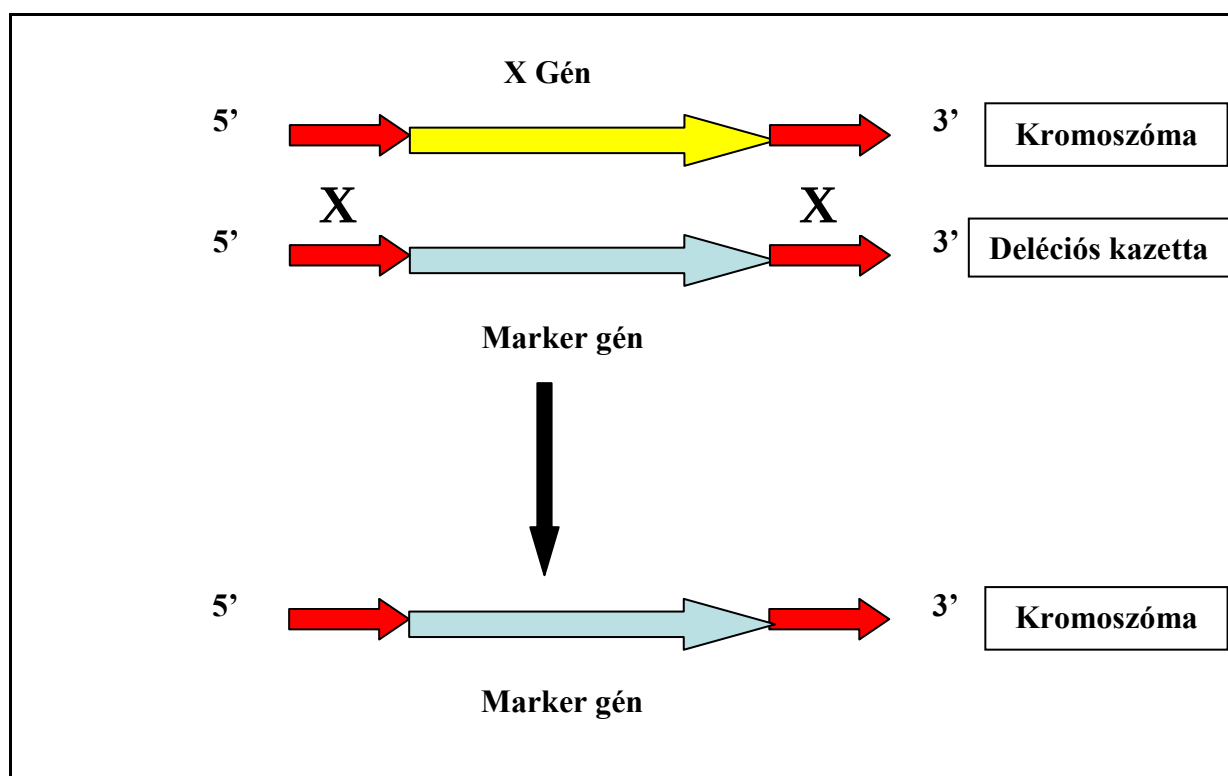
Munkacsoportunk hosszú távú terve a „stwintron” splicing mechanizmusának vizsgálata a belső intron funkcionális elemeinek (donor, lariat, akceptor) irányított mutagenezise révén. A vizsgálatokat *Aspergillus nidulans* gombában kívánjuk kivitelezni. Elsőként az AN6644 génről (mely „stwintron” tartalmaz) történő transzkripciót és az intronok kivágódási mechanizmusát szeretnénk tanulmányozni. A vizsgálatokhoz először technikai hiánymutánsokat kell létrehoznunk, melyek később az „stwintron” szekvenciában pontmutációkat tartalmazó mutánsok létrehozásához szükségesek. A dolgozat az említett hiánymutánsok létrehozásának lépéseit, módszereit és gyakorlati megvalósítását taglalja.

3. Elméleti bevezető

3.1. A double-joint PCR elméleti alapjai¹

A double-joint PCR egy elterjedt, PCR alapú, molekuláris biológiai módszer, mely alkalmas arra, hogy fonalas gomba genomokban számunkra releváns géneket manipuláljunk. A módszer alkalmazásával, olyan deléciós konstrukció létrehozására van lehetőség, mely utána irányított módon integrálódik a fonalas gomba genomjának a deléciós kazetta által meghatározott helyére. Ezen technika nagyszerűsége abban rejlik, hogy a homológ rekombináció természetes folyamatát kihasználva úgy tudjuk kiűzni a kiszemelt gént, hogy egy általunk meghatározott, akár szelekciós markerként alkalmazott gént is be tudunk vinni a helyére.

Végső cél:



1. ábra: Irányított integráció

Az **1. ábra** azt a folyamatot szeretné demonstrálni, mely során, a kromoszómán és a deléciós kazettában egyaránt megtalálható, azonos szekvenciájú 3'-flanking és 5'-flanking szakaszok között homológ rekombináció zajlik le. Ily módon, az ábrán X jelzéssel ellátott tetszőleges gén kiütődik és helyére beépül a választott marker gén.

A deléciós kazetta konstruálásának lépései:

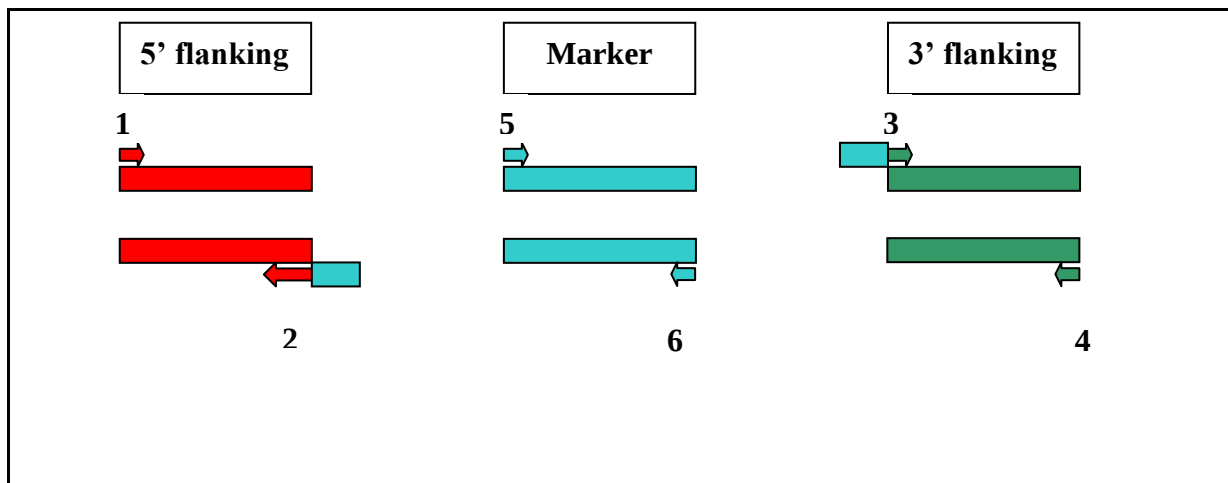
Amennyiben azonosítottuk a deletálni kívánt gént és meghatároztuk az adott gén helyére integrálni kívánt szelekciós markert a következő lépés a deléciós konstrukció összeszerelése.

