



A *Penicillium chrysogenum* fonalas gombából izolált intra- és extracelluláris β -galaktozidáz génjeinek és expressziós plazmidkonstrukcióinak szintézise

TDK dolgozat

Készítették: Kulcsár László Biomérnök MSc II.
Kun Roland Biomérnök Msc I.
Fülöp Katalin Biomérnök Bsc III.

Témavezető: Dr. Karaffa Levente tanszékvezető egyetemi docens
Dr. Fekete Erzsébet tanszékvezető-helyettes egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar
Biomérnöki Tanszék

Debrecen, 2014.

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönjük témavezetőinknek Dr. Karaffa Levente tanszékvezető egyetemi docensnek és Dr. Fekete Erzsébet tanszékvezető-helyettes egyetemi docensnek, hogy munkánkat állandó figyelemmel kísérték és segítségökre mindig számíthattunk.

Köszönettel tartozunk Kovácsné Orosz Anita és Vasasné Jónás Ágota PhD hallgatóknak a munkánk során nyújtott hasznos tanácsaikért, és baráti támogatásukért.

Köszönjük Kertiné Somosi Rita technikusnak a TDK munkánk elkészítése során nyújtott segítségét.

Kulcsár László kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzés	4
2	Irodalmi áttekintés.....	6
2.1	A penicillin és a <i>Penicillium chrysogenum</i>	6
2.2	Leloir-útvonal és a β -galaktozidázok kapcsolata.....	8
2.3	A fehérjék és a rekombináns DNS technológia	9
3	Anyagok és módszerek.....	12
3.1	Genomi DNS izolálás <i>P. chrysogenum</i> NRRL1951 (vad típus) törzsből.....	12
3.2	RNS izolálás <i>P. chrysogenum</i> NRRL1951 (vad típus) törzsből.....	12
3.3	DNS agaróz gélelektroforézis	13
3.4	RNS agaróz gélelektroforézis	13
3.5	A <i>bgaA</i> gén, <i>bgaD</i> és a <i>bgaE</i> cDNS-ének szintetizálása.....	13
3.6	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 plazmidok készítése	15
3.7	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a plazmidok készítése	17
3.8	Transzformálás <i>E. coli</i> -ba	19
3.9	Transzformálás <i>Trichoderma reesei</i> Δ xyl1-be	21
4	Eredmények.....	23
4.1	<i>BgaA</i> gén izolálása.....	23
4.2	<i>BgaD</i> és <i>bgaE</i> gének cDNS-ének izolálása	23
4.3	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid előállítás.....	23
4.4	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a expressziós plazmidok előállítás.....	24
4.5	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid <i>Trichoderma reesei</i> Δ xyl1-be való transzformálása.....	25
4.6	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a expressziós plazmidok kompetens sejtekbe való transzformálása.....	25
5	Összefoglalás.....	27
6	Irodalomjegyzék.....	28

1 Bevezetés és célkitűzés

Világszerte évi 150 millió tonna tejsavó keletkezik a sajtgyártás melléktermékeként, amely 44–52 g/L laktózt (tejcukor; 1,4-0- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz) tartalmaz [1]. A laktóz mennyiségének kb. 15%-át használja fel a fermentációs ipar szénforrásként [2]. A laktóz szénforrásként történő felhasználásának hátránya, hogy a sejtek lassan vagy egyáltalán nem képesek hasznosítani. A sejtek számára nehezen hasznosítható laktóz könnyen hasznosítható glükózzá és galaktózzá való hidrolízise β -galaktozidáz (EC 3.2.1.23) enzimek által gazdaságilag is jelentős probléma [3].

A β -galaktozidáz (laktáz) enzim a tejcukor lebontásához nélkülözhetetlen. Ha a bélben ez az enzim hiányzik, vagy mennyisége nem elégséges, akkor a tejcukor emésztetlenül jut a vastagbélbe, ahol baktériumok bontják le, gázosodást és hasmenést okozva [4]. Az emlősöknél a szoptatás befejeződése után a laktáz gén expressziója folyamatosan csökken. Becslések szerint világszerte a felnőtt népesség 75%-a nem képes teljes egészében lebontani a tejcukrot [5], ezt laktóz érzékenységnak vagy laktóz intoleranciának nevezzük. Ez az arány Észak-Európában 5 %, Dél-Európában 71 %, de egyes ázsiai vagy afrikai országokban akár 90 % is lehet [6].

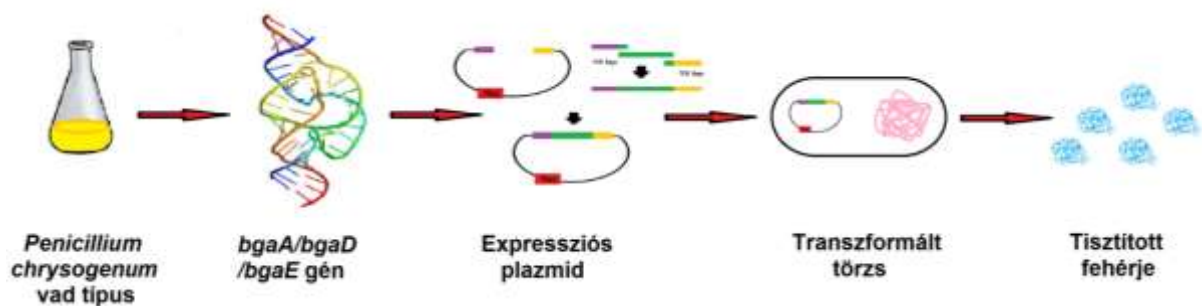
A laktóz érzékenységre megoldás lehet, ha a laktáz enzimet tablettában étkezés előtt pótoljuk, így a tejcukor tartalmú ételek már fogyaszthatók mellékhatások megjelenése nélkül, illetve megoldás lehet a laktóz mentes élelmiszerek előállítása is laktáz enzimek által. Több ilyen típusú gyógyszer/élelmiszer van jelenleg forgalomban [7].

A *Penicillium chrysogenum* komoly biotechnológiai jelentőséggel bíró fonalas gomba - a penicillin beta-laktám típusú antibiotikumot termeli. Az antibiotikum fermentációs ipari előállítása sokáig laktóz szénforráson történt, ennek ellenére szénváz asszimilációs mechanizmusairól illetve a katabolizmusban részt vevő struktúrgénekről és az általuk kódolt enzimekről keveset tudunk. Ezt a hiányt igyekszik bepótolni a Biomérnöki Tanszéken zajló kutatási program, mely során a laktóz (1,4-O-galaktopiranozil-D-glükóz) hidrolízist végző β -galaktozidáz géneket/enzimeket tanulmányozzuk.

A tanszékünkön folyó korábbi kutatások során a *P. chrysogenum* genom *in silico* analízise azt mutatta, hogy a *P. chrysogenum* törzs legalább öt feltételezett bGal-t kódoló gént tartalmaz, melyek: Pc22g14540 (*bgaD*), Pc12g11750 (*bgaE*), Pc16g12750 (*bgaA*),

Pc14g01510 és Pc06g00600. Az első kettő ortológ az *Aspergillus nidulans* intracelluláris család laktózon kifejeződő 2 glikozil hidroláz génjével, a *bgaD* a legfontosabb GH2 β -galaktózidázt kódoló génjével mutat ortológiát. A *bgaD* transzkripciós vizsgálata azt mutatta, hogy kizárólagosan laktózon expresszálódott, ezzel szemben a *bgaE* gén minden szénforráson gyengén kifejeződött [8].

Azt gondoljuk, hogy ezek a gének nagyon fontos szerepet játszanak a laktóz katabolizmusában. A laktáz enzimek jelentősége miatt célul tűztük ki, hogy a *P. chrysogenum* feltételezhetően β -galaktozidázokat kódoló géneket (*bgaA*, *bgaD*, *bgaE*) izoláljuk PCR technika segítségével és expressziós plazmidokba klónozzuk. Munkánk következő lépésében a *bgaA* gént (feltételezhetően extracelluláris enzim) *Trichoderma reesei*-be, a *bgaD* és *bgaE* gént (feltételezhetően intracelluláris enzim) *E. coli*-ba szeretnénk transzformálni. Az **1. ábra** foglalja össze a kutatómunka megvalósításának vázlatát.



1. ábra A tervezett munka megvalósítását összefoglaló ábra.

