



A *Penicillium chrysogenum* fonalas gombából izolált intra- és extracelluláris β -galaktozidáz génjeinek túltermeltetése és az enzimek biokémiai jellemzése

Diplomadolgozat

Készítette: Kulcsár László II. Biomérnök MSc

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 köszönöm témavezetőimnek Dr. Karaffa Levente tanszékvezető egyetemi docensnek és Dr. Fekete Erzsébet tanszékvezető-helyettes egyetemi docensnek, hogy munkámat állandó figyelemmel kísérték és segítségökre mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom Kun Roland és Fülöp Katalin Bsc hallgatóknak és Kovácsné Orosz Anita és Vasasné Jónás Ágota PhD hallgatóknak a munkám során nyújtott hasznos tanácsaikért, és baráti támogatásukért.

Köszönöm Kertiné Somosi Rita technikusnak a diplomamunkám elkészítése során nyújtott segítségét.

Hatalmas hálával tartozom szüleimnek, akik mérhetetlenül sokat segítettek nekem. Köszönöm barátnőm sok türelmét és segítségét.

A kutatás 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	5
2	Irodalmi áttekintés.....	7
2.1	A penicillin és a <i>Penicillium chrysogenum</i>	7
2.2	Leloir-útvonal és a β -galaktozidázok kapcsolata.....	9
2.3	A fehérjék és a rekombináns DNS technológia	10
2.4	Fehérjék immobilizált fém ion affinitás kromatográfiás tisztítása	13
3	Anyagok és módszerek.....	17
3.1	Genomi DNS izolálás <i>P. chrysogenum</i> NRRL1951 (vad típus) törzsből	17
3.2	RNS izolálás <i>P. chrysogenum</i> NRRL1951 (vad típus) törzsből	17
3.3	DNS agaróz gélelektroforézis	18
3.4	RNS agaróz gélelektroforézis	18
3.5	A <i>bgaA</i> gén, <i>bgaD</i> és a <i>bgaE</i> cDNS-ének szintetizálása	18
3.6	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 plazmidok készítése	20
3.7	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a plazmidok készítése	22
3.8	Transzformálás <i>E. coli</i> -ba	24
3.9	<i>E. coli</i> törzsek tenyésztése	26
3.10	Transzformálás <i>Trichoderma reesei</i> Δ xyr1-be.....	26
3.11	Oszlopkromatográfiás tisztítás	27
3.12	β -galaktozidáz enzimaktivitásának mérése szintetikus ONPG szubsztráttal	28
3.13	Laktóz hidrolízis meghatározása	28
3.14	Fehérjetartalom meghatározása.....	29
3.15	SDS-PAGE.....	29
4	Eredmények.....	31
4.1	<i>BgaA</i> gén izolálása.....	31
4.2	<i>BgaD</i> és <i>bgaE</i> gének cDNS-ének izolálása	31
4.3	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid előállítás.....	31
4.4	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a expressziós plazmidok előállítás.....	32

4.5	<i>BgaA</i> -cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid <i>Trichoderma reesei</i> Δ xyl1-be való transzformálása.....	33
4.6	<i>BgaD</i> -pET21a és <i>bgaE</i> -pET21a expressziós plazmidok kompetens sejtekbe való transzformálása.....	33
4.7	BGAD fehérje tisztítási problémája.....	34
4.8	BGAE fehérje túltermelése és tisztítása.....	36
5	Összefoglalás.....	39
6	Irodalomjegyzék.....	41
7	Függelék.....	46
7.1	ONP kalibrációs egyenes felvétele	46
7.2	Fehérjetartalom kalibrációs egyenes meghatározása	46
7.3	Glucose-oxidase assay kit protokollja, D-glükóz kalibrációs egyenes meghatározása	47

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].

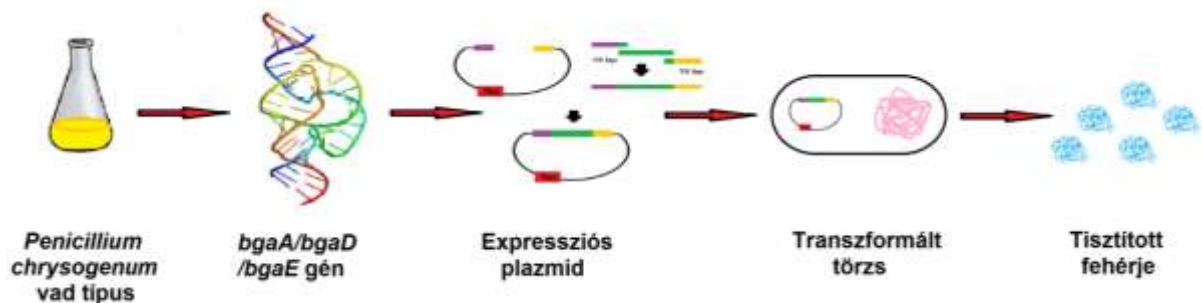
A laktóz érzékenységre megoldás lehet, ha a laktáz enzimet tablettában étkezés előtt pótoljuk, így a tejcukor tartalmú ételek már fogyaszthatók mellékhatások megjelenése nélkül, illetve megoldás lehet a laktóz mentes élelmiszerek előállítása is laktáz enzimek által. Több ilyen típusú gyógyszer/élelmiszer 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 expresszáldott, 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. A törzsekkel a rekombináns enzimeket nagy mennyiségben előállítjuk, tisztítjuk és végül az enzimológiai-biokémia tulajdonságaikat meghatározzuk. Az **1. ábra** foglalja össze a kutatómunka megvalósításának vázlatát.



1. ábra A tervezett munka megvalósítását összefoglaló ábra.

2 Irodalmi áttekintés

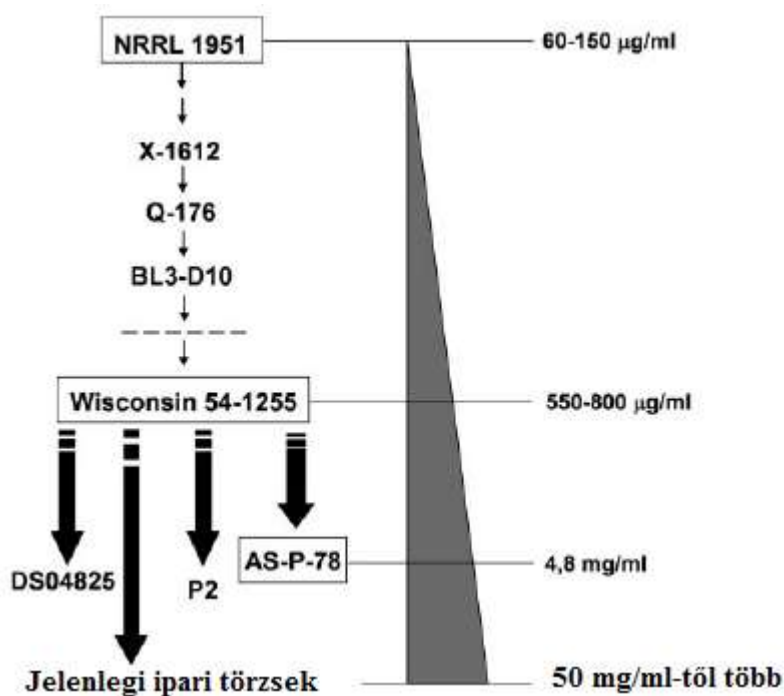
2.1 A penicillin és a *Penicillium chrysogenum*

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 tífuszos 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