Első körös PCR reakciók

Ennél a reakciónál történik a deléciós kazetta három részegységének az 5'-flanking régiónak, a 3'-flanking régiónak, illetve a marker régiónak a felszaporítása. Ehhez hat különböző primerre van szükség:

- 1. 5'- Forward primer**
- 2. 5'- Reverse + marker tail primer**
- 3. 3'- Forward + marker tail primer**
- 4. 3'- Reverse primer**
- 5. 5' nest primer**
- 6. 3' nest primer**

A 2-es és a 3-as primer úgynevezett kiméra primer, melyeknél a primert alkotó nukleotidok egy része a flanking régióból másik része pedig a marker génből származik. Ezek fuzionáltatásából nyerjük a PCR reakció szerves részét képező kiméra primereket



2. ábra: Első körös PCR reakció

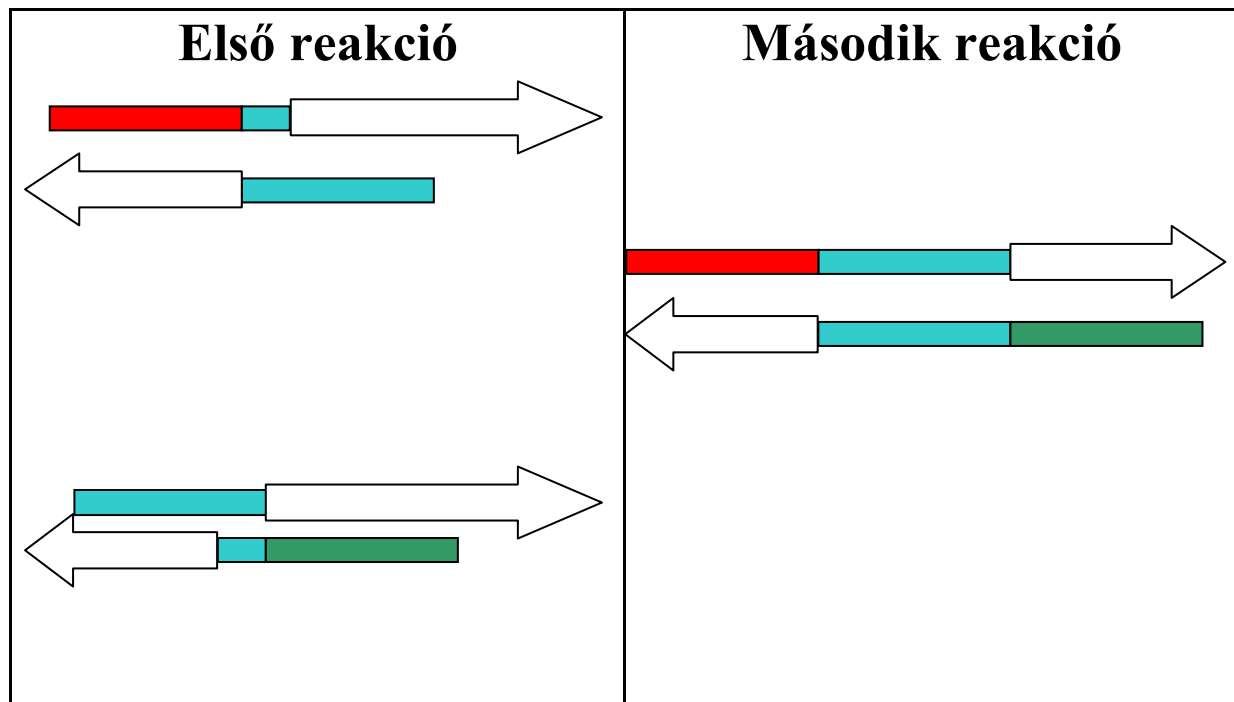
A 2. ábrán az egyes részegységek felszaporításának elvi sémája látható, melynek leglényegesebb elemei a 2-es és 3-as számmal jelölt primerek, amelyek lehetővé teszik a második körös PCR reakciók kivitelezését.

Tehát az első körös PCR reakciók során a komponenseket külön-külön PCR reakcióban felamplifikáltuk.

Második körös PCR reakciók

Az itt lezajló reakciók érdekessége, hogy a szakaszok felszaporítása primerek nélkül megy végbe, mivel a túlnyúló, átfedő kiméra régiók primerként funkcionálnak. Ekkor történik meg a három fragment fúziója.

A lentebb található 3. ábrán a második körös PCR reakciók alapvető lépéseit láthatjuk. Maga a reakció további két lépésre bontható. Az első reakció eredményeképpen két olyan összeállítás keletkezik, melyek abban a tekintetben azonosak, hogy egyaránt megtalálható bennünk a marker gén kódoló szekvenciája, viszont az egyik esetben csak a pirossal jelölt 5'-flanking régió kapcsolódik hozzá, a másik esetben pedig csak a zölddel jelölt 3' flanking régió. A második reakciónál, mint az látható a marker gén szekvenciája szolgál primerként, így a polimeráz mindkét irányban képes kiegészíteni a konstrukciót, ily módon létrehozva a három fragment fúziójával a végső terméket.



3. ábra: Második körös PCR reakció

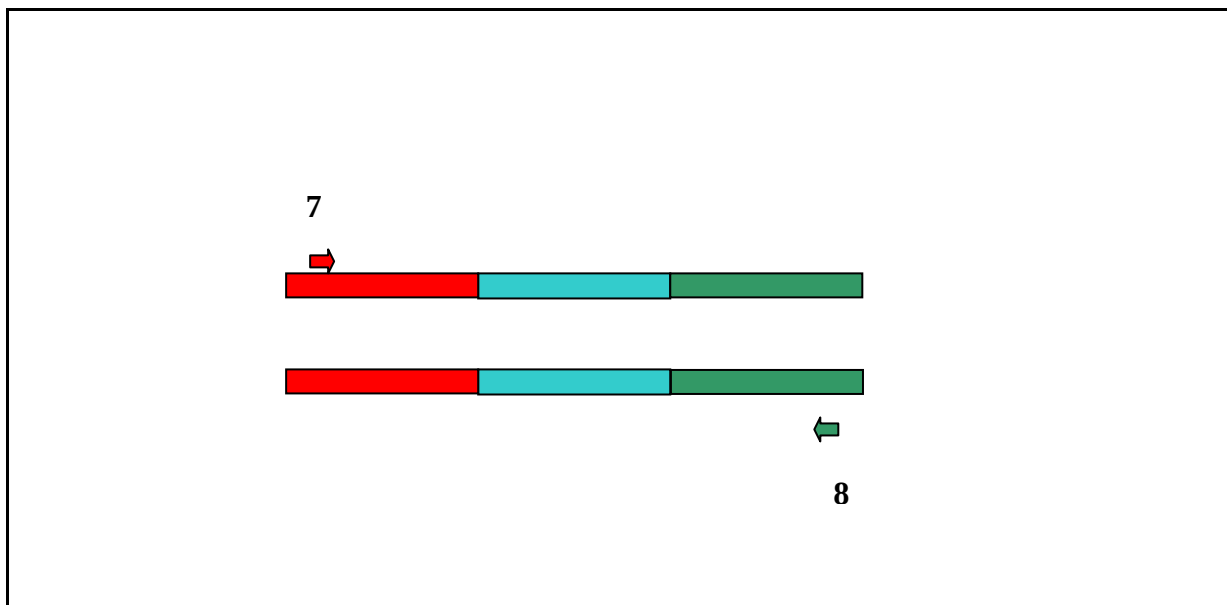
Harmadik körös PCR reakciók

Ennél a lépésnél történik a végső termék (deléciós kazetta) felszaporítása úgynevezett nested primerek segítségével. A nested primerek révén (mivel az amplifikálandó szakasznak nem pont a végén, hanem kicsit beljebb kötődnek) tulajdonképpen ragadós végek jönnek létre, mely majd megkönnyíti a fragment későbbi beépülését.

7. Forward nested primer

8. Reverse nested primer

A 4. ábrán az utolsó lépés látható, melynek során a végső terméket szaporítjuk fel.



4. ábra Harmadik körös PCR reakció

A leírt reakciók végtermékeként a létrehozni kívánt deléciós konstrukció nagy számban áll a rendelkezésünkre melyeket már különböző vektorokban ligálhatunk, illetve megfelelő körülmények között vektorok használata nélkül alkalmassá tehetők az adott szervezetbe történő transzformációhoz.