2 Irodalmi áttekintés

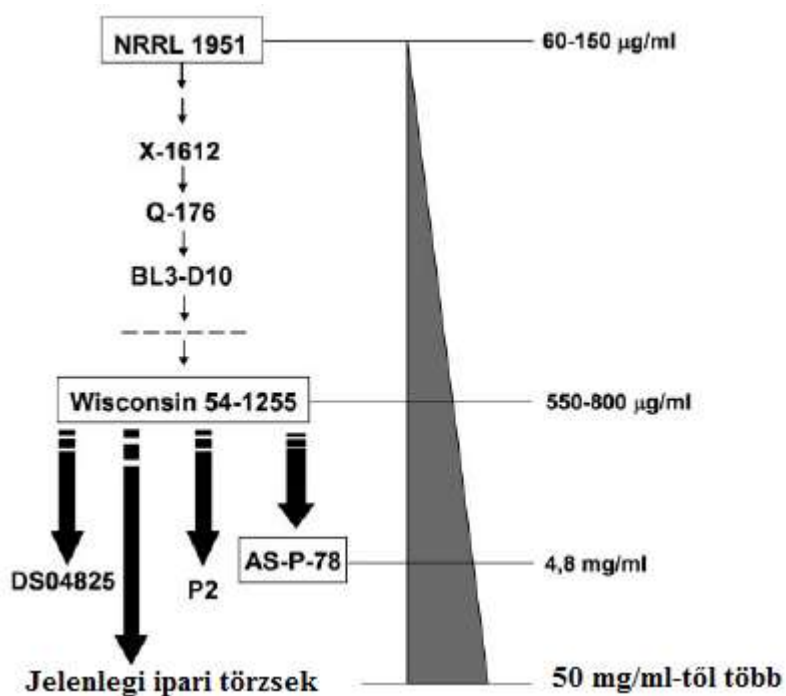
2.1 A penicillin és a *Penicillium chrysogenum*

A penicillin felfedezése Sir Alexander Fleming nevéhez kötik legtöbbször, habár már előtte is megfigyelték néhány penészgomba antibakteriális hatását, például az afrikai beduinok, akik több mint ezer éve készítenek gyógykenőcsöt a szamarak hámján keletkezett penészből. Vincenzo Tiberio olasz orvostanhallgató is megfigyelte, hogy az udvarukon működő kút vize a hasmenéses megbetegedések gyógyítására alkalmas. 1895-ben publikálta, hogy a kútfedő kőlapjáróról nyert penészgomba kivonata a laboratóriumi baktériumtenyészeteket teljesen elpusztította, a nápolyi egyetemi tanárai azonban nem tulajdonítottak jelentőséget az esetnek. Ernest Duchense fiatal francia katonaeorvos, 1897-ben szintén észrevette, hogy az arab lovászinások a nyirkos nyergeken megtelepedett penészgombát használják sebésedések kezelésére. Duchense-nek sikerült azonosítani a *Penicillium glaucum* nevű penészgombát, amellyel tifuszos tengerimalacokat kezelt, illetve felfigyelt arra, hogy az *E. coli* baktériumokat sikeresen elpusztítja. Doktori értekezést nyújtotta be kutatási eredményeiről, de a munkáját a Pasteur Intézet nem ismerte el.

Fleming 1928-ban a londoni St. Mary kórházban vette észre, hogy egy *Staphylococcus* tenyészetébe került kékes-zöldes penész szennyeződés körül a baktériumok nem növekednek. Fleming arra a következtetésre jutott, hogy a penész olyan anyagot bocsát ki, amely gátolja a baktériumok növekedését, illetve elpusztítja a baktériumokat. A penészt tiszta kultúrában is kitenyésztette, és felfedezte, hogy a *Penicillium* családba tartozó fajról van szó, amelyet ma *Penicillium notatum* (NRRL 1249B21) törzsként ismerünk. Ennek a törzsnek meglehetősen alacsony (1,2 µg/ml) volt a penicillin termelő képessége [9].

Jobb penicillin termelő tulajdonságú törzsek izolálására égető szükség volt, 1943-ban Peoriában sikerült fertőzött sárgadinnyéről izolálni a *Penicillium chrysogenum* NRRL1951-es törzset, mely 60-150 µg/ml penicillin előállítására volt alkalmas [10]. A *P. chrysogenum* NRRL1951 (vad típus) penicillin titer emelésére irányuló fontosabb törzsfeljesztési „állomásokat” a **2. ábra** taglalja. A vad típus röntgennel való kezelése után kapták az X-1612 mutánst, amely már 300 µg/ml penicillint termelt. Ennek a törzsnek több klasszikus mutagén kezelésével kapták a Wisconsin Egyetemen a Q-176 mutánst, amely a Wisconsin sejtvonal ősenek tekinthető, amely már 550 µg/ml penicillint szolgáltatott, továbbfejlesztésével a Wisconsin 54-1255 laboratóriumi modell törzssé alakult [11-12]. Ezt követő fejlesztések

párhuzamosan több kutatóintézetben folytatódtak, így nyerve a mai modern iparban használatos túltermelő sejtvonalak alapját, mint a Panlabs (Taipei, Taiwan) P2 törzsét, vagy a DSM (Heerlen, Hollandia) DS04825 törzsét vagy az Antibioticos S. A. (León, Spanyolország) ASP-78 és E1 törzsét [13].



2. ábra A *P. chrysogenum* penicillin termelő törzseinek származtatása. A penicillin titer az ábra jobboldalán feltüntetve [14].

A penicillin termelésre kifejlesztett táptalajok vizsgálata révén régóta jól ismert, hogy a diszacharidok valamint az oligo- és a poliszacharidok jobb szénforrások a penicillin bioszintézis számára, mint a glükóz. A *P. chrysogenum* általi penicillin ipari termeléséhez sokáig laktózt használtak szénforrásként, hogy a legmagasabb penicillin titert elérjék [15, M16]. A D-fruktóznak, a D-galaktóznak és a szacharóznak, a D-glükózhoz hasonlóan szintén negatív hatása volt a penicillin termelésre. A glükóz hatása koncentráció függő. Ipari méretekben a penicillin bioszintézishez a glükóz általi karbon represszió kikerüléséhez szubrepresszálo mennyiségű glükózt adagolnak a tenyészetbe [17, 18]. A karbon katabolit represszió megléte pH függő, a pH csökkenésével hatása nő [19]. A fiziológiai értelmezése a penicillin bioszintézis karbon kontrolljának még nem teljesen tisztázott.

2.2 Leloir-útvonal és a β -galaktozidázok kapcsolata

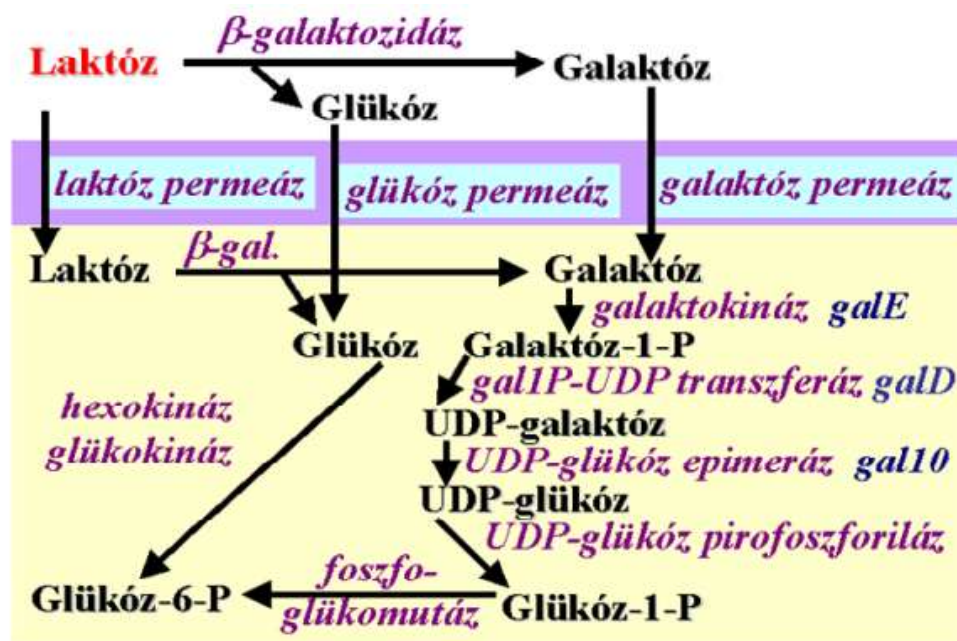
Az *Escherichia coli* laktóz lebontásának szabályozása tankönyvi ismeretnek számít, a baktériumok laktóz lebontása [20, 21] azonban alapvetően különbözik az eukariótákétól. A laktóz lebontás első lépése a D-glükózzá és D-galaktózzá történő hidrolízis, ami vagy az extracelluláris β -galaktozidáz vagy a laktóz permeáz és az intracelluláris β -galaktozidáz párhuzamos működésének eredményeként történik meg. Sejtfalhoz kötött, extracelluláris és intracelluláris β -galaktozidázokat egyaránt leírtak, sokszor egy fajon belül is [22-25]. A **1.táblázatban** látható, hogy a fonalas gombáknak extracelluláris laktóz hidroláz enzimei savas pH optimummal rendelkeznek, ezzel szemben az élesztők és baktériumok intracelluláris β -galaktozidáz enzimeinek semlegeshez közeli a pH optimuma. Hőmérséklet optimumok leginkább 35-60 °C körül van.