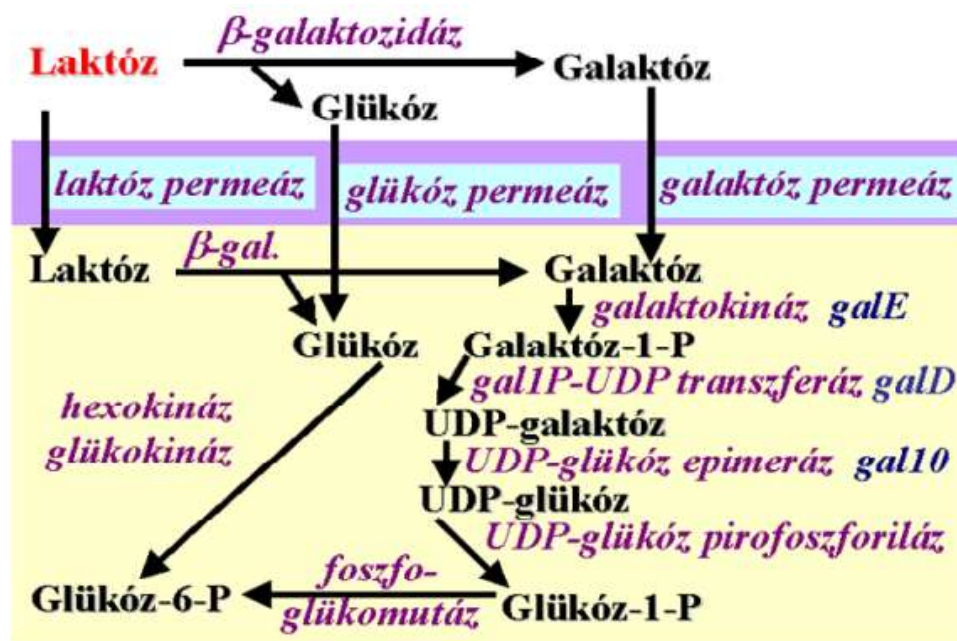
Az *Escherichia coli* laktóz lebontásának szabályozása tankönyvi ismeretnek számít, a baktériumok laktóz lebontása [20, 21] azonban alapvetően különbözik az eukariótákétól. A laktóz lebontás első lépése a D-glükózzá és D-galaktózzá történő hidrolízis, ami vagy az extracelluláris β -galaktozidáz vagy 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

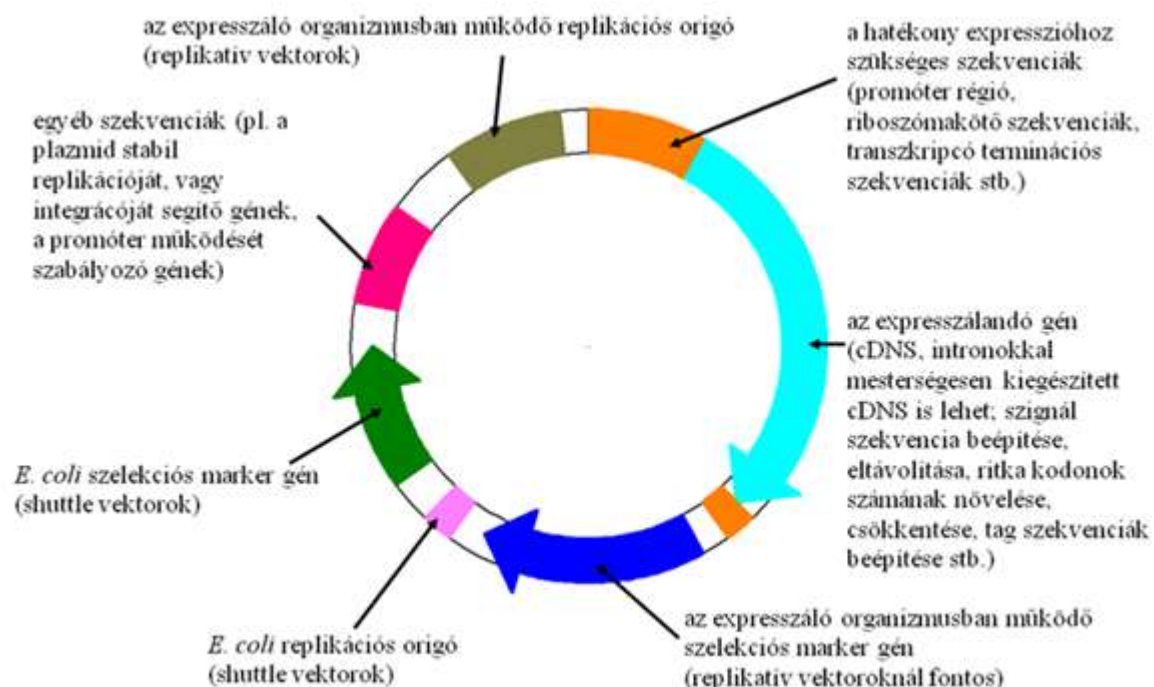
A glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig jellemzően a Leloir-útvonalon alakul tovább [26]. A Leloir-útvonal és a laktáz enzimek kapcsolata a **3. ábrán** látható. A Leloir-útvonal részben a lebontó anyagcsere része, melyben a D-galaktóz szén- és energiaforrásként is hasznosul. A D-galaktóz építőelem 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 expresszálo 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 mosószertipar, 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 expresszálatunk 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].

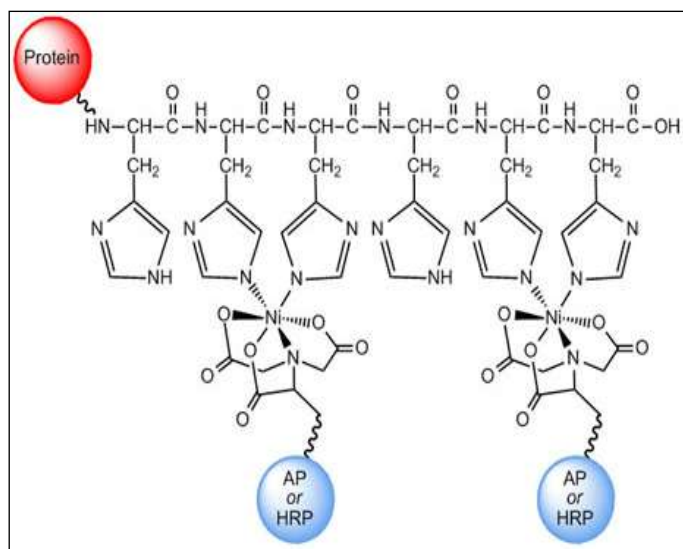
A legtöbb aminosavat több kodon is kódolhat, az élőlényekbe összesen 61 aminosav kodon használatos. Az *E. coli*-ba történő heterológ gén mRNS-ének expressziója során a kodonok használatában különbség lehet, egyes tRNS ritkák lehetnek vagy akár hiányozhatnak is. Ez transzlációs kereteltolódást, a transzláció 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].

2.4 Fehérjék immobilizált fém ion affinitás kromatográfiás tisztítása [42, 43]

Habár jelenleg is számos heterológ expressziós rendszert fejlesztettek ki a kutatók rekombináns fehérje termeltetésére, a tisztítás során mégis gyakran problémákba ütközhetünk. Klasszikus tisztítási módszereket is lehet alkalmazni, habár sokkal egyszerűbb, ha a fúziós fehérjéket tervezünk a modern rekombináns DNS technológiával. Specifikus affín tagot adunk a termelendő proteinhez, ami nagyban megkönnyíti a tisztítását affín kromatográfiás technológiát alkalmazva.

A rekombináns polihisztidin tagot tartalmazó fehérjék tisztítása immobilizált fém ion affinitás kromatográfia (immobilized metal ion affinity chromatography-IMAC) segítségével gyakori módszernek mondható. Először 1975-ben használták fehérjék tisztítására,

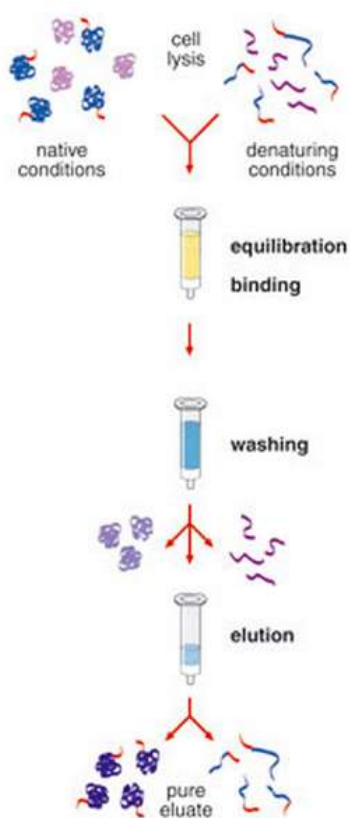


5. ábra A His-tagged fehérje és az immobilizált nikkell kötődésének demonstrációja.