3.2. Létrehozni kívánt mutások

Az *Aspergillus nidulans* a fonalas gomba genetika és az eukarióta sejtbiológia modellszervezetének tekinthető. A modellszervezetekkel szemben támasztott főbb követelmények a következők: ne legyen patogén, ne legyen drága, könnyen beszerezhető legyen, gyorsan növekedjen, ne igényeljen speciális körülményeket, valamint mutások létrehozására alkalmazható legyen. Az *Aspergillus nidulans* azt itt felsorolt kritériumoknak maradéktalanul eleget tesz. Képes minimál táptalajon nőni, rövid életszűssel és jól elkülöníthető színes spórákkal rendelkezik. A kisméretű genom (~ 31Mb, 8 kromoszóma, 11-12 ezer gén), illetve a laboratóriumi körülmények között könnyen tanulmányozható három különböző életszűs csak még tovább növelik szerepének fontosságát a genetikai és sejtbiológiai vizsgálatok során.



5. ábra: *Aspergillus nidulans*

A dolgozatban is leírt munkafolyamat elsődleges célja két technikai hiánymutáns létrehozása A1149-es *Aspergillus nidulans* törzsből kiindulva. Ez a törzs kettős, piridoxin és uridin auxotrófiát mutat. Auxotrófiának nevezzük azt a jelenséget, amikor egy élőlény, a növekedéséhez szükséges egyik szerves vegyületet (például aminosavat, bázist, vitamint) nem tudja előállítani. Tehát jelen esetben az A1149-es törzsnek külső forrásból, például a táptalajból kell megszereznie ezeket a vegyületeket, különben nem lesz képes a növekedésre és az életben maradásra.

A célunk az, hogy kiüssük a biotin szintézis bizonyos lépéseit kódoló AN6644 gént és ráadásul a helyére beintegráljuk vagy az uridin vagy a piridoxin szintézist kódoló gént. Reményeink szerint így két különböző kettős auxotrófiával rendelkező mutánst fogunk kapni:

1. **A1149/1 bio⁻, uri⁻** → biotin, uridin kettős auxotrófia
2. **A1149/2 bio⁻, pyr⁻** → biotin, piridoxin kettős auxotrófia

Az A1149/1-es mutáns esetében azt várjuk, hogy a piridoxin, az A1149/2 esetében pedig azt, hogy az uridin épül be a biotin helyére. A számunkra megfelelő kettős auxotróf törzsek előállításának lépései, módszerei a dolgozat tovább részeiben kerülnek kifejtésre.

3.3. Agaróz gélelektroforézis²

A kísérletek során véghezvitt PCR reakciók sikerességéről, valamint a termékek megfelelő mennyiségben való jelenlétéről minden esetben agaróz gélelektroforézis segítségével bizonyosodtunk meg. Szintén ezt a módszert használtuk a megfelelő primerek kiválasztására alkalmazott gradiens PCR-t követően.

A gélelektroforézis a minta elektromosan töltött komponenseinek szétválasztására szolgáló elválasztástechnikai módszer, amely során egy síklap formájú, makropórusos gél belsejében lévő mintakomponenseket külső elektromos térerősséggel az ellentétes töltésű elektród irányába mozgatunk. Az elmozdulás sebessége az adott gél esetében a mintában lévő ionok töltésétől (Z), az elektromos térerősségtől (E) és az ún. súrlódási faktortól (f) függ.

$$v = (Z \cdot E) / f$$

Az agaróz gél pufferből és agarózból tevődik össze. Az agaróz egy tengeri vörös algából kivont poliszacharid (D-galaktóz és a 3,6 anhidro L-galaktóz lineáris polimere), mely melegítés hatására feloldódik az elektroforézis pufferben. Az így kapott oldatot megfelelő formába öntjük, mely 32-40 °C körüli hőmérsékletre hűlve megszilárdul, térhálós szerkezetet alkot oly módon, hogy a lineáris polimer szálak dupla helikális szerkezetbe rendeződnek, melyeket a jelen lévő vízmolekulák stabilizálnak, hidrogénhíd-kötésekkel. Szilárdulás után a puffertankba tesszük a gél, ezután felvisszük a mintákat az erre a célra kialakított ún. „zsebekbe”. Ezután elektromos térbe helyezzük a gél, melyben a DNS – mivel semleges pH közelében negatív töltésű – az anód (+) felé vándorol. A nagyobb méretű fragmentumok lassan, míg a rövid méretűek gyorsan haladnak a gélben így ezek vándorolnak legtávolabb a zsebeiktől. A DNS mozgási sebességét több faktor is befolyásolhatja, ezek a következők:

- *A DNS mérete és konfigurációja*
- *Az agaróz koncentrációja*
- *Elektroforézis puffer összetétele*

A kísérlet során alkalmazott vegyszerek és paraméterek:

- TRIS/Borát/EDTA puffer
- EtBr → DNS láthatóvá tétele
- Alkalmazott feszültség: 90 V

A kísérletek során 1,5%-os agaróz koncentrációjú géleket öntöttünk és használtunk, mivel a vizsgált termékek, fragmentek mérete ezt a koncentrációt indokolta.

4. Elvégzett kísérletek

4.1. Double-joint PCR technika alkalmazása

4.1.1 Előkészületek

Kísérleteink elvégzéséhez az *Aspergillus nidulans* A1149 típusú törzsből indultunk ki. Célunk, hogy vizsgáljuk a „stwintron” splicing mechanizmusát az említett gomba segítségével. Első lépésként olyan szelektáló markereket kellett találnunk, melyekre nézve a gomba auxotróf, ezért választottuk a piridoxint és az uridint. A célunk, hogy ennek a törzsnek a biotin szintéziséért felelős AN6644 génje helyére egyrészt, az *Aspergillus fumigatus*-ból származó piridoxin szintéziséért felelős *pyroA* gént, másrészt a *Trichoderma reesei* fonalas gomba uridinért felelősgénjét (*pyr4*) integráljuk. Így a double-joint PCR technika segítségével két hiánymutánst hoztunk létre.

Első lépésben az *Aspergillus fumigatus* *pyroA* és a *Trichoderma reesei* *pyr4* génjéhez, valamint az 5'- és 3'- flankingekhez primereket terveztünk. Nagyon fontos a primerek megfelelő tervezése, mivel ezek olyan mesterséges DNS szekvenciák, amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS-szakasz elejével és végével.

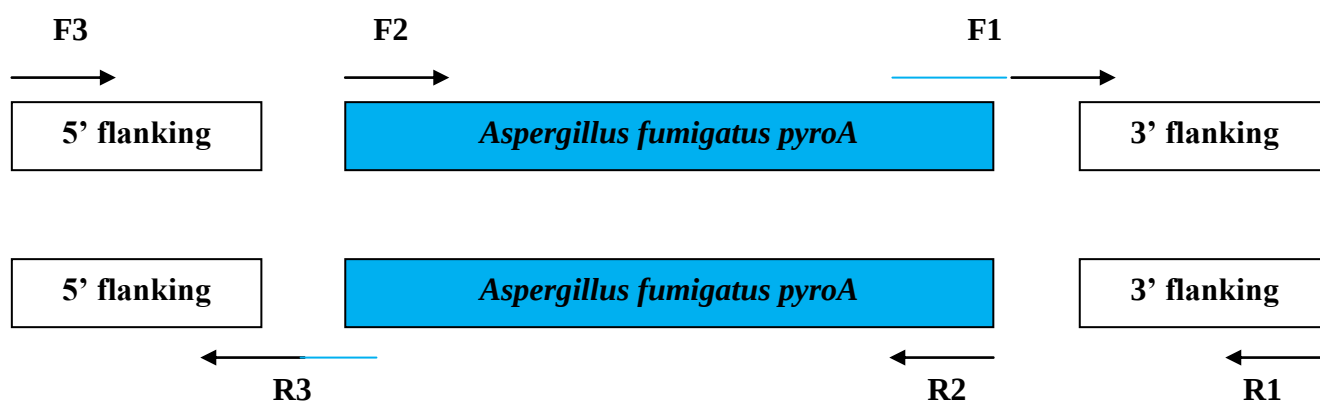
A primerek használata előtt szükséges az előkészítésük, mely a következőképpen történik:

- 11.000 x g-n centrifugáljuk 10 percig
- adjuk hozzá az előírt vízmennyiséget
- 15 percig rázassuk 50 C-on
- készítsünk tízszeres hígítást