1. táblázat Jelentősebb mikrobiális β -galaktozidázok [3]

Mikroorganizmus		Termelt enzim	pH-optimum	T-optimum [°C]
Fonalas gomba	<i>Aspergillus niger</i>	E	3,0-4,0	55-60
	<i>Aspergillus oryzae</i>		5,0	50-55
Élesztő	<i>Kluyveromyces lactis</i>	I	6,5-7,0	30-35
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		6,6	30-35
Baktérium	<i>Escherichia coli</i>	I	7,2	40
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>		6,2	55
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>		6,5	66
	<i>Bacillus circulans</i>		6,0	65

I – intracelluláris, E – extracelluláris enzim

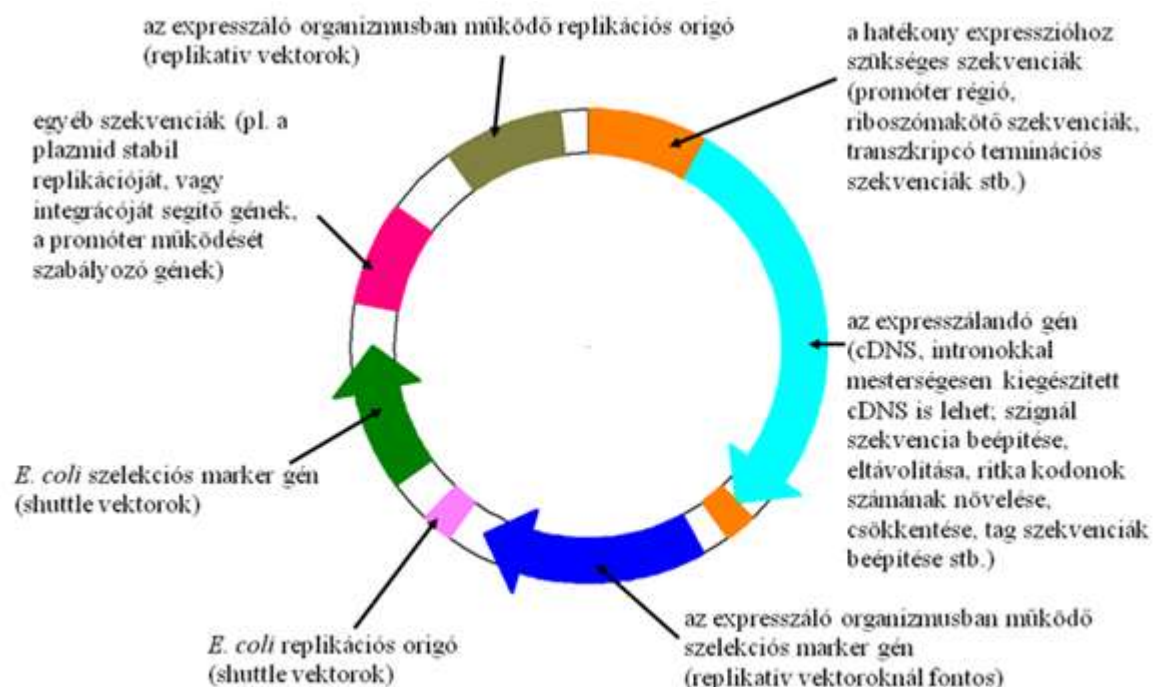
A glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig jellemzően a Leloir-útvonalon alakul tovább [26]. A Leloir-útvonal és a laktáz enzimek kapcsolata a **3. ábrán** látható. A Leloir-útvonal részben a lebontó anyagcsere része, melyben a D-galaktóz szén- és energiaforrásként is hasznosul. A D-galaktóz építőelem szolgáltatójaként felépítő útvonalként is működik, ilyenkor változatos funkciójú és felépítésű lipopoliszacharidok, sejtfalkomponensek és exopoliszacharidok szintézisében vesz részt [27].



3. ábra Leloir-útvonal és az intra/extracelluláris β -galaktozidázok kapcsolata.

2.3 A fehérjék és a rekombináns DNS technológia

Rekombináns géntechnológia, egy új tulajdonságokkal rendelkező fehérje, sejt, vagy élőlény létrehozása. Az ezen alapuló iparág az 1970-es évek végén kezdett el kialakulni, ténylegesen a humán inzulin baktériumokkal való előállítása óta létezik [28]. A cél lehet egy géntermék (fehérje) előállítása, ritkábban valamilyen metabolit (antibiotikum, antifungális anyag, alkaloid stb.) termeltetése is. Homológ expresszió során, az expresszált gén az expresszióra használt organizmusból származik, szemben a heterológ expresszióval, ahol az expresszált gén nem az expresszióra használt organizmusból származik. A heterológ expressziónál gyakrabban lépnek fel kompatibilitási problémák. Az expressziós rendszer expressziós vektorból és expresszálnó sejtől áll. Egy tipikus expressziós vektor részeit a 4. ábra mutatja be [29].



4. ábra Egy tipikus expressziós vektor részei.

A fehérjék alapvető szerepet töltenek be szinte valamennyi biokémiai folyamatban, mint katalizátor (enzim), jeltovábbító vagy struktúraépítő. Rekombináns fehérjéket főleg az mosószerszám, bioetanol, élelmiszeripar használ, ezek általában enzimek. Rekombináns DNS technológiát a gyógyszeriparban vér és véralkotók, vakcinák, allergének, szomatikus sejtek, szövetek előállítására és génterápiában használnak. Piacuk robbanásszerűen emelkedik napjainkban.

Egy tetszőleges gén kifejeztetése (expresszió) történhet baktérium és gomba tenyészetekben; növényi, rovar és emlős sejt kultúrákban. A gombatenyészetek előnye, hogy a legkülönbözőbb biológiailag megújuló tápanyagforrásokon (cellulóz, hemicellulóz, lignin) is képesek nőni. Ehhez hozzájárul a gombák bonyolult enzimsziszteme, például a *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) akár 100 g/liter mennyiségű enzimet (cellulázt) képes extracellulárisan expresszálni [30, 31]. Manapság rutinszerűen expresszálnak fehérjéket *E. coli*-ban, *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Pichia pastoris*-ben. A posztranszlációs módosítások, így a diszulfid hidak, N- és O-glikoziláció nem megfelelőek ezekben a szervezetekben. Alternatívaként termelhetők a különböző fehérjék *T. reesei*-vel cellulázt nem indukáló szénforrásokon, de a szennyező fehérjék még így is zavarják a célenzim kinetikai paramétereinek a meghatározását [32]. A *T. reesei*-ben a celluláz indukciót a XYR1

transzkripciós regulátor szabályozza, *xyr1* génben sérült mutánsok esetén a celluláz enzimek nem fejeződnek ki, egy másik lehetséges alternatívának tekinthető [33].

Az *Escherichia coli* expressziós rendszerek a legelterjedtebben használtak. Előnye, hogy alacsony költségekkel jár a tenyésztése. A generációs idejük is rövid, kevés idő kell a sejtek szaporodásához. Az *E. coli* BL21(DE3) a legszélesebb körben alkalmazott törzs rekombináns gének expressziójára. DE3 lizogénje tartalmazza az IPTG által indukálható T7 RNS polimerázt [34, 35]. Ezen kívül egy *lon* proteáz, és *ompT* proteáz (külső membrán proteáz) hiányos törzs, a proteázok degradálhatják a fehérjéket a tisztítás alatt [36].

Sok fehérje számára elengedhetetlen a stabil diszulfid kötések kialakulása, nélkülük a fehérjék instabillá válhatnak, illetve zárványtestekbe akkumulálódhatnak. A glutation-reduktáz (*gor*) és a tioreduxin-reduktáz (*trxB*) géneket tartalmazó bakteriális törzsek jelentősen növelhetik a stabil diszulfid kötések kialakulását az *E. coli* citoplazmájában [37]. Az Origami törzsek, amelyek tartalmazzák a *gor* és a *trxB* géneket, az aktív fehérjék mennyisége akár tízszeres is lehet egy másik törzshöz képest [37].

A legtöbb aminosavat több kodon is kódolhat, az élőlényekbe összesen 61 aminosav kodon használatos. Az *E. coli*-ba történő heterológ gén mRNS-ének expressziója során a kodonok használatában különbség lehet, egyes tRNS ritkák lehetnek vagy akár hiányozhatnak is. Ez transzlációs kereteltolódást, a transzláció túl korai befejezését, vagy aminosav beépülés-hiányt okozhat a gazdasejtben, ezáltal csökkentve a termék minőségét, illetve az expresszió mértékét. A Rosetta törzsekben az eukarióta gének expressziója hatásosabb lehet, mivel tartalmazza az *E. coli* ritkán használt kodonjait. A Rosetta törzsek „univerzális” transzlációt tesznek lehetővé [38-40].

A fehérjék vizsgálatához és funkciójuk megértéséhez az első, nélkülözhetetlen előkészítő lépés a fehérjék izolálása. Könnyebb esetünk van, ha a fehérje a sejten kívüli térbe választódik ki, ilyenkor nem kell a sejteket feltárni. Ellenkező esetben, amikor a fehérje a sejten belül van, a vizsgálatokhoz a sejteket fel kell tární, ami történhet mechanikai és/vagy nem mechanika behatás segítségével is. A sejtörmelék a sejtlyázumtól centrifugálással választható el. Egy fehérje általában a sejt összes fehérjéinek 0,1-10%-át teszik ki, de rekombináns fehérjék esetén ez az arány akár az 50%-os értéket is elérheti [41].

3 Anyagok és módszerek

3.1 Genomi DNS izolálás *P. chrysogenum* NRRL1951 (vad típus) törzsből

A genomi DNS izolálás során a *Penicillium chrysogenum* NRRL1951 (vad típus) törzs 2 ml konidiospóráit 100 ml minimál tápoldat és galaktózt tartalmazó táptalajba oltottuk, majd 28 °C-on, 200 rpm-en 40 órán keresztül rázattuk. A minimál tápoldat összetétele: 1,5 % (w/v) szénforrás, 0,2 % (w/v) KH_2PO_4 , 0,8 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0,025 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 % (w/v) $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$. Ezután a micéliumot leszűrtük, 2-szer 50 ml hideg, steril desztillált vízzel mostuk, és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A feltárást folyékony nitrogénnel folyamatosan hűtött dörzsmozsárban végeztük. A DNS-t Macherey-Nagel, Genomic DNA from plant kit segítségével izoláltuk.