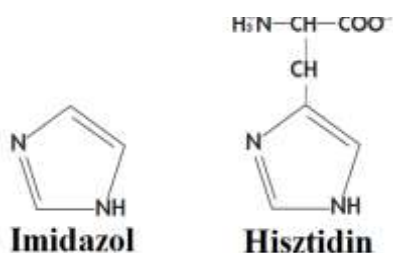
kelátképzőcsoportként iminodiacetsavat (IDA) alkalmaztak [44]. Később több fehérjét sikerült homogén formában kinyerni, ha fémionként Zn^{2+} -et, Cu^{2+} -et vagy Ni^{2+} -t alkalmaztak [45]. Az IDA csupán 3 db fém-kelát kötőhellyel, ezzel szemben a nitrilotriecetsav kelátképző már 4 fém-kelát kötőhellyel rendelkezik. Ennek köszönhetően stabilabban képes megkötni fémionokat, kevesebb az ekvibrálás és a mosás során kioldódó fém mennyisége, a tisztított fehérje oldata is kevesebb szennyező fémot tartalmaz. Fémionként leggyakrabban Ni^{2+} iont használnak. A tisztítandó fehérje polihisztidin tagja és az oszlop Ni^{2+} ionjai kölcsönhatásba lépnek, ez a rekombináns fehérje kötődésének az alapja (5. ábra). Az oszlop mátrixa eliminálja a nem specifikus kölcsönhatásokat a gyanta és a szennyező fehérjék között.

Gyakorlatilag az oszlophoz a rekombináns törzs „szennyező” fehérjéi nem képesek megkötődni, szigorú mosási procedúra nem minden esetben szükséges.

Ha a rekombináns fehérje *E. coli*-ban expresszálódik, elméletileg a cél fehérje oldható formában marad a citoplazmában. Azonban, ha nagyon gyors a fehérje kifejeződése, oldhatatlan aggregátumot képezhet a fehérje, amit zárványtesteknek hívunk. A zárványtest képződését befolyásolja a fehérje tulajdonsága (pl.: kénhidak száma), maga a törzs és a fehérje expresszió sebessége- beleértve a vektor választást, a sejt növekedési és indukciós körülményeit.



6. ábra His-tagged fehérjék tisztulásának sematikus ábrája.



7. ábra Az imidazol és a hisztidin szerkezeti hasonlósága.

Ha gyanakszunk, hogy zárványtestek képződnek, ajánlatos mind a centrifugálás előtti sejteket, a centrifugálás utáni felülúszót és pelletet is megfuttatni egy SDS-PAGE-en. A sejtek tartalmazzák mind az oldható és oldhatatlan formákat, az oldható formákat a felülúszó és az oldhatatlan formákat a pelletek tartalmazzák. Ezt a folyamatot szokás a fehérje oldhatósági vizsgálatának is nevezni.

A bakteriális sejtek feltárását lizozimmal kombinált szonikálással szokták legáltalánosabban megvalósítani. A szétroncsolt sejtek szuszpenziójának centrifugálása után a felülúszóból nyerhetjük ki az oldható fehérjét, miközben a pelletekben az oldhatatlan zárványtestek maradnak vissza. A tiszta felülúszót közvetlenül fel lehet használni natív körülmények közötti tisztításra. A zárványtestekből a célfehérje kioldásához a puffernek nagy mennyiségű denaturáló szert (pl.: 8 M karbamidot vagy 6 M GuHCl-ot) kell tartalmaznia, és denaturáló körülmények között

tisztítható tovább a fehérje. A minta felvitelt és a mosást követően, mint ahogyan az a **6. ábrán** is látszik, a polihisztidin tag nélküli fehérjék nem kötődnek meg az oszlopon.

A hisztidin pK_a értéke körülbelül 6, így protonált állapotba kerül, ha a pH-t 4,5-5,3-ra csökkentjük. Ilyen

körülmények között nem képes a 6×His-tagged fehérje az oszlop mátrixához kötődni. Hasonlóan, ha a hisztidinhez szerkezetileg hasonló imidazolt adunk az oldatba, ez az elúció alapja. Kis térfogatban és nagy koncentrációban nyerhetjük ki így a célfehérjét. (6. és 7. ábra)

Habár csak nagyon ritkán szükséges a tisztított rekombináns fehérje 6×His affín rész eltávolítása, bizonyos esetekben, mint például röntgen krisztallográfiás vagy NMR-es szerkezet analízisnél a mesterségesen hozzáadott rész eltávolítása ajánlatos. Ehhez egy proteáz hasító helyet kell létrehozni a His-tagged rész és a fehérjét kódoló rész között.

Natív körülmények között nagyobb esélye van, hogy a háttér szennyező fehérjék megkötődjenek az oszlopon, mint denaturáló körülmények között, mivel csökkennek a nem specifikus kölcsönhatások is. Hatásosan csökkentheti még a nem specifikus kölcsönhatásokat és így a szennyező fehérjék mennyiségét, ha alacsony koncentrációban imidazolt adunk a lízis és a mosó pufferekhez. A célfehérje kötődése az immobilizált Ni^{2+} -t tartalmazó oszlophoz nem konformáció függő, a legtöbb detergensnek és denaturálószernek nincs rá hatása. A tisztítás során a törzs „szennyező” fehérjei diszulfid kötések keresztül kölcsönhatásba kerülhetnek a célfehérjével, így együtt tisztulhatnak az oszlopon. Ezt a kölcsönhatást csökkentheti, ha alacsony koncentrációban β -merkaptotetanolt adunk a lízis pufferhez. Detergenseknek, például Triton X100, Tween 20 vagy magas só koncentrációnak (maximum 2 M NaCl) nincs hatása a kötődésre, de csökkentheti a nem specifikus kötődést (hidrofób vagy ionos) a mátrixhoz. A nem specifikus kölcsönhatások csökkentésének érdekében legalább 0,3 M-os NaCl koncentrációt tartunk a tisztítás során. Nagyon ritka esetekben a polihisztidin rész nem a natív fehérje felszínén helyezkedik el, így rejtve marad, ilyenkor az oldható fehérjét denaturálni kell az immobilizált Ni^{2+} oszlopon történő tisztítás előtt. Ha a tisztítás csak denaturáló körülmények között lehetséges, és ez nem kívánatos, a probléma a nem kötődő hisztidin részből eredhet. Ezt elkerülhetjük, ha a hisztidin részt a fehérje másik terminusz végén helyezzük el. Bizonyos esetekben a fehérje kofaktort igényel a stabil szerkezet megtartásához, például kalcium, magnézium, kobalt vagy más fém iont.

A polihisztidin tagot tartalmazó fehérjéket natív vagy denaturáló körülmények között tisztíthatjuk. A választás függhet a fehérje elhelyezkedésétől, oldhatóságától, a downstream művelettől, akár a biológiai aktivitás megtartásától is. Ha hatékony renaturáló eljárás szükséges, a denaturáló tisztítást és azt követő refoldingot figyelembe kell venni a döntésnél. A denaturáló körülmények közötti tisztítást használhatjuk közvetlenül, habár gyakran a

renaturálást és a refoldingot nem hagyhatjuk el. A renaturálást és a refoldingot kivitelezhetjük az oszlopon magán az elúció előtt, vagy oldatban is.