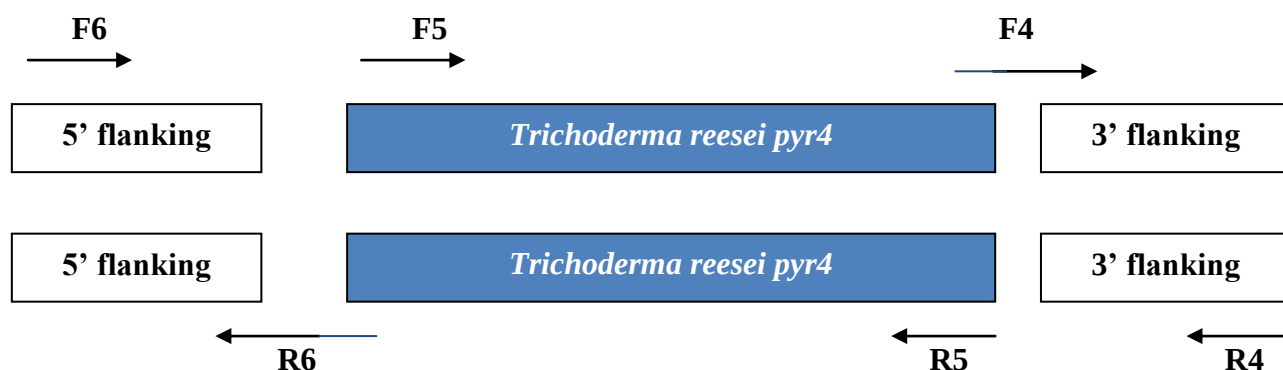
4.1.2. Első körös PCR reakció

Ennél a reakciónál történik a deléciós kazetta három részegységének: az 5'- és 3'-flanking régiók, valamint a marker régióként használt piridoxin és uridin gén felszaporítása. A **6. ábrán** látható az egyes szakaszok amplifikálásának sematikus ábrája. Az **1. táblázat** tartalmazza az ábrán található primerek rövidítésének magyarázatát, valamint az egyes génszakaszok méretét bázispárban megadva.

Aspergillus fumigatus deléciós kazetta létrehozása



Trichoderma reesei deléciós kazetta létrehozása



6. ábra: Első körös PRC reakció sematikus ábrája

Aspergillus fumigatus	5'-flanking régió	pyroA gén	3'-flanking régió
Reverz primer (R)	R3: P2_AN6644_pyroAR	R2: P6_pyroA_AFU_R	R1: P4_AN6644R
Forward primer (F)	F3: P1_AN6644F	F2: P5_pyroA-AFU_F	F1: P3_AN6644_pyroAF
DNS fragment mérete (bp)	811	1736	1119

Trichoderma reesei	5'-flanking régió	pyr4 gén	3'-flanking régió
Reverz primer (R)	R6: P2_AN6644_py4R	R5: P6_pyr4R	R4: P4_AN6644R
Forward primer (F)	F6: P1_AN6644F	F5: P5_pyr4F	F4: P3_AN6644_py4F
DNS fragment mérete (bp)	811	2737	1119

1. táblázat: A double-joint PCR első körös reakciója során alkalmazott primerek és a DNS fragmentek hossza

Annak érdekében, hogy meg tudjuk állapítani, hogy az egyes primereknek, melyik az optimális anellációs hőmérséklete gradiens PCR-t indítottunk el 50-60 °C tartományban. A PCR reakció lánchosszabbítás lépésének időtartamát megbecsülhetjük, amennyiben tudjuk a felszaporítani kívánt DNS fragment hosszát.

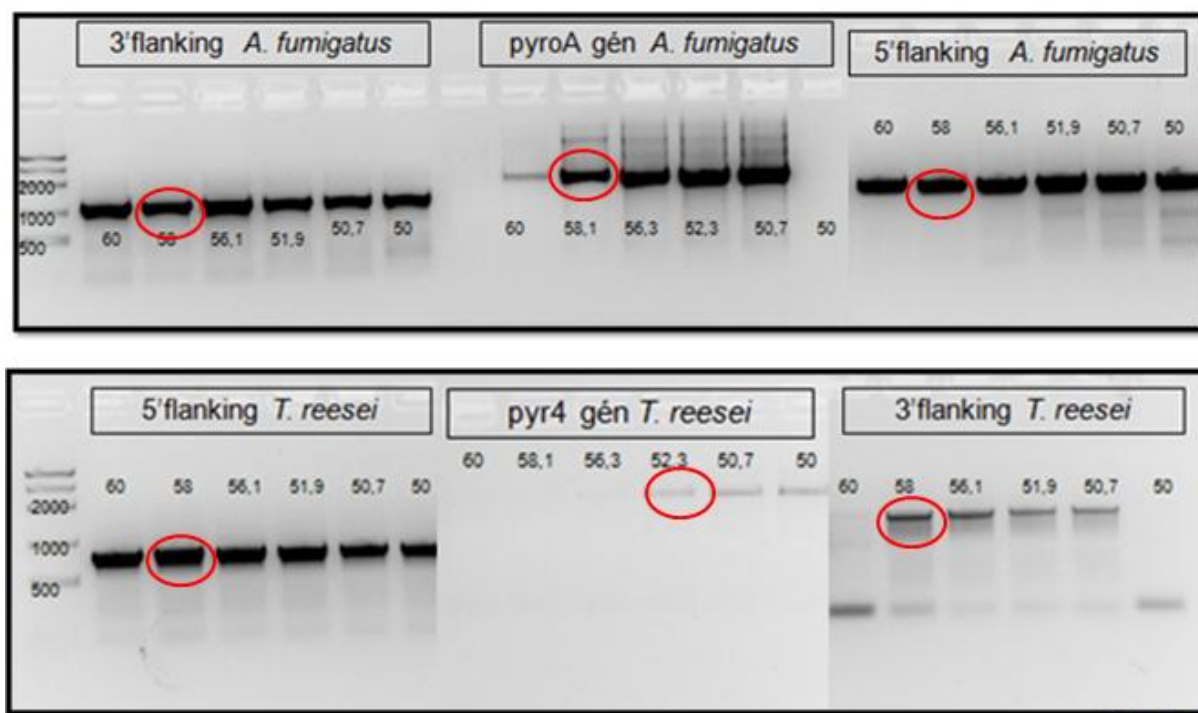
A következő hőmérséklet értékeken indítottuk el a PCR reakciót:

Flankings (°C)	60,0	58,0	56,1	51,9	50,7	50,0
Marker gének (°C)	60,0	58,1	56,3	52,3	50,7	50,0

2. táblázat: Gradiens PCR hőmérséklettartománya

Gradiens PCR program:

Élő denaturáció	1 perc	95° C	} 29 x
Denaturáció	1 perc	95° C	
Primer kötődés	1 perc	50-60 °C	
Lánchosszabbodás	1:10 perc	72 °C	
	5 perc	72 °C	
	∞ perc	12 °C	



7. ábra: Gradiens PCR során kapott gélkép

A kapott gél képeken látható (7.ábra), hogy *Aspergillus fumigatus* esetében használt primerek mindegyik hőmérsékleten jól működtek, így az 58 °C-ot választottuk ki, amely alkalmas volt a *Trichoderma reesei* flanking régióknál alkalmazott primerek esetében is. A *pyr4-es* génnél az 52 °C volt az optimális anellációs hőmérséklet. A felszaporított fragmenteket tisztítottuk, hogy a double-joint PCR második körös reakciójának templátjaként szolgáljanak.

4.1.3. PCR termék tisztítása

A kísérleteink során szükségessé vált a felszaporítani kívánt régiók egymást követő összekapcsolásának érdekében a PCR termékek tisztítása, ez azért fontos, mert ezzel a lépéssel a DNS-t el tudjuk választani a PCR-csőben jelenlévő primerektől, enzimektől és így visszakapjuk tisztított formában a számunkra fontos DNS fragmentet. A tisztítást a *Macherey-Nagel PCR Clean-up KIT*-ben található oldatok segítségével, valamint a protokollban foglaltak alapján végeztük el. Melynek lépései a következők:

1. DNS kötő állapot beállítása

Keverjük össze az 1 térfogategység mintát 2 térfogategység NTI pufferrel.