3.2 RNS izolálás *P. chrysogenum* NRRL1951 (vad típus) törzsből

Az RNS izolálás során a *Penicillium chrysogenum* NRRL1951 (vad típus) törzs 2 ml konidiospóráit 100 ml minimál tápoldat és galaktózt tartalmazó táptalajba oltottuk, majd 28 °C-on, 200 rpm-en 40 órán keresztül rázattuk. A minimál tápoldat összetétele: 1,5 % (w/v) szénforrás, 0,2 % (w/v) KH_2PO_4 , 0,8 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0,025 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 % (w/v) $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$. Ezután a micéliumot leszűrtük, 2-szer 50 ml hideg, steril desztillált vízzel mostuk, és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A feltárást folyékony nitrogénnel folyamatosan hűtött dörzsmozsárban végeztük. Az RNS-t a NucleoSpin Plant RNA (Macherey Nagel) kit használatával izoláltuk, a maradék genomi DNS-t DNase I, RNase free (Thermo Science) oldattal távolítottuk el. 30 µl RNS, 10 µl 10X Reaction Buffer, 1 µl RNase inhibitor, 10 µl DNase enzim és 49 µl DEPC víz (Nuclease free water) elegyét 37 °C-on 3 órán keresztül PCR készülékben inkubáltuk. Ezt követően az így kapott PCR termékhez 5 µl 50mM-os EDTA-t adagoltunk, majd visszahelyeztük a PCR-be 65 °C-ra 10 percre. Az így kapott gDNS mentes RNS-t megtisztítottuk a különböző egyéb anyagoktól RNA Clean-up kit (Macherey Nagel) segítségével. Az RNS-oldat koncentrációját fotometriásan meghatároztuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.3 DNS agaróz gélelektroforézis

A gélelektroforézis során 100 ml-es géleket használtunk. 1,5 g agarózt 100 ml egyszeres TAE (tris-EDTA-jégecet) pufferbe mértük, szemcsementesséig forraltuk, majd 15 percre 60 °C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután 1 µl etidium-bromid-ot mértünk az oldatba, alaposan összeráztuk, majd kiöntöttük a gél a kivízszintezett ágyra. Miután a fésűt tartalmazó gél megszilárdult, a futtatókádba helyeztük, és egyszeres TAE pufferrel öntöttük fel, végezetül pedig óvatosan kivettük a fésűt. 80 V-on, 30-50 percig futtattuk a mintákat. Az eredményt UV-transzilluminátor és meghatározott nagyságú (bázispár) DNS fragmenteket tartalmazó marker segítségével elemeztük.

3.4 RNS agaróz gélelektroforézis

A gél (150 ml végtérfogat esetén) tartalmazott: 1,6 g agarózt; 142 ml 1×MOPS-t, amelyet tízszeresből hígítottuk DEPC-s vízzel. A 10×MOPS: 200 mM MOPS, 50 mM Na-acetát, 20 mM EDTA, (pH=7) összetételű oldata. Szemcsementesséig forraltuk az elegyet, majd 10-15 percig 60°C-os hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztük. 8,1 ml 37%-os formaldehidet mértünk bele, alaposan összeráztuk, majd kiöntöttük a gél a kivízszintezett ágyra. Miután a fésűt tartalmazó gél megszilárdult, a futtatókádba helyeztük, és 1×MOPS pufferrel öntöttük fel, végezetül pedig óvatosan kivettük a fésűt. A futtatandó mintákat kivettük a -80 °C-os mélyhűtőszekrényből, 50 °C-ra felmelegítettük őket, vortexeltük és centrifugáltuk őket. A koncentráció meghatározás alapján, pontosan kiszámolt térfogatú mintát vettünk ki, és kétszeres térfogatú frissen készített Loading Dye-t adtunk hozzá (összetétele: 250 µl 100%-os formamid, 83 µl 37%-os formaldehid, 50 µl 10× MOPS, 50 µl 100%-os glicerin (RNáz mentes), 10 µl brómfenolkék, 7 µl GelRed, 50 µl DEPC víz). A mintákat mintegy 15 percig 65°C-on denaturáltuk, utána jégre helyeztük őket, és belemértük a zsebekbe. Ha a futtatás sikeres volt, két erőteljes RNS csíkot kaptunk (18S és 23S rRNS) közöttük pedig enyhe sáv mutatta az mRNS-t.

3.5 A *bgaA* gén, *bgaD* és a *bgaE* cDNS-ének szintetizálása

A *bgaA* gén esetében a *P. chrysogenum* vad típusának genomi DNS-e, a *bgaD* és a *bgaE* gének esetében az mRNS-ből szintetizált cDNS-e volt a PCR reakció templátja. A Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit-et(Roche) használtunk a cDNS szintézis során.

1 µl oligo-dT primert és 10,4 µl RNS-t egy steril eppendorfa összemértünk 0 °C-on, majd 10 percre 65 °C-re PCR készülékbe, ezt követően azonnal jégre helyeztük a reakció elegyet. 0 °C-on 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction-t, 0,5 µl Protector RNáz inhihítort, 2 µl Deoxinukleotid Mixet, 1 µl DTT-t és 1,1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptas-t adtunk a reakcióelegyhez, majd 45 °C-on 30 percet inkubáltuk PCR készülékben. A reverz transzkriptáz enzim inaktiválásához a reakció után 5 percig 85 °C-on tartottuk a PCR terméket.

A *bgaA* génre tervezett primerek:

BgaAforw: TTATGAAGCTCTCGTCCTCT from: 1999-2018 GC: 9 (52.91 °C)

BgaArev: GACGGGATTGAGATTGTTGT from: 5984 GC: 9 (55.86 °C)

3986 bp

A *bgaD* gén cDNS-ére tervezett primerek:

bgaDforw: ATGCAGGCCGATCCCAAATG

bgaDrev: TCTTCACAAAGAAACAGGCT

3135 bp

A *bgaE* gén cDNS-ére tervezett primerek:

bgaEforw: ATGACAGCATCCTATCCCCG

bgaErev: GACCTAACGATGCACGACAT

2007 bp

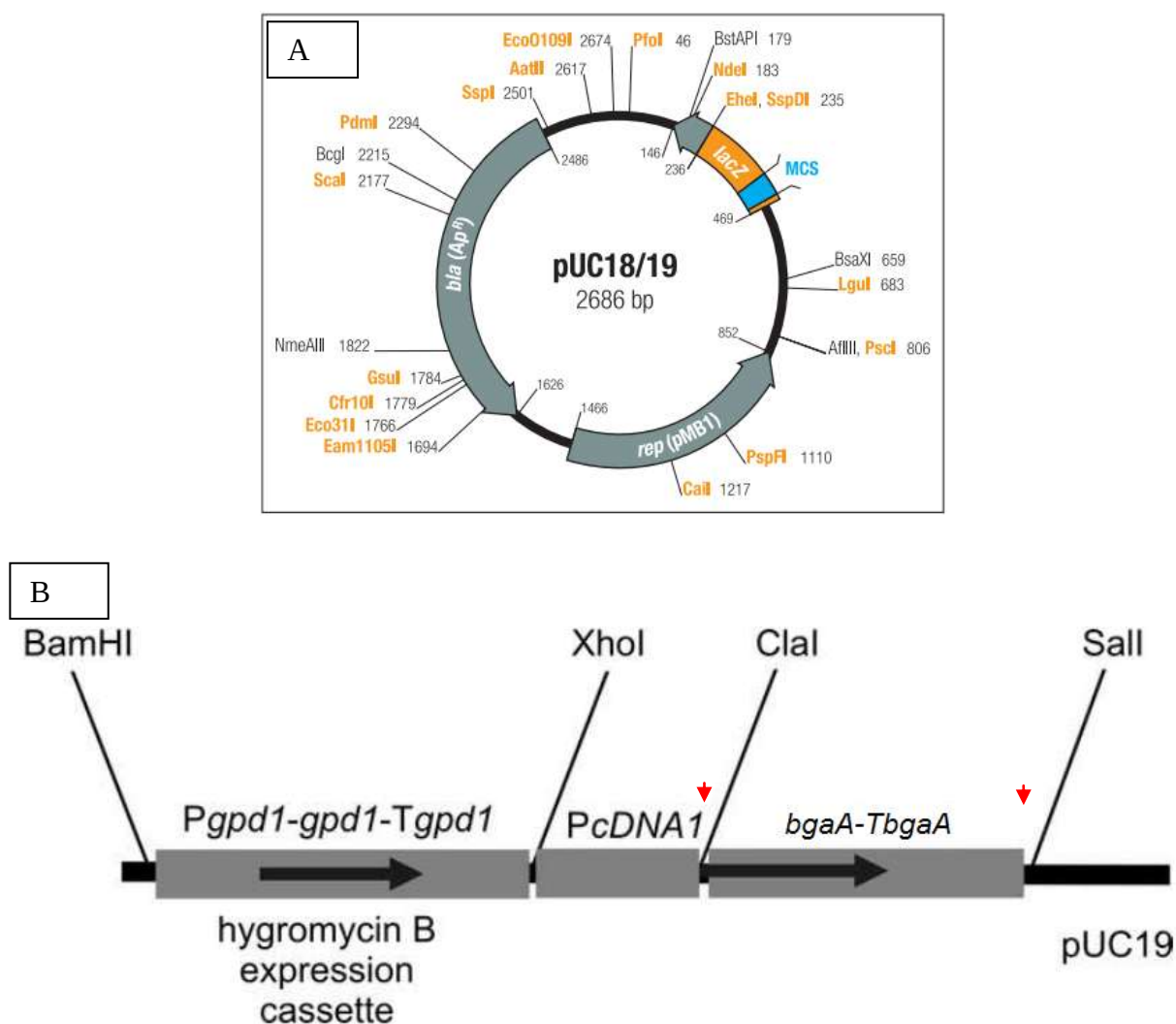
PCR program:

1. szakasz:	elő denaturáció:	95 °C, 2 perc	1×
2. szakasz:	denaturáció:	95 °C, 1 perc	30× mérete (kb)× 1perc/kb
	primer tapadás:	55 °C, 1 perc	
	láncosszabbítás:	72 °C, ~fragment	
3. szakasz:	végso láncosszabbítás:	72 °C, 10 perc	1×

1,5 %-os agaróz gélen futtattuk a mintákat.