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, szemcsementességig 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. Szemcsementességig 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 inihitort, 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

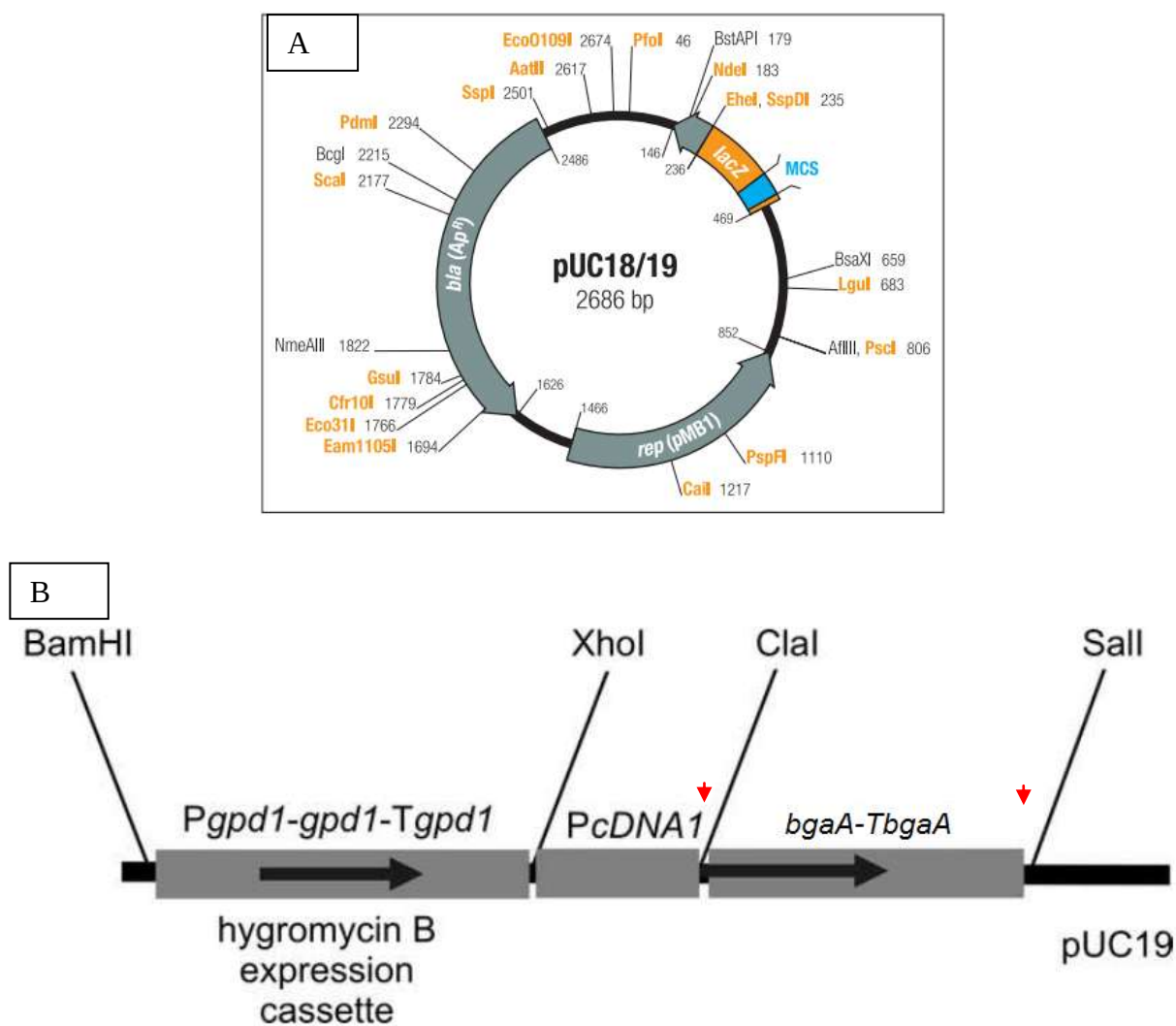
PCR program:

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 (8/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 (8/B ábra).



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

pUC19 vektor emésztése (8/B. ábra): 2 µl ClaI restrikciós enzimet, 2 µl Sall restrikciós enzimet, 40 µl módosított pUC19 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)

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 vektor annelálása**

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

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

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

pcr(-)

TAAAATACTTCGAGAGCAGGAGA....TGTTGTTAGAGTTAGGGCAG**CAGCTGGACGTCCGTA**

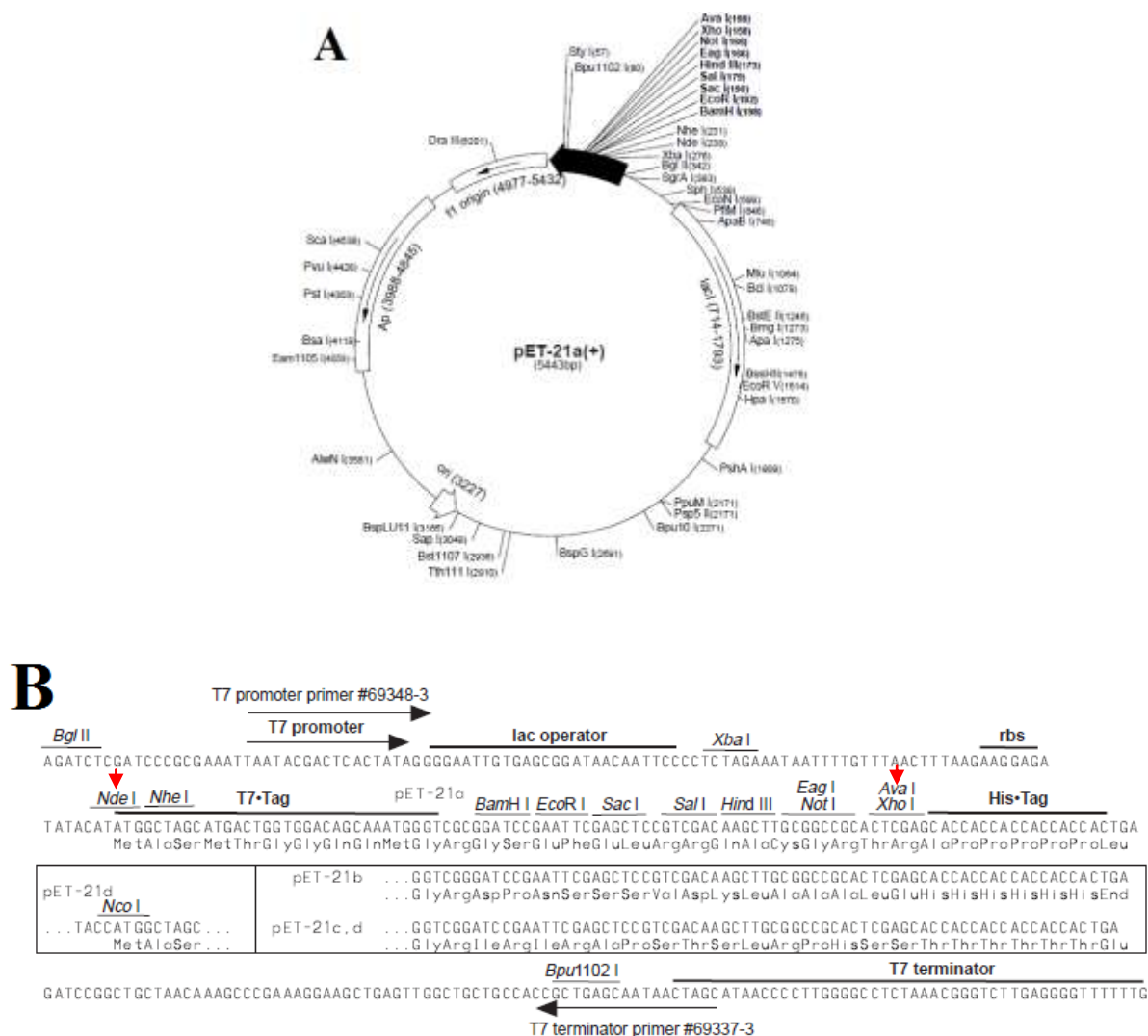
1 µl polimeráz, 5 µl forward primer, 5 µl reverz primer, 10 µl puffer, 1 µl dNTP mix, 3 µl templát DNS és 25 µl molekuláris biológiai víz oldatát egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

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 (9/A. ábra).



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

PET21a vektor emésztése (9/B. ábra): 2 µl *Xho*I restrikciós enzimet, 2 µl *Nde*I 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/in_fusion/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(-) **ACT**ACGTCCGGCTAGGGTTTAC....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(-) C TACTGTCGTAGGATAGGGGC....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	
	láncosszabbítás:	72 °C, 1-1,5 perc	
3. szakasz:	végző láncosszabbítás:	72 °C, 10 perc	1×

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

3.9 *E. coli* törzsek tenyésztése

A glicerinben fagyasztott *E. coli* Rosetta (DE3) sejteket 100 µg/ml ampicillin és 34 µg/ml kloramfenikol tartalmú 1,5 %-os szilárd LB tartalmú Petri-csészékre kentük szét, és egy éjszakán 37 °C-on növesztettük őket (Miller féle Lysogeny broth/Luria Broth (LB) táptalaj összetétele: 10 g/L pepton, 5 g/L élesztőkivonat, 10 g/L NaCl). Másnap délután az egysejtes telepeket 5 ml 100 µg/ml ampicillin és 34 µg/ml kloramfenikol tartalmú folyékony LB tpt.-ba tettük, és 30 °C-on, 200 rpm fordulatszámon növesztettük. A sejtekből 1 ml-t, 100 ml 100 µg/ml ampicillin és 10 mM MgSO₄ tartalmú LB-hez adtunk és 30 °C-on 200 rpm-en addig rázattuk őket, amíg a 600 nm-en mért abszorbancia a 0,5-0,6 értéket el nem érte. Ezt követően 18 °-os vízhűtéses rázógépből 15 percig, 200 rpm-en rázattuk a sejteket, majd 100 µl 1 M IPTG oldatot adtunk a tenyészetekhez, hogy az IPTG végkoncentrációja 1 mM legyen. A lombikok további 22 órát rázattuk 18 °C-on. A sejteket 10 percig 8000 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk; a táptalajt eltávolítottuk, és -25 °C-on tároltuk a sejteket a felhasználásig.