+ 2 vol NTI
per
1 vol sample

2. DNS kötés

Helyezzük a *PCR Clean up (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column)* kolonnába egy 2 ml-es gyűjtő centrifugacsőbe és töltsük fel 700 µl mintával. Centrifugáljuk le 30 másodpercig 11.000 x g-n. Távolítsuk el a gyűjtőcsőbe ájtutott folyadékot és helyezzük vissza a gyűjtőcsőbe a *PCR Clean up* kolonnát.



Load sample



11,000 x g
30 s

3. Szilika membrán mosása

Adjunk 700 µl NT3 puffert a *PCR Clean-up* kolonnába és centrifugáljuk 30 másodpercig 11,000 x g-n. Távolítsuk el a gyűjtőcsőbe ájtutott folyadékot és helyezzük vissza a gyűjtőcsőbe a *PCR Clean up* kolonnát.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

4. Szilika membrán szárítás

Centrifugáljunk 1 percig 11.000 x g, hogy teljesen eltávolítsuk az NT3 puffert. Bizonyosodjunk meg róla, hogy a *PCR Clean-up* kolonna nem érintkezik a gyűjtőcsőben lévő folyadékkal, miközben eltávolítjuk a centrifugából.



11,000 x g
1 min

5. DNS elúció

Helyezzük a *PCR Clean-up* kolonnát egy új 1,5 ml-es centrifugacsőbe. Adjunk hozzá 15-30 µl NE puffert és inkubáljuk szobahőmérsékleten (18-25 °C) 1 percig, majd centrifugáljunk 1 percig 11.000 x g-n.



+ 15–30 µL NE

RT
1 min

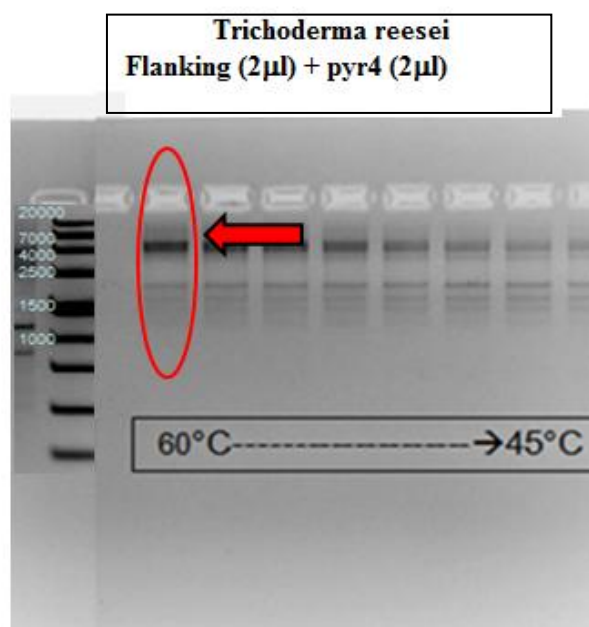
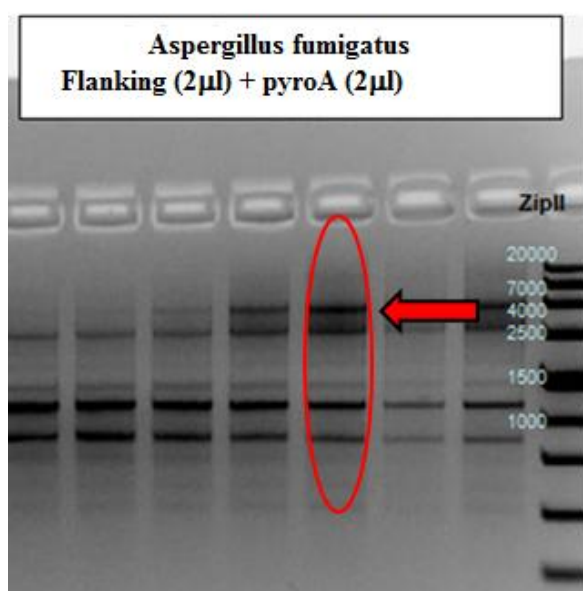
11,000 x g
1 min

4.1.4. Második körös PCR reakció

A double-joint PCR második lépése során történik az egyes szakaszok „összeillesztése”. Az itt lezajló reakciók esetében nincsen szükség primerekre a szakaszok felszaporítására, mivel a túlnyúló, átfedő kiméra régiók primerként funkcionálnak. Ekkor történik meg a három fragment fúziója. A PCR reakcióhoz hozzáadtuk a felszaporított DNS fragmenteket, Dream Taq Mix-et valamint vizet. Gradiens PCR-t indítottunk el 60-45 °C-os hőmérséklet tartományban.

PCR reakció:

1 perc	95° C	} 29 x
1 perc	95° C	
1 perc	45-60 °C	
5 perc	72 °C	
5 perc	72 °C	
∞ perc	12 °C	



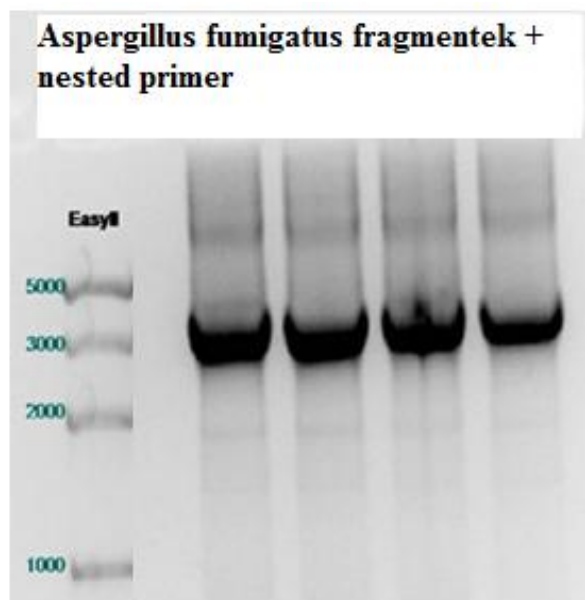
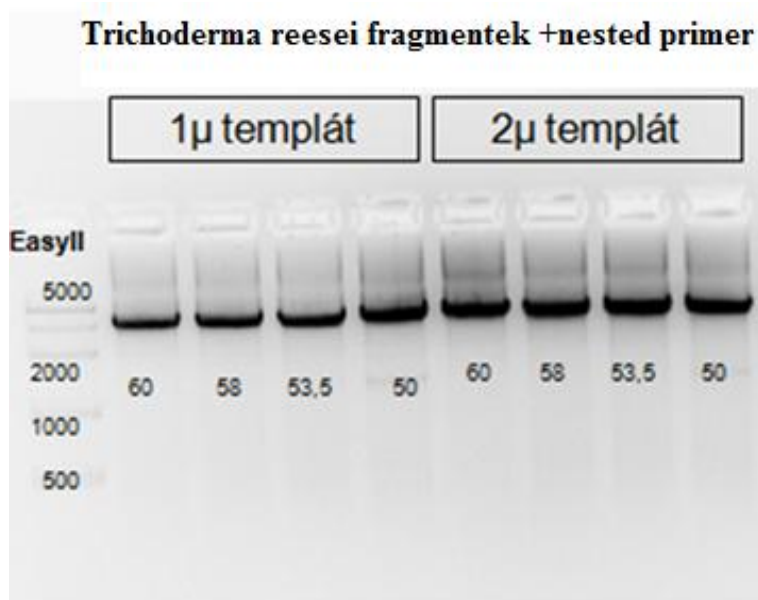
8. ábra: Második körös PCR reakció eredménye

A PCR reakció lefutása után kapott géleképeken látható (**8. ábra**), hogy az egyes DNS mintákban megtalálható a 900 bázispár nagyságú 5' és 1100 bázispár 3' flanking régiókon kívül a számunkra fontos összekapcsolódott génszakaszok is, ami *Aspergillus fumigatus* esetében 3600 bázispár, míg *Trichoderma reesei*-nél körülbelül 4600 bázispárú DNS fragement. A megjelölt mintákat tisztítottuk, hogy templátként szolgáljanak a harmadik körös PCR reakció esetében.