3.6 *BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 plazmidok készítése

Az eredeti pUC19 vektor ampicillin rezisztencia gént tartalmaz (5/A ábra). A Vienna University of Technology, Institute of Chemical Engineering, Research Division Biotechnology and Microbiology biztosította rendelkezésünkre a módosított pUC19 vektort, amely higromicin B rezisztencia gént és cDNA1 promótert tartalmaz (5/B ábra).



5. ábra (A) puc18/19 vektor térképe, (B) módosított pUC19 vektor.

pUC19 vektor emésztése (5/B. ábra): 2 μ l *Cl*AI restrikciós enzimet, 2 μ l *Sa*II restrikciós enzimet, 40 μ l módosított pUC19 plazmidot, 10 μ l puffert és 46 μ l molekuláris biológiai vizet mértünk össze egy steril eppendorfba, és 37 °C-on 3 órán keresztül emésztettük a plazmidot PCR készülékben.

A Clontech online alkalmazása segítségével terveztük meg a ligáláshoz szükséges primereket.
(http://www.clontech.com/xxclt_onlineToolsLoad.jsp?citemId=http://bioinfo.clontech.com/in-fusion/convertPcrPrimersInit.do&xxheight=750)

BgaA-cDNA1-gpd-pUC19

fúziós primer 1: **CAACTTCTCTCATCGAT**TTATGAAGCTCTCGTCCTCT

fúziós primer 2: **ATGCCTGCAGGTCGAC**GACGGGATTGAGATTGTTGT

***BgaA* –cDNA1-gpd-pUC19 klónozó diagramja**

***BgaA* PCR termék**

pcr(+)

CAACTTCTCTCATCGATTTATGAAGCTCTCGTCCTCT....ACAACAATCTCAATCCCGTC**GTCGACCTGCAGGCAT**

pcr(-)

GTTGAAGAGAGTAGCTAAATACTTCGAGAGCAGGAGA....TGTTGTTAGAGTTAGGGCAG**CAGCTGGACGTCCGTA**

Linearizált cDNA1-gpd-pUC19 vektor

vec(+) ...TTGATCAATCCAACAACCTTCTCTC**AT.TCGAC**CTGCAGGCATGCAAGCTTGGC...

vec(-) ...AACTAGTTAGGTTGTTGAAGAGAG**TAGC.G**GACGTCCGTACGTTCGAACCG...

***BgaA* PCR termék és a linearizált cDNA1-gpd-pUC19 vektorannelálása**

pcr(+) **CAACTTCTCTCATCGAT**TTATGAAGCTCTCGTCCTCT....ACAACAATCTCAATCCCGTC**G**

vec(+) ...TTTTGATCAATCCAA||||||| **TCGAC**CTGCAGGCATGCAAGCTTGGC...

vec(-) ...AACTAGTTAGGTTGTTGAAGAGAG**TAGC** |||||CGTTCGAACCGCATT...

pcr(-)

TAAAATACTTCGAGAGCAGGAGA....TGTTGTTAGAGTTAGGGCAG**CAGCTGGACGTCCGTA**

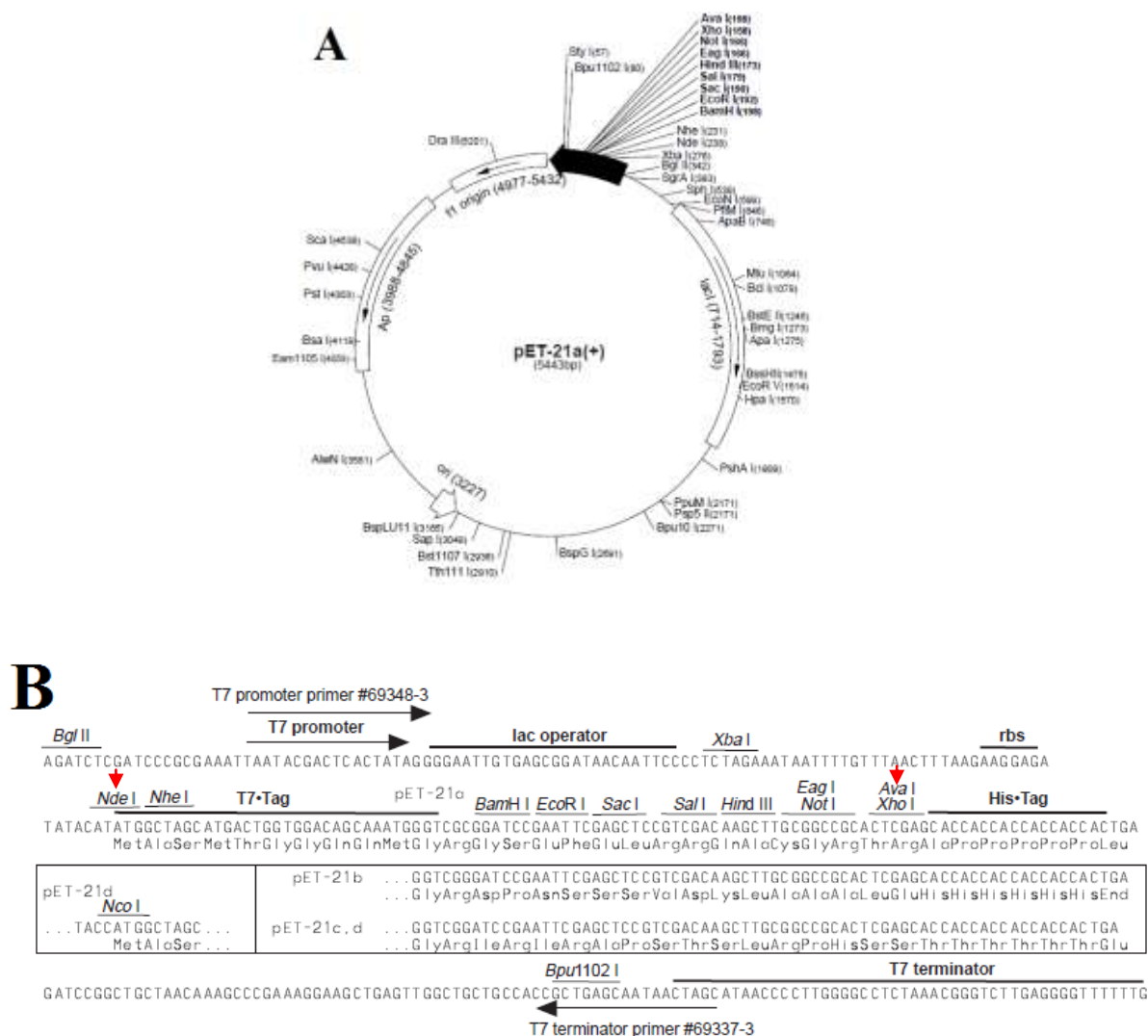
1 µl polimeráz, 5 µl forward primer, 5 µl reverz primer, 10 µl puffer, 1 µl dNTP mix, 3 µl templát DNS és 25 µl molekuláris biológiai víz oldatát egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

In-Fusion HD Cloning Kitet (Clontech) használtunk a ligáláshoz. 2 µl Cloning Enhancert és 5 µl kezelt DNS-t mértünk össze egy steril eppendorba, 15 percig 37 °C-on,

majd 15 percig 80 °C-on inkubáltuk az elegyet. Ezt követően 2 µl Fusion HD enzimet és 1 µl vágott módosított pUC19 vektort adtunk hozzá, és 15 percig 50 °C-on tartottuk.

3.7 *BgaD*-pET21a és *bgaE*-pET21a plazmidok készítése

A pET21 vektor N-terminálisan T7-tag régiót és C-terminálisan 6×His régiókat tartalmaz. Szelekciós markere ampicillin (6/A. ábra).



6. ábra (A) pET21a vektor térképe, (B) pET21 vektor klónozó régiói.

PET21a vektor emésztése (6/B. ábra): 2 µl XhoI restrikciós enzimet, 2 µl NdeI restrikciós enzimet, 40 µl pET21a plazmidot, 10 µl puffert és 46 µl molekuláris biológiai vizet mértünk össze egy steril eppendorfba, és 37 °C-on 3 órán keresztül emésztettük a plazmidot PCR készülékben.