3.10 Transzformálás *Trichoderma reesei* Δ_{xyl1}-be

Lab M gyártmányú MEX agar (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 µl 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 KH₂PO₄, 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 sejtfalemésztés 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 centrifugáltuk, a felülúszót óvatosan eltávolítottuk és 4 ml hideg B-oldatban (50 mM CaCl₂, 1 M szorbitol, 1 M Tris-HCl, pH=7,5) felszuszpendáltuk a protoplasztokat. 10 percig 4 °C-on 2000 rpm-en kilengő fejes rotorral centrifugáltuk, a felülúszót óvatosan eltávolítottuk, hogy a végén 0,5-1 ml protoplaszt oldat maradjon a Falcon csőben. Továbbra is jégen 10 µl

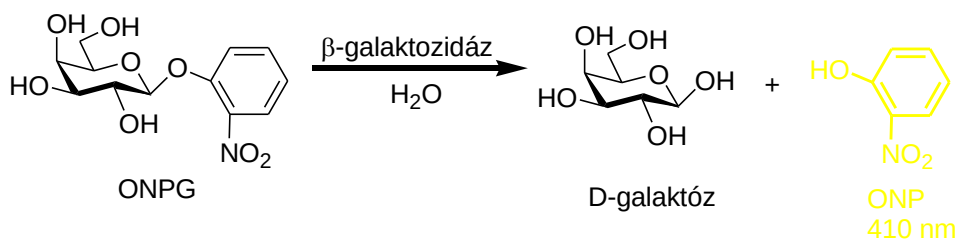
tisztított *bgaA*-módosított pUC19 plazmidot, 200 µl protoplaszt szuszpenziót és 50 µl PEG-oldatot (25 % PEG 6000, 50 mM CaCl₂, 1 M Tris-HCl, pH=7,5) egy 15 ml-es steril Falcon csőbe mértük és 20 percig jégen tartottuk. 2 ml PEG oldatot adtunk a szuszpenzióhoz és pipettával felszuszpendáltuk, 5 percig 20 °C-on inkubáltuk. 4 ml B-oldatot adunk ismét és óvatosan elkevertük. Alsóagart (3 % MEX, 2 % agar-agar Noble, 1 M szorbitol, 50 µg/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 µg/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 µg/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 µl 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 × hígítást készítsünk-e a PCR-hez. A PCR-t fentebb leírtak szerint hajtottuk végre.

3.11 Oszlopkromatográfiás tisztítás

1 gram nedves sejtet 5 ml proteáz gátló, 0,5 mg/ml lizozim, 10 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ (pH=8) tartalmú pufferben szuszpendáltuk fel és 30 percig szobahőn állni hagytuk. A szuszpenziót ezután 6-szor 10 másodpercig, 10 másodperc megszakításokkal jégen szonikáltuk a SONOPULS Ultrasonic Homogenizers készülékkel, és 15 percig 8500 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszóval dolgoztunk tovább. Protino gyártmányú Ni-IDA 150 affin oszlop használtunk a rekombináns β-galaktozidázok tisztítására. 0,5 ml sejt extraktumot vittünk fel az ekvilibrált oszlopra, és 4-szer 320 µl 10 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 1mM imidazol (pH=8) tartalmú pufferrel mostuk. A megkötődött fehérjéket 3-szor 240 µl 250 mM imidazol, 10 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ (pH=8) pufferrel eluáltuk.

3.12 β -galaktozidáz enzimaktivitásának mérése szintetikus ONPG szubsztráttal



10. ábra ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranóz) hidrolízise.

0,5 ml A vagy B pufferrel hígított mintát 5 percig 30 °C-on inkubáltunk, majd 0,5 ml 6 mM ONPG megfelelő pufferű oldatot adtunk hozzá, és további 30 percig 30 °C-on tartottuk. Az enzim reakciót 2 ml 100 mM Na-borát (pH=10) pufferrel állítottuk meg. Az abszorbanciát 410 nm-en mértük. 1 unit=1 μ mol keletkezett ONP/perc (**10. ábra**).

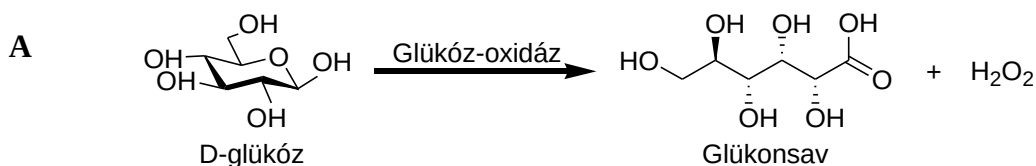
Puffer A: 100 mM Na-foszfát, pH=7

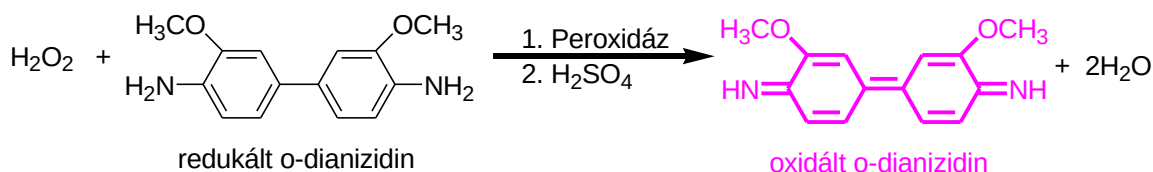
Puffer B: 10 mM TRIS-Cl, 10 mM MgSO_4 , 150 mM NaCl, pH=7

Az ONP kalibrációt a **1. függelék** tartalmazza.

3.13 Laktóz hidrolízis meghatározása

A laktóz hidrolízist, a keletkezett glükóz mennyiségének meghatározására vezettük vissza. A glükóz mennyiségét Glucose-oxidase Assay Kit (Sigma) segítségével határoztuk meg. A glükóz oxidáz által katalizált reakcióban a glükóz dehidrogéneződik glükonsavvá, a dehidrogénezés melléktermékeként hidrogén-peroxid keletkezik (**11/A. ábra**). A peroxidáz enzim hidrogén-peroxid jelenlétében oxidálja az o-dianizidint így barna színű terméket kapunk. Kénsav hatására a barna szín rózsaszínre változik, a színintenzitás spektrofotométerrel meghatározható (**11/B. ábra**).



B

11. ábra D-Glükóz mérésének elve Glucose-oxidase Assay Kit segítségével.

0,5 ml A vagy B pufferrel hígított mintát 5 percig 30 °C-on inkubáltunk, majd 0,5 ml 6 mM laktóz megfelelő pufferű oldatot adtunk hozzá, és további 30 percig 30 °C-on tartottuk. Az enzim reakciót 5 perces 80 °C-ra való melegítéssel állítottuk meg. Ezt követően a keletkezett glükóz mennyiségét a kit leírása alapján határoztuk meg (**2. függelék**). Az 1 unit=1 μmol keletkezett glükóz/perc.

Puffer A: 100 mM Na-foszfát, pH=7

Puffer B: 10 mM TRIS-Cl, 10 mM MgSO₄, 150 mM NaCl, pH=7

3.14 Fehérjetartalom meghatározása

A fehérje tartalmat Lowry (1951) féle módszerrel határoztuk meg, standardként BSA-t (marha szérum albumint) használtunk.