4.1.5. Harmadik körös PCR reakció

A sikeresen amplifikálódott második körös PCR terméket tisztítottuk, majd nested primerekkel elindítottunk egy gradiens PCR reakciót.

1 perc	95° C	} 29 x
1 perc	95° C	
1 perc	50-60 °C	
5 perc	72 °C	
5 perc	72 °C	
∞ perc	12 °C	



9. ábra: Harmadik körös PCR reakció gél képe

A kapott gél képen (9. ábra) látható, hogy a harmadik körös PCR reakció sikeres volt, hiszen a nested primerek a megfelelő méretű fragmenteket szaporították fel, így következhetett ezeknek a génszakaszoknak a transzformálása *Aspergillus nidulans* fonalas gombába.

4.2 *Aspergillus nidulans* transzformációs protokollja⁴

4.2.1 Előkészületek

A molekuláris biológia egyik legfontosabb módszere a sejtek transzformálása, melynek során speciális géneket juttatunk be egy sejtbe vagy szervezetbe. Az eljárás során nagyon fontos a steril munkavégzés, valamint a protokoll menetrendszerű betartása. A transzformálás műveletének előkészítéséhez nélkülözhetetlen a megfelelő törzsoldatok elkészítése **(3. táblázat)** és ezek, valamint a szükséges eszközök sterilizése, melyek a következők:

- 1 db 50 ml üveg (PEG)
- 1 db 500 ml üveg („A” oldat)
- 1-2 liter hideg steril víz
- 2-3 db vastag üvegyapotot tartalmazó tölcser (protoplaszt szűréséhez)
- 1 db miracloth-os tölcser (nagyobb tölcser, a micélium szűréséhez)
- kanál (micélium kikanalizásához a tölcserből)
- 300 µl-es és 1000 µl-es vágott pipetta hegy (a protoplasztok pipettázásához)

A transzformálás előtti napon lombikok leoltása szükséges, hogy megfelelő mennyiségű spóra keletkezzen. A lombikokba bemérünk 100 ml táptalajt, majd sterilezzük általában 10 lombik elegendő. A táptalaj összetétele a következő:

- 20ml/l *Aspergillus nidulans* sóoldat
- 6,5 pH
- víz

A spórákat spóramosóval lemossuk és 50 ml-es falkonba szűrjük. A tartarátos tápoldatot is sterilezzük. A leoltáskor a lombikokba a következőket adagoljuk:

- 1 ml diammonium-tartarát
- 2 ml 50 % glicerín oldat
- 1 ml uridin
- 1 ml piridoxin
- 3 ml spóraoldat

A leoltást követően a lombikokat 200 rpm-en 37 °C-on rázatjuk 12-14 órán át.

Szükséges törzsoldatok elkészítése

Törzsoldat	Koncentráció (mol/dm ³)	Moláris tömeg (g/mol)
1,2 M MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,2	246,48
1 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O pH=5,8 (1M Na ₂ HPO ₄)	1	137,99
1 M D-Sorbitol	1	182,17
1 M TRIS-HCl pH=7,5 (1M Na ₂ HPO ₄)	1	157,6
1 M CaCl ₂	1	147,02

3. táblázat: A transzformáláshoz szükséges törzsoldatok

A transzformáláshoz szükséges oldatokat az **4. táblázat** tartalmazza, melyeket a sterilizett törzsoldatokból (**3. táblázat**) frissen, a folyamat napján kell elkészíteni.

Szükséges oldatok

Oldat megnevezése	Szükséges összetevő	Összetevő koncentrációja (M)	Szükséges mennyiség (ml)
A oldat: (500ml) * 600mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ / 10mM Na-P puffer, pH:5,8	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,2	250
	Na-P puffer	1	5
	Steril H_2O	-	245
B oldat: (50 ml) * * 1,2 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ / 10mM Na-P puffer, pH:5,8	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,2	49,5
	Na-P puffer	1	0,5
C oldat: (50 ml) 600mM D-Sorbitol / 10mM TRIS-HCl, pH:7,5	D-Sorbitol	1	30
	Tris-HCl		5
	Steril H_2O	-	15
D oldat: (50 ml) 1M D-Sorbitol / 10mM TRIS-HCl, pH:7,5	D-Sorbitol	1	49,5
	Tris-HCl		0,5
STC oldat (3 x 50 ml) 1M D-Sorbitol / 10mM TRIS-HCl, pH:7,5 / 10mM CaCl_2	D-Sorbitol	1	49
	Tris-HCl		0,5
	CaCl_2		
PEG 6000 (20 ml) *** 10mM TRIS-HCl, pH:7,5 / 10mM CaCl_2	PEG 6000	-	12 g
	Tris-HCl	1	0,2
	CaCl_2		
	Steril H_2O	-	5

4. táblázat: Transzformáláshoz szükséges frissen készített oldatok

*: Az oldatot jégen tartjuk, mert ez szükséges a micélium átmosásához. Előre le kell sterilizálni egy 500ml-es üveget.

**: A „B” oldatban oldjuk fel a β -glükózidáz enzimet; 0,5g $\rightarrow$ 20 ml B oldat. Majd sterilre szűrjük (fecskendő+szűrő).

***: Óvatosan melegítjük, mert a PEG nagyon habzik. Ha feloldódott, akkor vízzel jelre állítjuk (20ml).

Szelektáló és fedőagar elkészítése

A transzformálás ellenőrzéséhez szükségünk van egy szelektáló- valamint, egy fedőagarra. Ezekhez készítenünk kell egy 1 M szacharóz oldatot. Moláris tömegét felhasználva a szacharóznak ki tudjuk számolni, hogy 1 liter oldathoz 343,3 g szacharózra van szükség, melyet 700 ml desztillált vízben oldunk fel.

Az oldódást követően 20 ml/l *Aspergillus nidulans* só oldatot adunk hozzá és beállítjuk a pH-ját 6,5-re és pontosan felöntjük 970 ml-re. Ezt a lépést követően készítjük el a szelektáló és fedő agart az **5. táblázatban** látható módon.

	Fedő agar	Szelektáló agar
Szükséges mennyiség	2 x 100 ml	2 x 400 ml
Komponensek 100 ml-re vonatkoztatva	0,8 g agaróz	1,5 % Noble agar (6g)
	98 ml szacharóz	388 ml szacharóz
Fennmaradó térfogat	sterilizés után 3-3 ml kiegészítőket adunk hozzá. 2-3 plate-hez hozzáadjuk a szelekciós markerként szolgáló vitamint, ez lesz a kontroll.	sterilizés után a fennmaradó 12 ml a kiegészítőket jelenti

5. táblázat: Fedő és szelektáló agar elkészítésének módja

4.2.2 Protoplasztálás menete

A gomba sejtek protoplaszt képzése a fent említett tápoldaton nevelt spórák felhasználásával történik. Első lépésként leszűrjük a micéliumot a miraclothos üvegtölcséren, miközben vízzel, majd az „A” oldattal alaposan átmoszuk. Majd az átmosott sejteket a „B” oldatban feloldott enzimes oldatba kanalazzuk és 30°C -on 85 rpm-en rázatjuk. Eközben az enzim leemészteti a gomba sejtfalet.

Ez idő alatt elkészítjük a C, D, STC oldatokat, és megöntjük a plate-eket. Fontos, hogy figyelünk a vitaminokra és a szelekciós markerre. Ahhoz, hogy ellenőrizni tudjuk a transzformálás eredményességét szükségünk van egy kontroll plate öntésére is, amely tartalmazza a vitaminokat, valamint a tartarátot. A fedőagarhoz is ugyanazokat a komponenseket adjunk, mint a szelektálóhoz, és visszatesszük a vízfürdőbe.