A Clontech online alkalmazása segítségével terveztük meg a ligáláshoz szükséges primereket.
(http://www.clontech.com/xxclt_onlineToolsLoad.jsp?citemId=http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do&xxheight=750)

BgaD-pET21a

fúziós primer 1: **AAGGAGATATACATATG**ATGCAGGCCGATCCCAAATG

fúziós primer 2: **GGTGGTGGTGCTCGAG**TCTTCACAAAGAAACAGGCT

BgaD-pET21a klónozó diagramja:

BgaD PCR termék

pcr(+)

AAGGAGATATACATATGATGCAGGCCGATCCCAAATG...AGCCTGTTTCTTTGTGAAGAC**TCGAGCACCACCACC**

pcr(-)

TTCTCTATATGTATACTACGTCCGGCTAGGGTTTAC....TCGGACAAAGAAACACTTCT**GAGCTCGTGGTGGTGG**

Linearizált pET21a vektor

vec(+) ...GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA**CA.TCGAG**CACCACCACCACCACCCTGA...

vec(-) ... CAAATTGAAATTCTTCCTCTATAT**GTAT.CGTGGTGGTGGTGGTGGT**GACT...

A bgaD PCR termék és a linearizált pET21a plazmidannelálása

pcr(+) **AAGGAGATATACATATG**ATGCAGGCCGATCCCAAATG....AGCCTGTTTCTTTGTGAAGAC

vec(+) ...TTGTTTAACTTTAAG||||||| **TCGAG**CACCACCACCACCACCCTGA...

vec(-) ...CAAATTGAAATTCTTCCTCTATAT**GTAT** |||||TGGTGGTGGTGGTGGTGGTACTCTAG...

pcr(-) **ACTACGTCCGGCTAGGGTTTAC**....TCGGACAAAGAAACACTTCT**GAGCTCGTGGTGGTGG**

BgaE-pET21a

fúziós primer 1: **GGTGGTGGTGCTCGAG**ATGACAGCATCCTATCCCCG

fúziós primer 2: **AAGGAGATATACATATG**GACCTAACGATGCACGACAT

BgaE-pET21a klónozó diagramja

BgaE PCR termék

pcr(+)

GGTGGTGGTGGCTCGAGATGACAGCATCCTATCCCCG....ATGTCGTGCATCGTTAGGTCATATGTATATCTCCTT

pcr(-)

CCACCACCACGAGCTCTACTGTCGTAGGATAGGGGC....TACAGCACGTAGCAATCCAGGTATACATATAGAGGAA

Linearizált pET21a vektor

vec(+)...GATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC.TATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAA...

vec(-)...CTAGAGTCACCACCACCACCACCACGAGCT.ACATATAGAGGAAGAATTTCAATT...

A *bgaE* PCR termék és a linearizált pET21a plazmid annelálása

pcr(+)
GGTGGTGGTGGCTCGAGATGACAGCATCCTATCCCCG....ATGTCGTGCATCGTTAGGTCCTCA

vec(+)...GATCTCAGTGGTGGT|||||||TATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAA...

vec(-)...CTAGAGTCACCACCACCACCACCACGAGCT|||||||GAATTTCAATTTGTT...

pcr(-)
CTACTGTCGTAGGATAGGGGC....TACAGCACGTAGCAATCCAGGTATACATATAGAGGAA

1 µl polimeráz, 5 µl forward primer, 5 µl reverz primer, 10 µl puffer, 1 µl dNTP mix, 3 µl templát cDNS és 25 µl molekuláris biológiai víz oldatát egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

In-Fusion HD Cloning Kitet (Clontech) használtunk a ligáláshoz. 2 µl Cloning Enhancert és 5 µl kezelt cDNS-t mértünk össze egy steril eppendorba, 15 percig 37 °C-on, majd 15 percig 80 °C-on inkubáltuk az elegyet. Ezt követően 2 µl Fusion HD enzimet és 1 µl vágott pET21a vektort adtunk hozzá, és 15 percig 50 °C-on tartottuk.

3.8 Transzformálás *E. coli*-ba

Az előkészített kompetens *E. coli* sejtekhez 3-4 µl vágatlan plazmidot pipettáztunk. Ezt követően óvatosan összeráztuk (megpöcköltük az eppendorfot), majd 25 percre jégre, 1,5 percre, 42 °C-os előmelegített fűtőbe, aztán újra 2 percre jégre helyeztük. A termékünkhöz 200 µl folyékony LB táptalajt adtunk és 60 percig 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubálást követően a transzformált sejteket antibiotikumot (*E. coli* DH5α esetén 100 µg/ml ampicillin, *E. coli* Rosetta (DE3) esetén 100 µg/ml ampicillin és 34 µg/ml kloramfenikol) tartalmazó 1,5 %-os LB agar tpt-ra szélesztettük, 37 °C-on overnight növesztettük. Másnap a lesterilezett

félkémcsővekbe 5 ml antibiotikum tartalmú folyékony LB tpt-t adagoltunk, amelyeket 1-1 fehér teleppel leoltottunk. A leoltott kémcsöveket overnight rázattuk 200 rpm-en, 37 °C-on.

A felszaporított *E. coli* sejtekből másnap reggel plazmidot izoláltunk. A bGal génekre tervezett primerek segítségével ellenőriztük, hogy a megfelelő plazmid került a kompetens sejtekbe.

BgaA génre tervezett primerek:

*bgaA*forw: AACTCTGCCTACAACACTACTG from 2043 20 mer GC: 9 52.91 °C

*bgaA*rev: TCTCATACTTAGGCTGGTC from 3342 19 mer GC: 9 48.48 °C

1300 bp

BgaD génre tervezett primerek:

*bgaD*forw: ACGGTAGAGAGCAACAGCC 19 mer from 796 GC: 11 56.88 °C

*bgaD*rev: GAGACCATCCATCACAAACG 20 mer from 1875 GC: 10 54.96 °C

1080 bp

BgaE génre tervezett primerek:

*bgaE*forw: CTCTCTAAACTGGAACACC 19 mer from 39 GC:9 52.56 °C

*bgaE*rev: TCCAGACTCCATCAACAC 18 mer from 847 GC:9 52.18 °C

809 bp

PCR reakció:

1. szakasz:	elő denaturáció:	95 °C, 2 perc	1×
2. szakasz:	denaturáció:	95 °C, 1 perc	30×
	primer tapadás:	55-60 °C, 1 perc	
	lánchosszabbítás:	72 °C, 1-1,5 perc	
3. szakasz:	végző lánchosszabbítás:	72 °C, 10 perc	1×

1,5 %-os agaróz gélen futtattuk a mintákat.

3.9 Transzformálás *Trichoderma reesei* $\Delta xyr1$ -be

Lab M gyártmányú MEX agaron (30 g/L malt extrakt, 5 g/L pepton, 15 g/L agar), 3,5-4 napos Petri-csészén frissen spórázott telepeket használtunk. 15 ml spóramosóval feldörzsöltük a spórákat, üveggyapotos szűrőn szűrtük. 15 db MEX agaros Petri-csészékre méretre vágott, steril celofánokat helyeztünk. 150 μ l spóraoldatot üvegbottal szétkentünk buborékmentesen a celofánokon, majd over night (18 órát), 30 °C-on növesztettük. *Tichoderma harzianum*, Sigma L-1412 lízis enzimből és A-oldatból (0,1 M KH_2PO_4 , 1,2 M szorbitol, pH=5,6) 5 mg/ml lízis enzim oldatot készítettünk. Egy Petri-csészébe 2-3 ml lízis enzim oldatot pipettáztunk, majd ráhelyeztünk egy celofánt, újból 2 ml lízis enzim oldatot, majd celofánt és így tovább. Minden celofánt a lízis enzim oldat beborított. 90 percig, 30 °C-on inkubáltuk a sejteket, 15 percenként óvatosan megmozgattuk, hogy a sejtfalemésztes sikeresebb legyen. A celofánokról áztatás, csipesz és levágott hegyű pipetta segítségével a micéliumot eltávolítottuk. Jégen, üveggyapotos szűrőn szűrtük egy steril 50 ml-es Falcon csőbe, 5 ml hideg A-oldattal mostuk az üveggyapotot. 10 percig 4 °C-on 2000 rpm-en kilengő fejes rotorral cetrifugáltuk, a felülúszót óvatosan eltávolítottuk és 4 ml hideg B-oldatban (50 mM CaCl_2 , 1 M szorbitol, 1 M Tris-HCl, pH=7,5) felszuszpendáltuk a protoplasztokat. 10 percig 4 °C-on 2000 rpm-en kilengő fejes rotorral cetrifugáltuk, a felülúszót óvatosan eltávolítottuk, hogy a végén 0,5-1 ml protoplaszt oldat maradjon a Falcon csőben. Továbbra is jégen 10 μ l tisztított *bgaA*-módosított pUC19 plazmidot, 200 μ l protoplaszt szuszpenziót és 50 μ l PEG-oldatot (25 % PEG 6000, 50 mM CaCl_2 , 1 M Tris-HCl, pH=7,5) egy 15 ml-es steril Falcon csőbe mértük és 20 percig jégen tartottuk. 2 ml PEG oldatot adtunk a szuszpenzióhoz és pipettával felszuszpendáltuk, 5 percig 20 °C-on inkubáltuk. 4 ml B-oldatot adunk ismét és óvatosan elkevertük. Alsóagart (3 % MEX, 2 % agar-agar Noble, 1 M szorbitol, 50 μ g/ml higromicin) vékonyan rétegeztük a Petri-csészékbe (10 db). 49 °C-os 4-5 ml felsőagart (3 % MEX, 0,9 % agaróz, 1 M szorbitol, 50 μ g/ml higromicin) mértünk a szétmért 0,5-0,5 ml protoplasztokat tartalmazó oldatához, óvatosan összeráztuk és az alsóagarokra öntöttük. kb. 3 nap után 42 db telepet oltottunk át 50 μ g/ml higromicin-t tartalmazó kis szelekciós MEX-es Petri-csészékre. Az átoltást 3-szor végeztük el.