A frissen készített „A reagens” 1 térfogatnyi I. oldatot (összetétele 1 litere vonatkoztatva: 100 g K₂CO₃, 1 g CuSO₄ x 5 H₂O, 2 g Na-tartarát), 2 térfogatnyi 5 % SDS oldatot (50g/l), és 1 térfogatnyi 0,8 M NaOH oldatot tartalmazott. A „B reagens” 2 N Follin and Ciocalteu's phenol reagens és desztillált víz 1:5 arányú elegye. A mintákat 1 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel úgy, hogy a kapott abszorbancia érték 0,1-0,6 legyen. Majd 1 ml „A reagens” adunk hozzá, és szobahőmérsékleten (25 °C) 10 percig inkubáltuk, ezt követően 0,5 ml „B reagens” mértünk az oldatokhoz és további 30 percig szobahőmérsékleten tartottuk. 750 nm-en határoztuk meg az oldatok abszorbanciáját. Az előzetesen BSA-val (marha szérum albumin) felvett kalibrációs egyenesre vonatkoztattuk a minták fehérjetartalmát (**3. függelék**).

3.15 SDS-PAGE

Az enzim tisztítási lépéseinek nyomonkövetéséhez SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis) módszert alkalmaztunk Mini-Protean Tetra Cell (Biorad) készülékben. Az elektroforézis után Coomassie brilliant blue festékkel detektáltuk a

fehérjéket. Bioline cég által gyártott HyperPage Protein Laddert használtuk fehérje markerként.

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.

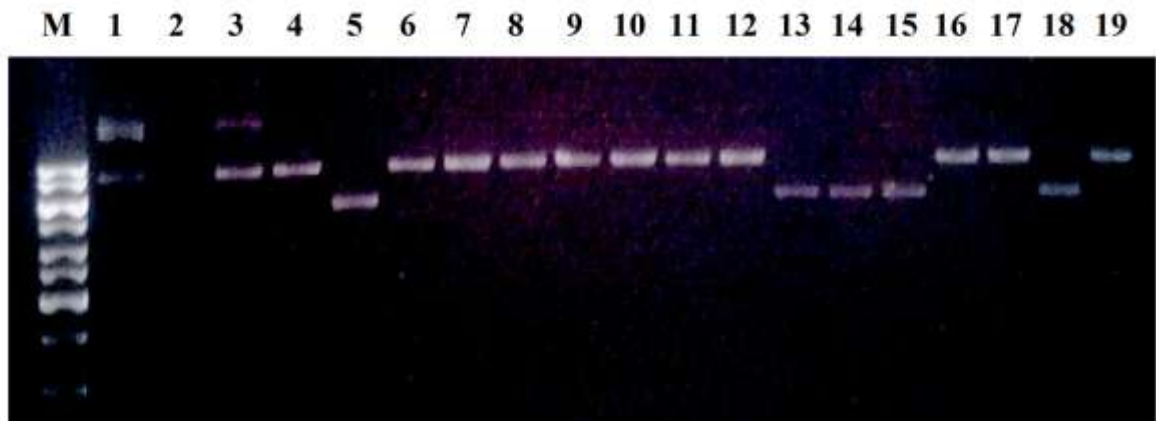
4.3 *BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid előállítása

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.

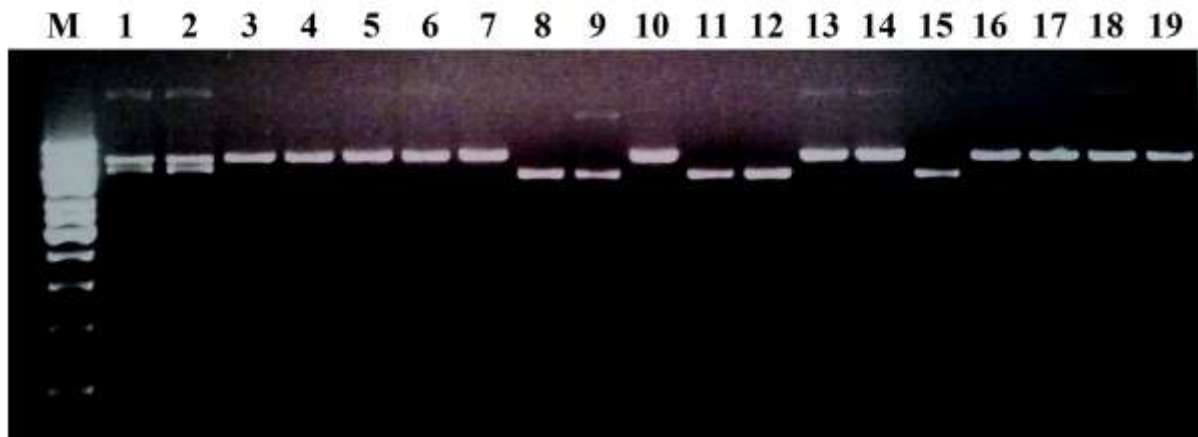
4.4 *BgaD*-pET21a és *bgaE*-pET21a expressziós plazmidok előállítása

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



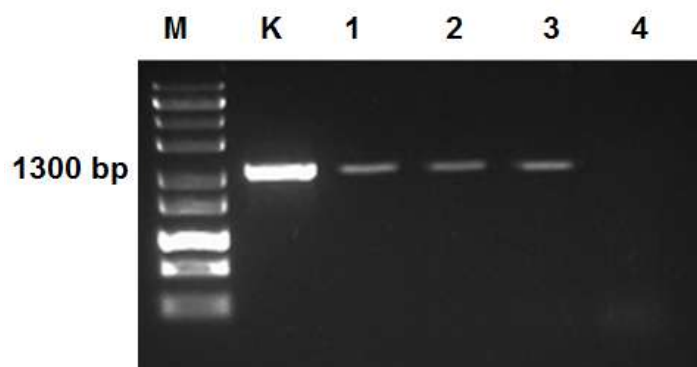
B



12. 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 **13. ábrán** látható, hogy több mutáns is tartalmazta a célgént.

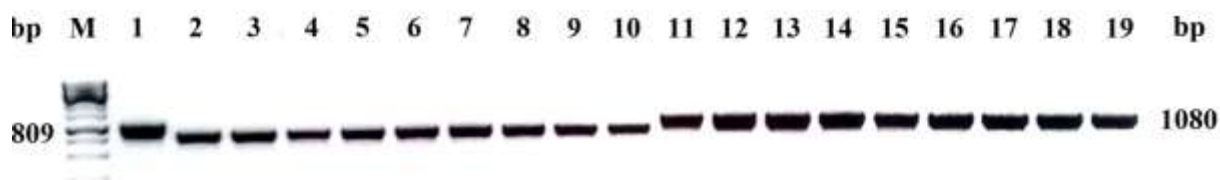


13. ábra Transzformálás ellenőrzése PCR-rel. M: marker, K: kontrol (*BgaA*-cDNAI-gpd-pUC19 expressziós plazmid), 1-4 izolált mutánsok

Több transzformálás alkalmával is azt tapasztaltuk, hogy higromicint nem tartalmazó tpt.-on növesztve a mutánsokat, a plazmidot minden esetben elvesztette a sejt, amiről arra következtethetünk, hogy nem integrálódott a genomba a célgén. A cDNAI egy konstitutív promóter, Nakari és mts-ai tapasztaltak nem megfelelő expressziót és a cDNAI promóterrel hozták összefüggésbe [46].