Az enzimes emésztést követően a protoplasztokat átszűrjük az üveggyapotos tölcseén 50 ml-es falkonba. A „B” oldattal kiegészítjük 20 ml-re, majd két részre osztjuk 10- 10 ml-re.

Ezt követően a falkoncsőben lévő mennyiséggel megegyező (10-10 ml) mennyiségű „C” oldatot adunk a protoplasztokhoz. Az előre behűtött 4 ° C-os centrifugában lecentrifugáljuk a protoplasztokat, 5000 rpm-en 10 percig.

Ezután a keletkezett felülúszót óvatosan leöntjük, miközben jégen tartjuk a protoplasztokat. Azonnal ráöntünk 10-10 ml „D” oldatot, majd ismét lecentrifugáljuk 4000 rpm-en 10 percig. Ismét leöntjük a felülúszót és ráöntünk 5-5 ml STC-t és centrifugáljuk ismét 4000 rpm-en 10 percig. Leöntjük a felülúszót, úgy hogy körülbelül 200 µl protoplaszt maradjon az oldatban, a falkon alján.

4.2.3 Transzformálás menete

Két darab 15 ml-es falkonba pipetázzuk a protoplasztálás végén kapott 200-200 µl-t. Ezután hozzápipetázunk 10-10 µl fragmentet. Azért maximum 10 µl-t, hogy ne történjen ozmotikus sokk. Majd hozzáadunk 50 µl PEG6000 oldatot és 20 percig jégen inkubáljuk. További 500 µl PEG6000-et pipetázunk hozzá, majd 20 percig inkubáljuk 18 °C-on. Az utolsó 20 perc eltelté után a protoplasztokat 3,3 ml-re egészítjük ki STC oldattal.

Majd 15 ml-es falkonokba 3-3 ml STC oldatot mérünk ki előre, majd ezekbe pipetázunk 300-300 µl protoplasztot, (10 x hígítás), majd hozzáadunk 3 ml fedőagart, melyek a vitaminokat már tartalmazzák.

Ezt a mixet azonnal ráöntjük a szelektáló agarra, hogy ne dermedjen meg. A fedőagart a felhasználásig 49 °C-os vízfürdőn tartjuk. Néhány olyan kontroll fedőagart is öntünk, amelyhez hozzáadjuk a szelekciós markert.

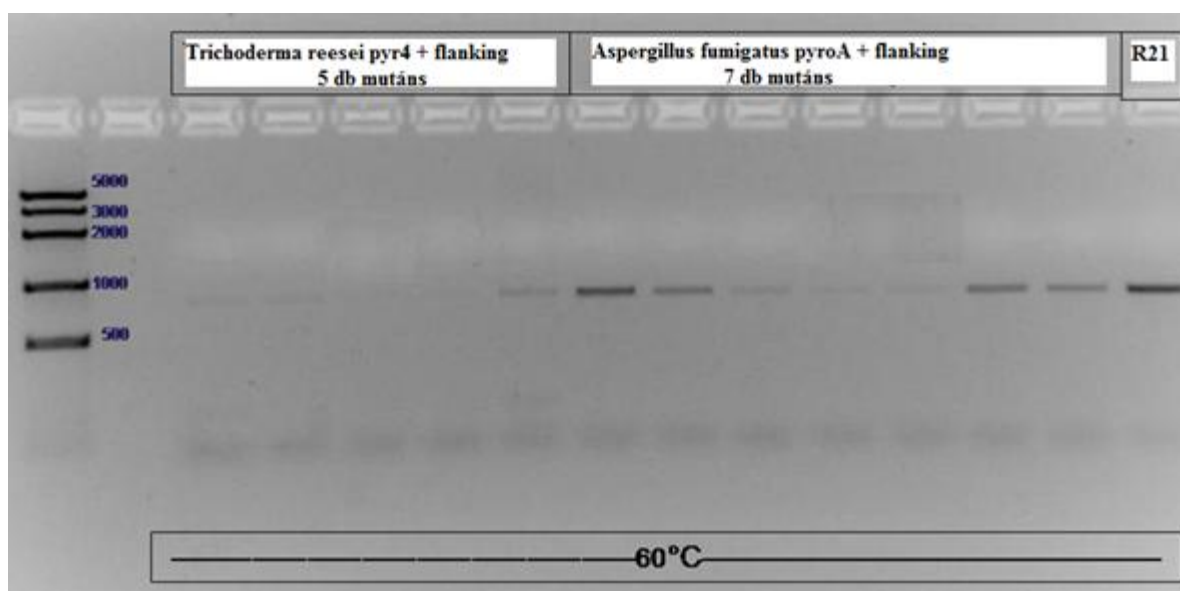
A mutánsok 3-4 nap elteltével láthatóvá válnak az agaron. A spórázás után nitrátos AMM, glükóz szénforrás mellett növesztjük tovább, a telepek kivágásával és áthelyezésével az új táptalajra. 2-3 nap után, ha lespóráztak, tovább oltjuk őket szintén AMM plate-re.

4.3 Növekedési teszt

A transzformálandó törzs a már említett A1149 kóddal jelölt *Aspergillus nidulans* volt, mely piridoxin és uridin kettős auxotrófiát mutat. Az egyik esetben piridoxint transzformáltunk az A1149-es törzsbe a másik esetben pedig uridint.

Korábban külön erre a célra tervezett primerek segítségével meggyőződünk a transzformáció sikerességéről. Az A1149/1-es törzs esetében a piridoxin szintézist kódoló génszakasz, az A1149/2-es törzsben pedig az uridin szintézist kódoló génszakasz felszaporítása sikeres volt, tehát az említett gének beépültek a genomba.

A biotin (AN6644) génhez tervezett primerekkel elvégzett PCR reakció nem adott terméket tehát a biotin (AN6644) gén nem volt jelen a genomban.



10. ábra: A sikeres biotin gén kiütéséről meggyőződő gélkép

A transzformáció sikerességét szeretnénk volna növekedési teszt segítségével is bizonyítani. Amennyiben a transzformáció sikeres volt a bevitt gének az AN6644 gén helyére épültek be, tehát azt várjuk, hogy biotin auxotrófiát fognak mutatni, illetve az integrálódás következményeként az egyik törzs uridin⁺-vá a másik törzs pedig piridoxin⁺-vá válik.

Sikeres transzformáció esetén:

1. A1149/1 → pyr⁺, uri⁻, bio⁻
2. A1149/2 → pyr⁻, uri⁺, bio⁻

A rekombináció és az integráció sikerességéről a gomba szelektáló tápagon történő növekedésből következtettünk.

Kísérlet menete:

Az alap AMM (*Aspergillus Minimal Medium*) táptalaj összetétele:

- 6 g/l NaNO₃
- 20ml/l *A. nidulans* só oldat
- pH= 6,5

Az AMM egy specifikus minimál táptalaj, mely a gomba növekedéséhez szükséges esszenciális komponenseket tartalmazza.

Ezen kívül a táptalajba 1,5g/100ml agarképző is került, hogy a gombák növekedését szilárd táptalajon tudjuk vizsgálni. Az összeállítás után a táptalajt sterilizáltuk, majd ezt követően adtuk hozzá a szükséges nyomelemeket.

Mindkét mutáns esetében 4-4 plate készült, oly módon hogy ugyanolyan táptalaj összetétellel az összes vizsgált kombináció esetében kettőt-kettőt csináltunk a megbízhatóság és a biztonság kedvéért.