A MEX-es Petri-csészén nőtt micéliumból egy kis spatulányit 600 μ l PL1-et (Macherey-Nagel, Genomic DNA from plant kit) tartalmazó MagNA Lyser-es oszlopokba tettünk, és 45 s-ig 5000-es sebességen feltártuk a sejteket. 5 percig 11000 g-én centrifugáltuk és a kit segítségével genomi DNS-t izoláltunk. A feltárt mintákat 1,5 %-os agaróz gélen

futtattuk, és döntöttük el a sáv intenzitásából hogy $1-10 \times$ hígítást készítsünk-e a PCR-hez. A PCR-t fentebb leírtak szerint hajtottuk végre.

4 Eredmények

4.1 *BgaA* gén izolálása

P. chrysogenum NRRL1951 (vad típus) törzset növesztettünk galaktóz tartalmú minimál táptalajon, majd genomi DNS-t izoláltunk belőle, RNase-os emésztéssel a maradék RNS-t elbontottuk, a DNS-t megtisztítottuk. 1,5 %-os agaróz gélen ellenőriztük az izolálás sikerességét. PCR segítségével szintetizáltuk a *bgaA* gént és 622 bp nagyságú terminátor régióját (összesen kalkulált: 3986 bp). A mintát 1,5 %-os agaróz gélen megfuttatva egy 4 kb nagyságú fragment szaporodott fel.

4.2 *BgaD* és *bgaE* gének cDNS-ének izolálása

P. chrysogenum NRRL1951 (vad típus) törzset növesztettünk galaktóz tartalmú minimál táptalajon, hogy a karbon katabolit represszió alatt álló gének (bGal-ok) is kifejeződjenek. 40 órás korban totál RNS-t izoláltunk a tenyészetből, DNase-os emésztéssel a maradék genomi DNS elbontottuk, az RNS megtisztítottuk. Az RNS minták futtatása után két erőteljes RNS csíkot kaptunk (18S és 23S rRNS), közöttük pedig enyhe sáv mutatta az mRNS-t. Az RNS-ből reverztranszkriptáz PCR (RT-PCR) technika segítségével a *bgaD* és a *bgaE* gének komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltuk. 1,5 %-os agaróz gélen megfuttatva a mintákat a *bgaD* gén esetén egy kb 3 kbp (kalkulált: 3135 bp) és a *bgaE* gén esetén egy kb 2 kbp (kalkulált: 2007 bp) nagyságú fragment szaporodott fel a PCR reakció során.

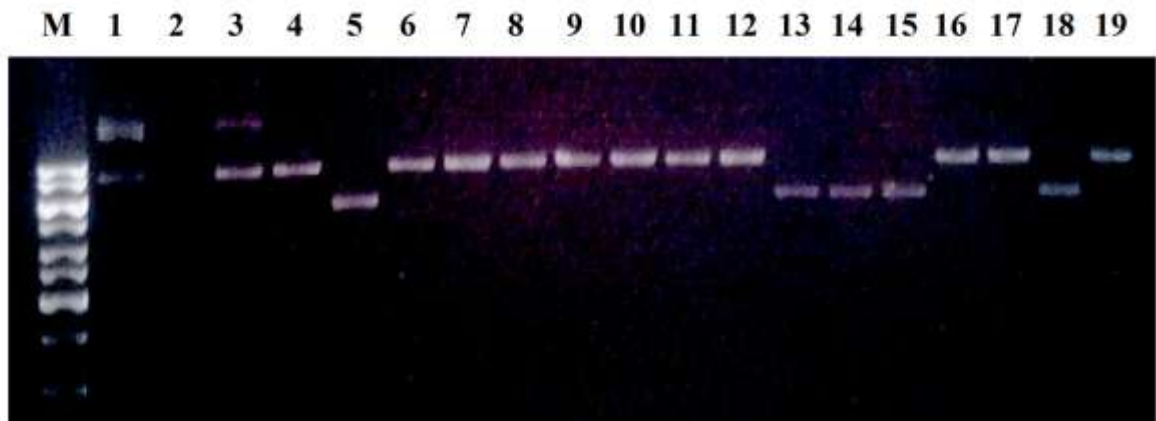
4.3 *BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid előállítása

A gének beviteléhez módosított pUC19 expressziós vektorrendszert alkalmaztunk. CDNAI promótert (konstitutív) és higromicin rezisztencia gént (*T. reesei* transzformáció szelekciós markere) tartalmaz a vektor eredeti felépítésén felül. A módosítatlan pUC19 plazmid szelekciós markere ampicillin. A vektor multi cutting site (MCS) régióját ClaI és SalI restriktációs enzimekkel emésztettük. A kezelt *bgaA* gént az emésztett vektorhoz ligáltuk.

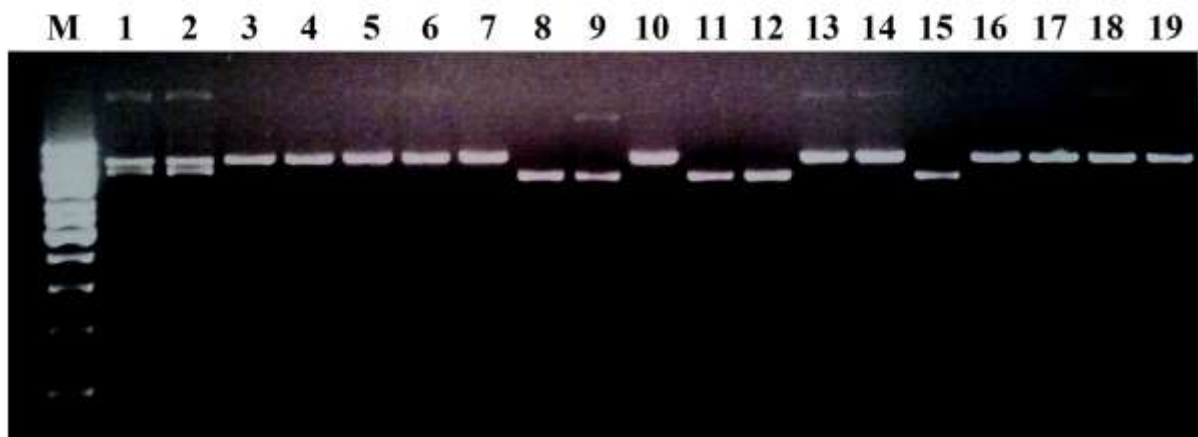
4.4 *BgaD*-pET21a és *bgaE*-pET21a expressziós plazmidok előállítása

A gének beviteléhez pET21a expressziós vektorrendszert alkalmaztunk. A pET21 vektor N-terminálisan T7-tag régiót és C-terminálisan 6×His régiókat tartalmaz. Szelekciós markere ampicillin. A vektor multi cutting site (MCS) régióját XhoI és NdeI restrikciós enzimekkel emésztettük. A kezelt *bgaD* és a *bgaE* gén cDNS-ét az emésztett vektorhoz ligáltuk.

A



B

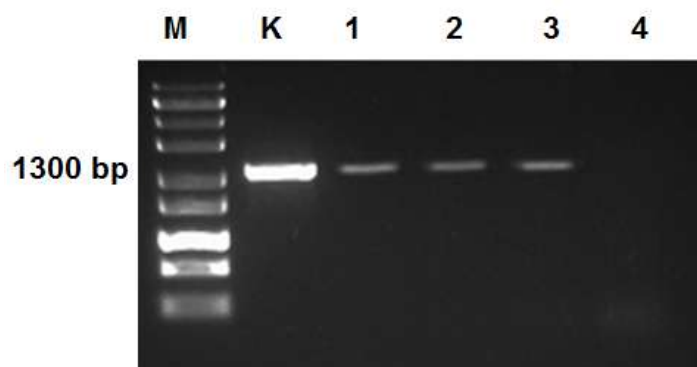


7. ábra Ligálás ellenőrzése gélelektroforézissel. M: marker; 12/A: *bgaD*-pET21a plazmid ellenőrzése. Sikeresen ligált plazmidok: 1, 3, 4, 6-12, 16, 17, 19. 12/B: *bgaE*-pET21a plazmid ellenőrzése. Sikeresen ligált plazmidok: 1-7, 10, 13, 14, 16-19

4.5 *BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid *Trichoderma reesei*