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

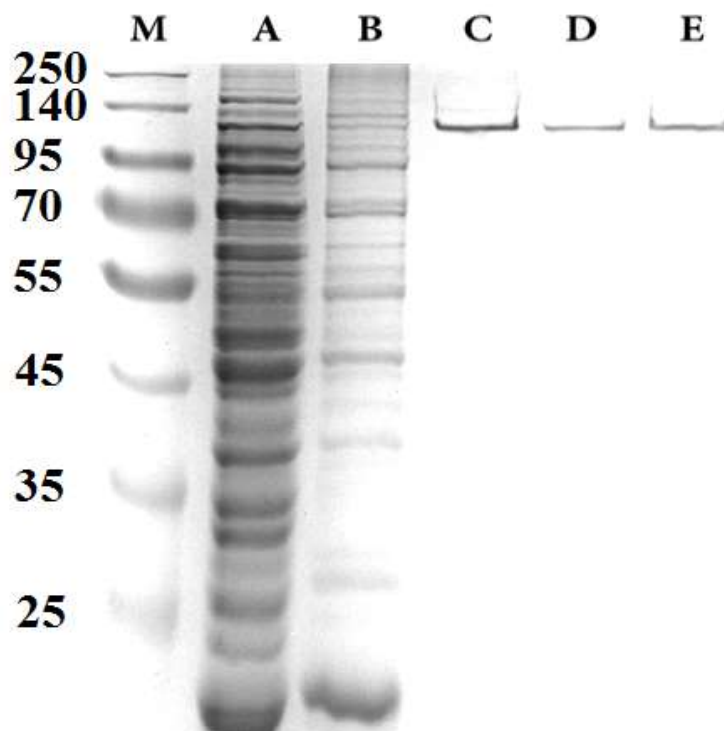
A *bgaD*- és *bgaE*-pET21a plazmidokat *E. coli* Rosetta (DE3) törzsekbe transzformáltuk. A transzformálás után a sejtekből plazmidot izoláltunk, majd a génekre tervezett primerekkel PCR-rel ellenőriztük, hogy a ligált plazmid került a kompetens sejtekbe (**14. ábra**).



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

4.7 BGAD fehérje tisztítási problémája

Több β -galaktozidáz esetén is leírták, hogy egyértékű ion (Na^+ , K^+), és kétértékű ion (Mg^{2+} , Mn^{2+}) szükséges a fehérje stabilizálásához [47, 48]. Az LB táptalaj Na^+ ionban gazdag, ezzel szemben Mg^{2+} ionban pedig szegény. Ezért a rekombináns fehérje expressziójakor Mg^{2+} tartalmú LB táptalajon növesztettük a sejteket. A sejtfeltárás és az oszlopkromatográfiás tisztítás során 10 mM MgSO_4 és 300 mM NaCl koncentrációt tartottunk az oldatokban. A rekombináns *bgaD* gént tartalmazó *E. coli* törzsek 30 °C-on történő növesztése és IPTG indukcióját (30 °C) követően egy kb. 125 kDa nagyságú fehérje jelent meg, ami megközelíti a célfehérje kalkulált méretét (120 kDa). A Ni-IDA affin oszlopon történő tisztítás során kb. 3,6-szoros tisztulást sikerült elérnünk. A Ni-IDA affin oszlop elúciós frakcióját 4-Aminifenil- β -D-tiogalaktopiranozid-agaróz affin oszlopon tisztítottuk tovább. Ezt az oszlopot elterjedten használják β -galaktozidázok tisztítására. Az oszlophoz kapcsolt ligandumok nagy hasonlóságot mutatnak az enzim szubsztátjaival, így összesen körülbelül 28-szorosára sikerült tisztítani az enzimet, a specifikus aktivitása 163 U/mg lett. Sajnos későbbi vizsgálatokkal bebizonyítottuk, hogy ez a fehérje, az *E. coli* LACZ fehérjéje. A hibára akkor derült fény, amikor a BGAE fehérje ugyanilyen módszerű tisztításánál szintén egy 125 kDa nagyságú fehérjét kaptunk a kalkulált 75 kDa helyett.



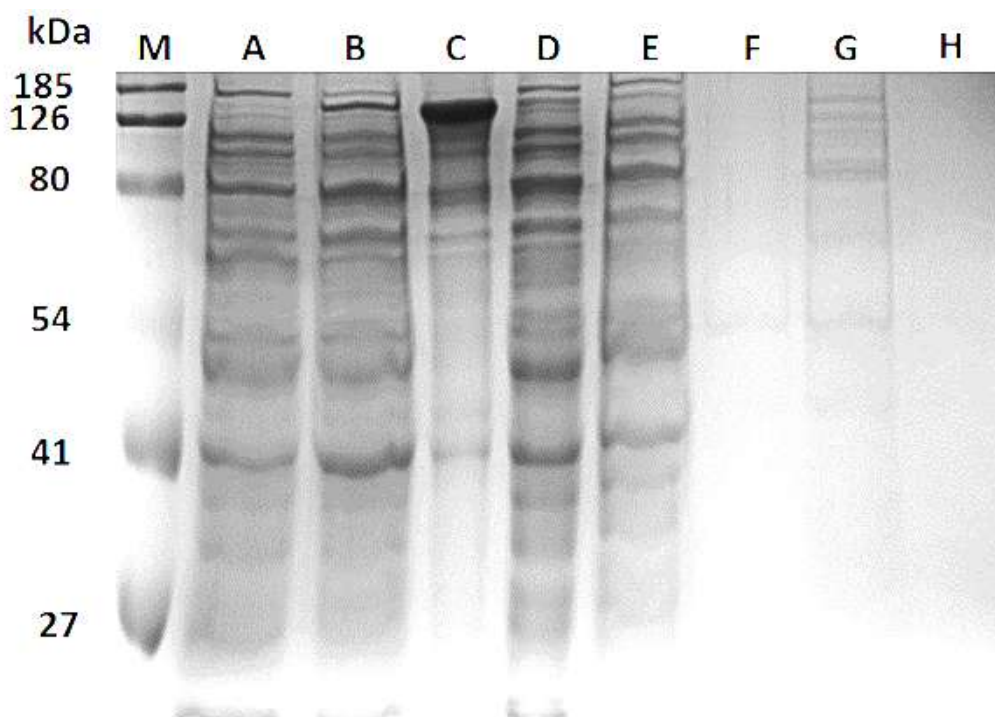
15. ábra Az *E. coli* saját LACZ fehérjének tisztítása a BGAD fehérje helyett. M: marker; A: sejtextraktum; B: Ni-IDA elúciós; C-E: 4-Aminifenil- β -D-tiogalaktopiranozid-agaróz affín oszlopon elúciós frakciói

	Aktivitás (U/ml)	Térfogat (ml)	Összes aktivitás (U)	Fehérje konc. (mg/ml)	Összes fehérje (mg)	Spec. akt. (U/mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Extraktum	37	1,8	66,6	6,2	11,16	5,9	1	100
Ni-IDA	16	3	48	0,75	2,25	21	3,6	72
β -gal. affín oszlop (F frakció)	10	1	10	0,06	0,06	163	28	15

2. táblázat Összefoglaló táblázat a LACZ fehérje tisztításáról

A *bgaD* gén 13 db ciszteint kódol, melyek között kénhid kötések formálódnak. A kénhidak kialakulásának nem optimális az *E. coli* redukzív citoplazmatikus közege, illetve, hogy a LACZ fehérje expresszióját csökkentjük az indukciós hőmérsékletet 18 °C-ra csökkentettük. A fentiek miatt, a BGAD fehérje tisztulása csak enzimaktivitás méréssel nem tudtuk követni. A BGAD nagyfokú homológiát mutat [49] több izolált fonalas gomba β -galaktozidáz fehérjéjével (pl.: *A. nidulans* [22], *K. marxianus* [50]), amelyek izolálása az instabilitásból eredően nehézkes volt. Az *A. nidulans* β -galaktozidáz enzimét instabil jelzővel illeti a cikk, a maximális aktivitással 30 °C-on rendelkezett. Ahogy a **16. ábrán** látszik, a

BGAD fehérje gyenge kifejeződése volt tapasztalható. Az oszlopkromatográfiás tisztítás után még nem sikerült homogén formában a rekombináns fehérjét kinyerni.