	A1149/1		A1149/2	
	1	2	3	4
glükóz	+	+	+	+
biotin	-	+	-	+
piridoxin	-	-	+	+
uridin	+	+	-	-

6. táblázat: Mutánsok növekedéséhez használt nyomelemek

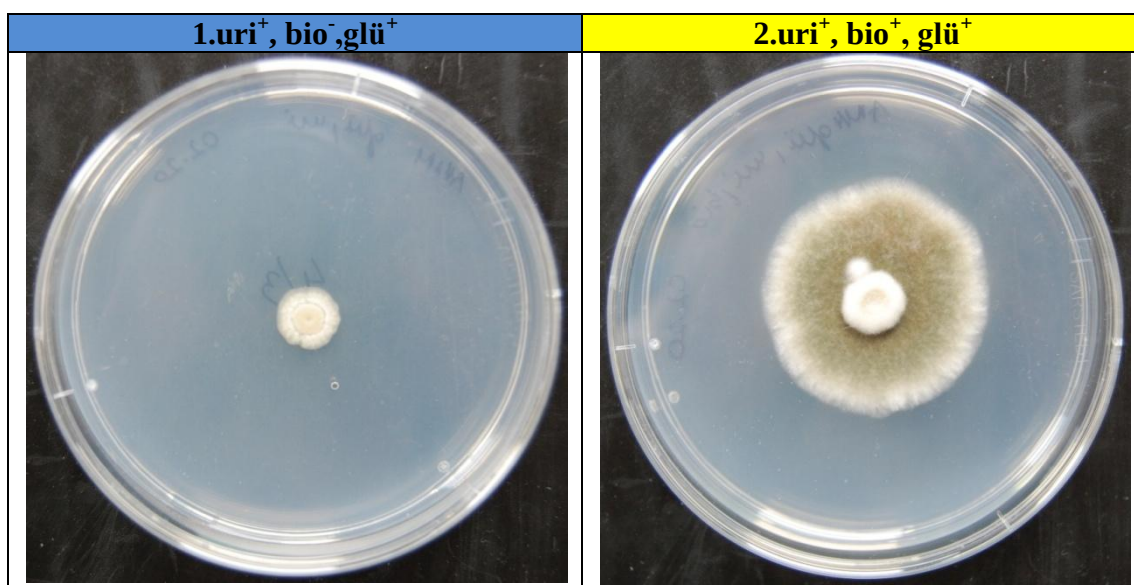
A színekkel jelölt cellák a növekedés szempontjából esszenciális különbségeket kívánják szemléltetni. (A1149/1 1-2 között, illetve A1149/2 3-4 között)

Glükózra, azaz szénforrásra minden esetben szükség van a gomba növekedéséhez. A táptalaj kombinációk arra szolgálnak, hogy segítségükkel igazoljuk a transzformáció sikerességét. Miután a kiöntött tápagarak megszilárdultak, leoltottuk őket a megfelelő spórákkal és inkubáltuk őket 4 napig.

Az inkubációt követően a gombatelepek jelenléte vagy éppen hiánya szignifikáns jelentéssel bír

A következő eredményeket kaptuk:

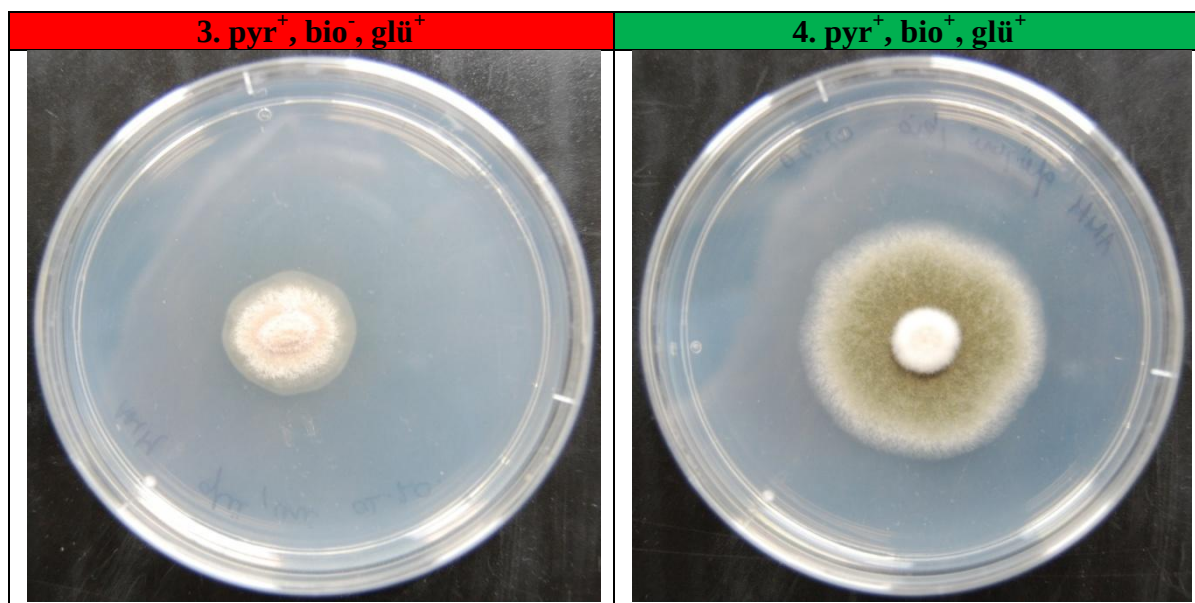
1. A1149/1



11. ábra: A1149/1 mutánsok növekedési tesztje

Az első és a második kép egyértelműen bizonyítja a transzformáció sikerességét. Hiszen a gomba képes volt nőni olyan táptalajon, amely nem tartalmazott piridoxint, de biotint igen. Tehát levonható az a következtetést, hogy a piridoxin gén beépült a biotin helyére.

2. A1149/2



12. ábra: A1149/2 mutánsok növekedési tesztje

A két kép külön-külön és együttesen is szignifikáns jelzője a transzformáció sikerességének, hiszen a gomba képes volt nőni uridin mentes táptalajon.

Összességében elmondhatjuk, hogy a transzformáció mindkét esetben sikeresnek bizonyult.

5. Összegzés

A bemutatott eredményeink alapján, noha akadtak nehézségeink elmondható, hogy kitűzött célunkat teljesítettük és a leírt mutánsok létrehozása sikeres volt. A double-joint PCR módszer segítségével kialakítottunk két deléciós kazettát. Ezek közül az egyik konstrukció marker génje a *Trichoderma reesei*ből származó uridint kódoló *pyr4* gén, a másik konstrukció marker génje pedig az *Aspergillus fumigatus*ból származó piridoxint kódoló *pyroA* gén. Ezeket a deléciós kazettákat sikeresen betranszformáltuk *Aspergillus nidulans*ba, amit a bemutatott növekedési tesztek is bizonyítanak. Így elmondható, hogy fő célunk, azaz a technikai hiánymutánsok előállítása sikerült. A következő lépés a kutatás kiterjesztése, az „stwintron” splicing mechanizmusának vizsgálata. Valamint továbbmenve a belső intron funkcionális elemeinek mutagenézise révén fényt kívánunk deríteni, ezen elemek szerepére, esszenciális voltára. Remélhetőleg a kísérletek előrehaladtával, olyan új információk birtokába kerülünk, melyek révén bővíthet az intronokkal, illetve twintronokkal kapcsolatos tudástárunk.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozunk témavezetőnknek, Dr. Fekete Erzsébet egyetemi docensnek, valamint Ág Norbert PhD hallgatónak a rengeteg segítségért, rendkívül értékes tanácsaiért és türelméért, amelyek nagyban hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.

Köszönetet szeretnénk mondani Dr. Karaffa Levente tanszékvezető úrnak, hogy bizalmat szavazott számunkra a dolgozat elkészítéséhez.

Köszönettel tartozunk Kovácsné Orosz Anita PhD hallgatónak a munkánk során nyújtott sokoldalú segítségéért, rendkívül hasznos, gyakorlatias tanácsaiért.

7. Irodalomjegyzék

1. **Jae-Hyuk Yu- Zsuzsanna Hamari- Kap-Hoon Han- Jeong-Ah Seo- Yazmid Reyes-Domínguez- Claudio Scazzocchio:** Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41 (2004) 973–981
2. <http://www.ekol.chem.elte.hu/documents/biomi.pdf>
3. **Michel Flippin, Erzsébet Fekete, Norbert Ág, Claudio Scazzocchio, Levente Karaffa:** Spliceosome twin introns in fungal nuclear transcripts. *Fungal Genetics and Biology* 57 (2013) 48–57
4. **Michel Flippin:** Transformation of *Aspergillus nidulans*. IATA/CSIC— March 2006