Δ xyr1-be való transzformálása

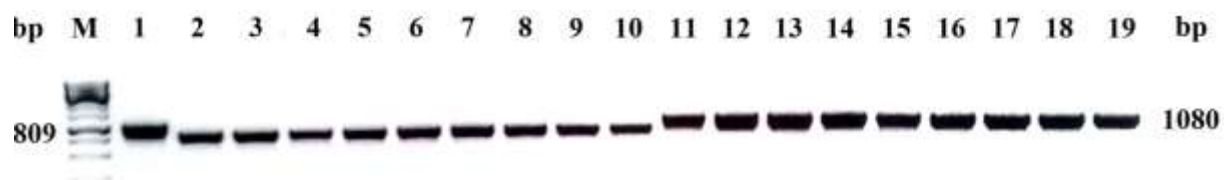
A *BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmidot *E. coli* DH5 α sejtbe transzformáltuk. A transzformálás után a sejtekből plazmidot izoláltunk, majd a génekre tervezett primerekkel PCR-rel ellenőriztük, hogy a ligált plazmid került a kompetens sejtekbe. A plazmid oldatot kb 5 $\times$ töménységűre töményítettük. *T. reesei* Δ xyr1 törzsbe juttattuk a *bgaA* gént tartalmazó plazmidot, 42 db telep nőtt ki, amiket háromszor átoltottunk. A telepek a higromicint tartalmazó táptalajon nem spóráztak. 4 telepről DNS izoláltunk, majd PCR-rel ellenőriztük, hogy a telepek tartalmazzák-e a *bgaA* gént. Ahogy a **8. ábrán** látható, hogy több mutáns is tartalmazta a célgént.



8. ábra Transzformálás ellenőrzése PCR-rel. M: marker, K: kontrol (*BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid), 1-4 izolált mutánsok

4.6 *BgaD*-pET21a és *bgaE*-pET21a expressziós plazmidok kompetens sejtekbe való transzformálása

A *bgaD*- és *bgaE*-pET21a plazmidokat *E. coli* Rosetta (DE3) törzsekbe transzformáltuk. A transzformálás után a sejtekből plazmidot izoláltunk, majd a génekre tervezett primerekkel PCR-rel ellenőriztük, hogy a ligált plazmid került a kompetens sejtekbe (**9. ábra**).



9. ábra Transzfórmálás ellenőrzése PCR segítségével. M: Marker, 1-10 *bgaE* génszakasza (809 bp); 11-19: *bgaD* génszakasza (1080bp)

5 Összefoglalás

A kutatómunkánk során a β -galaktozidáz enzimek jelentősége miatt, a *Penicillium chrysogenum* feltételezhetően intracelluláris β -galaktozidázokat kódoló géneket (*bgaD* és *bgaE*) tanulmányozzuk.

A *P. chrysogenum* vad típusú törzsét galaktóz tartalmú minimál táptalajon növesztettünk, hogy a karbon katabolit represszió alatt álló gének (bGal-ok) is kifejeződjenek. 40 óras korban totál RNS-t és genomi DNS-t izoláltunk a tenyészetből. A genomi DNS-ből PCR segítségével a *bgaA* gént, RNS-ből reverztranszkriptáz PCR (RT-PCR) technika segítségével a *bgaD* és *bgaE* gének intron mentes, komplementer DNS-ét (cDNS) szintetizáltuk. Ezt követően a módosított pUC19-*bgaA* és pET21-*bgaD/bgaE* rendszerekre tervezett primerekkel kezeltük a PCR termékeket. A módosított pUC19-*bgaA* plazmidot *E. coli* DH5 α sejtbe transzformáltuk, majd plazmidot izoláltunk belőle. A *bgaA* gént tartalmazó nagy töménységű plazmidot sikeresen *Trichoderma reesei* Δ xyr1 törzsbe juttattuk.

A pET21 vektor N-terminálisan T7-tag régiót és C-terminálisan 6 $\times$ His régiókat tartalmaz. Szelekciós markere ampicillin. A vektor MCS régióját XhoI és NdeI restriktációs enzimekkel emésztettük. A kezelt *bgaD* és a *bgaE* gén cDNS-ét az emésztett vektorhoz ligáltuk. A *bgaD*- és *bgaE*-pET21a plazmidokat *E. coli* Rosetta (DE3) törzsbe transzformáltuk.

A kutatás következő részében szeretnénk a módosított pUC19-*bgaA* plazmidot tartalmazó *Trichoderma reesei* Δ xyr1, és a *bgaD*- és *bgaE*-pET21a plazmidokat tartalmazó *E. coli* Rosetta (DE3) törzsek fehérje expressziós tulajdonságait vizsgálni, a célfehérjéket tisztán izolálni, majd a biokémiai/enzimológiai tulajdonságaikat meghatározni.

6 Irodalomjegyzék

1. Johansen AG, Vegarud GE, Skeie S (2002): Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutchtype cheeses. *International Dairy J.*, **12**: 621-629
2. Roelfsema WA, Kuster FM, Pluim H (1990): Lactose and derivatives. Elvers B, Hawkins S, Schulz G (eds) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 4th ed. 107-114
3. Mlichová Z, Rosenberg M (2006): Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J. Food and Nutr. R.* **45**: 47-54
4. Heyman MB, Committee On, N. (2006): Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics* **118**(3): 1279–1286
5. Pribila BA, Hertzler SR, Martin BR, Weaver CM, Savaiano DA (2000). Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. *J. American Diet. Association* **100** (5): 524–8
6. Bulhões AC, Goldani HAS, Oliveira FS, Matte US, Mazzuca RB, Silveira TR, (2007). Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian J. Med. and Bio. Research* **40** (11): 1441–6
7. McNeil-PPC, Inc. Composition and method for lactose hydrolysis. Inventors: Eisenhardt, P. F. - Smith, L. P. Int. Cl.: A61K 038/47. United States Patent, 6 562 339. 2003-05-13.
8. Jónás Á, Fekete E, Flippin M, Sándor E, Molnár ÁP, Karaffa L (2013) Lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Lake Balaton, Hungary, előadás
9. Fleming A (1929): On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenza. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**: 226–236
10. Raper KB, Alexander DF, Coghill RD (1944): Penicillin II. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bacteriol.* **48**: 639–659
11. Elander RP (1983): Strain improvement and preservation of beta-lactam producing microorganisms, in Antibiotics Containing the Beta-lactam Structure I (Demain, A. L., and Solomon, N., eds) 97–146, Springer-Verlag, New York

12. Elander RP (2002): University of Wisconsin contributions to the early development of penicillin and cephalosporin antibiotics. *SIM News* **52**: 270–278
13. Demain AL, Elander RP. (1999): The β -lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie Leeuwenhoek* **75**: 5–19
14. Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF (2010): Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*. *Mol. & Cell. Prot.* **9.6**: 1182-83
15. Soltero FV, Johnson MJ (1953): Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. *Appl. Microbiol.* **1**: 52-57
16. Martín JF, Revilla G, Zanca DM, Lopez-Nieto M (1982): Carbon catabolite regulation of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Trends in Antibiotic Res.* **32**: 258-268
17. Matsumura M, Imanaka T, Yoshida T, Taguchi H (1978): Effect of glucose and methionine consumption rates on cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. *J. Ferm. Technol.* **56**: 345-353
18. Soltero FV, Johnson MJ (1954): Continuous addition of glucose for evaluation of penicillin-producing cultures. *Appl. Microbiol.* **2**: 41-44
19. Espeso EA, Tilbum T, Arst HN, Penalva MA (1993): pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-3956
20. Shuster CW, Doudoroff M (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* **59**: 279-86
21. Chassy BM, Thompson J (1983): Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **154**: 1204-1214
22. Diaz M, Pedregosa AM, de Lucas JR, Torralba S, Monistrol IF, Laborda F (1996): Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. *Microbiologia* **12**: 585-592
23. Nikolaev IV, Vienzski YP (1998): L-arabinose induces synthesis of secreted β -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochem. (Moscow)* **63**: 1294-1298

24. Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biró S (2001): Carbon source regulation of beta-galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol* **41**: 351-362
25. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biró S (2001): Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*. production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* **21**: 24-29
26. Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003): Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 43885-43888
27. Gross KC, Pharr DM (1982): A potential pathway for galactose metabolism *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species. *Plant. Physiol.* **69**: 117-121
28. Nicholas S, Argyres NS, Liebeskind JP (2002): Governance inseparability and the evolution of US biotechnology industry. *Journal of Economic Behavior & Organization* **47**: 197-219
29. Tőzsér J, Emri T, Csősz É, Tőzsér J (2011): Fehérjebiotechnológia, Debreceni Egyetem, online egyetemi jegyzet
30. Cherry JR, Fidantsef AL (2003): Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* **14 (4)**: 438-443
31. Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B (2009): Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* **2**: 19
32. Carle-Urioste JC, Escobar-Vera J, El-Gogary S, Henrique-Silva F, Torigoi E, Crivellaro O, Herrera-Estrella A, El-Dorri H (1997): Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J Biol Chem* **272 (15)**: 10169-10174
33. Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Würleitner E, Mach RL (2006): Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell* **5 (12)**: 2128-2137
34. Novy R, Morris (2001): Use of glucose to control basal expression in the pET System. *inNovations* **13**: 8-10
35. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130

36. Grodberg J, Dunn JJ (1988): *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245–53
37. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J (1997): The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**: 15661–15667
38. Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989): High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**: 109–114
39. Kane JF (1995): Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494–500
40. Kurland C, Gallant J (1996): Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 489–93
41. Novagen (2006): PET system manual, 11th edition