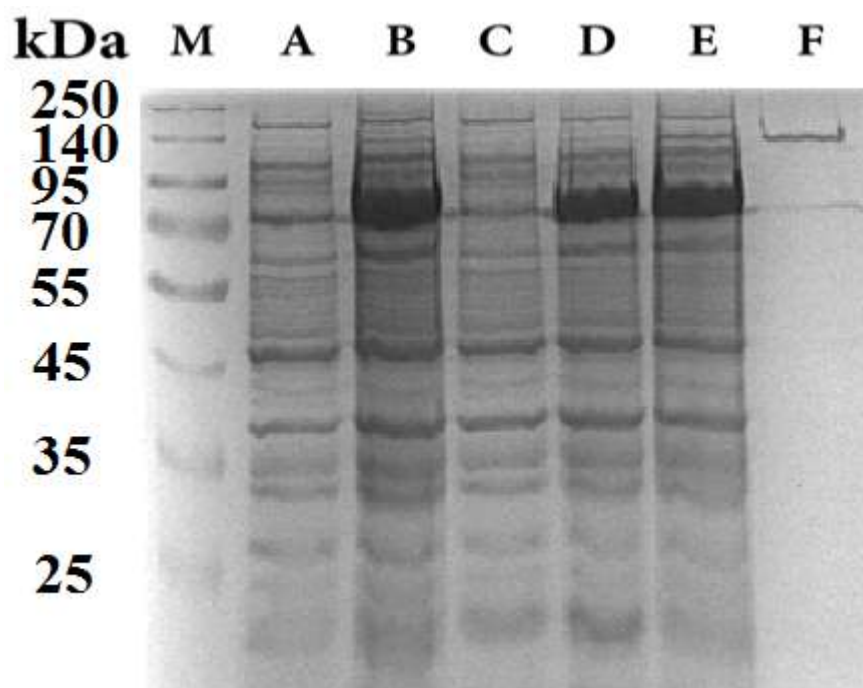


16. ábra BGAD tisztítási problémája. M: marker; A: *E. coli* Ros. *bgaD* sejtek indukció előtt; B: *E. coli* Ros. *bgaD* sejtek indukció után; C: sejtörmelék; D: sejtextraktum; E, F: Ni-IDA mosó frakciók; G, H: Ni-IDA elúciós frakciók

E. coli-ban a 60 kDa fölötti fehérjék sikeres expressziójának valószínűsége csökken, 1000 aminosav fölött meglehetősen bizonytalan, hogy a fehérje kifejeződik, illetve oldható formában lesz [51]. A BGAD fehérje közel 1100 aminosavból (120 kDa) áll, így lehetséges, hogy *E. coli*-ból oldható, aktív formában való kinyerése nem lehetséges. A heterológ fehérjék 30 %-nál nem lehetséges *E. coli*-ból oldható formában történő kinyerése. A szakirodalom ilyenkor eukarióta platformon való expressziót javasol [51].

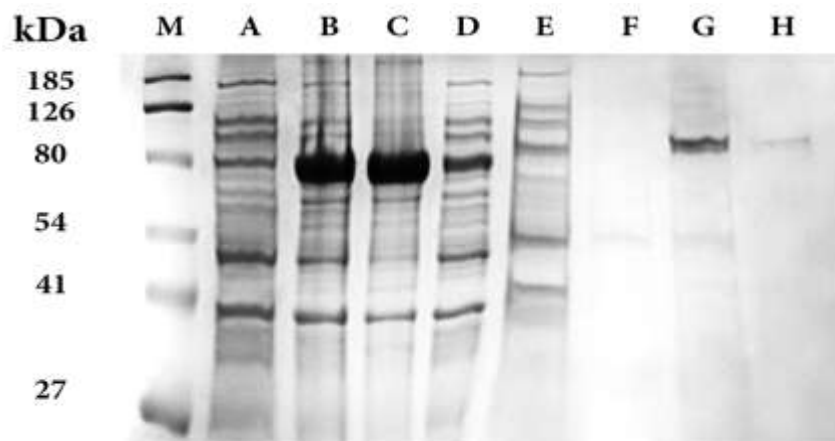
4.8 BGAE fehérje túltermelése és tisztítása

A rekombináns BGAE fehérje IPTG indukciót követően (30 °C-on), kb. 75 kDa-nál nagymennyiségű fehérje expresszióját detektáltuk (17. ábra). Egy 120 kDa méretű fehérje gyenge indukciója is volt megfigyelhető, későbbi vizsgálatokkal bebizonyítottuk, hogy ez az *E. coli* LACZ fehérjéje.



17. ábra BGAE expressziós vizsgálata. M: Marker; A: IPTG indukció előtti *E. coli* BL21(DE3) *bgaE* sejtek; B: IPTG indukció utáni *E. coli* BL21(DE3) *bgaE* sejtek; C: IPTG indukció előtti *E. coli* Rosetta(DE3) *bgaE* sejtek; D: IPTG indukció utáni *E. coli* Rosetta(DE3) *bgaE* sejtek; E: IPTG indukció utáni *E. coli* BL21(DE3) *bgaE* sejtek + tisztított LACZ enzim; F: Tisztított LACZ enzim

A táptalaj eltávolítása után a sejteket szonikálással tártuk fel, majd a sejtízátumot a sejtörmeléktől centrifugálással választottuk szét. A rekombináns 6×His-BGAE fehérjét immobilizált nikkelt tartalmazó oszlopon választottuk el a szennyező fehérjéktől. Az indukciós körülmények csökkentésével (hőmérséklet csökkentése) tudtuk elérni, hogy a célfehérje oldhatóformában legyen. A tisztulást SDS-PAGE segítségével követtük (**18. ábra**).



18. ábra rekombináns BGAE kifejeződésének és tisztulásának vizsgálata SDS-PAGE segítségével. M: Marker; A: *E. coli* Rosetta (DE3) sejtek IPTG indukció előtt; B: *E. coli* Rosetta (DE3) sejtek IPTG indukció után; C: Sejttörmelék feltárás után; D: Sejtlizátum feltárás után; E; F: Ni-IDA affín oszlop mosó frakciói; G; H: Ni-IDA affín oszlop elúciós frakciói

A tisztított BGAE fehérje esetében nem mértünk ONPG és sem laktóz hidrolízist. A *bgaE* gén ortológja a legtöbb fonalas gombában (*A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*, *Penicillium* és *Fusarium* fajokban) megtalálható, valószínűtlen, hogy fontos szerepet tölt be *P. chrysogenum* laktóz lebontásában [8].

Az eukarióta gének prokariótákkal történő expressziójának a hátránya, hogy a posztranszlációs módosítások elmaradása miatt inaktív fehérjét kaphatunk. Lehetségesnek tartjuk, hogy a *bgaE* génterméke eukarióta rendszerből aktív formában lesz kinyerhető. További vizsgálatok szükségesek a *bgaE* gén funkciójának felderítéséhez.

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 órás 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 *Trichoderma reesei* Δ xyl1 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 restrikciós 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 *T. reesei* Δ xyl1 *bgaA* génnel való transzformáció során sikerült izolálnunk több olyan telepet amely tartalmazza a célgént, de higromicint nem tartalmazó tpt.-on növesztve a mutánsokat, a plazmidot minden esetben elvesztette a sejt, amiről arra következtethetünk, hogy nem integrálódott a genomba a célgén. A cDNAI egy konstitutív promóter, Nakari és mts-ai tapasztaltak nem megfelelő expressziót és a cDNAI promóterrel hozták összefüggésbe.

A rekombináns *E. coli* Rosetta (DE3) törzseket folyékony LB táptalajon növesztettük, IPTG-vel indukáltuk a gének expresszióját. A táptalaj eltávolítása után a sejteket szonikálással tártuk fel.

A BGAE fehérjét immobilizált nikkelt tartalmazó oszlopon választottuk el a szennyező fehérjéktől. A tisztulást SDS-PAGE segítségével követtük. A tisztított BGAE fehérje esetében nem mértünk ONPG és sem laktóz hidrolízist. A *bgaE* gén ortológja a legtöbb fonalas

gombában (*A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*, *Penicillium* és *Fusarium* fajokban) megtalálható, valószínűtlen, hogy fontos szerepet tölt be *P. chrysogenum* laktóz lebontásában [8].

Az eukarióta gének prokariótákkal történő expressziójának a hátránya, hogy a posztranszlációs módosítások elmaradása miatt inaktív fehérjét kaphatunk. Ahhoz, hogy egyértelműen bizonyítsuk, hogy a *bgaE* génterméke nem játszik szerepet a laktóz lebontásban, eukarióta rendszerben való expresszió szükséges. A *bgaE* gén és ortológjainak funkciója még nem ismert számunkra.

A BGAD fehérje nagyfokú homológiát mutat több már izolált fonalas gomba β -galaktozidáz fehérjéivel (pl.: *A. nidulans*, *K. marxianus*), amelyek izolálása az instabilitásból eredően nehézkes volt. A BGAD fehérje közel 1100 aminosavból (120 kDa) áll, így lehetséges, hogy *E. coli*-ból oldható, aktív formában való kinyerése nem lehetséges. A szakirodalom gyakran eukarióta platformon való expressziót javasol.

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): Xyl1 (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

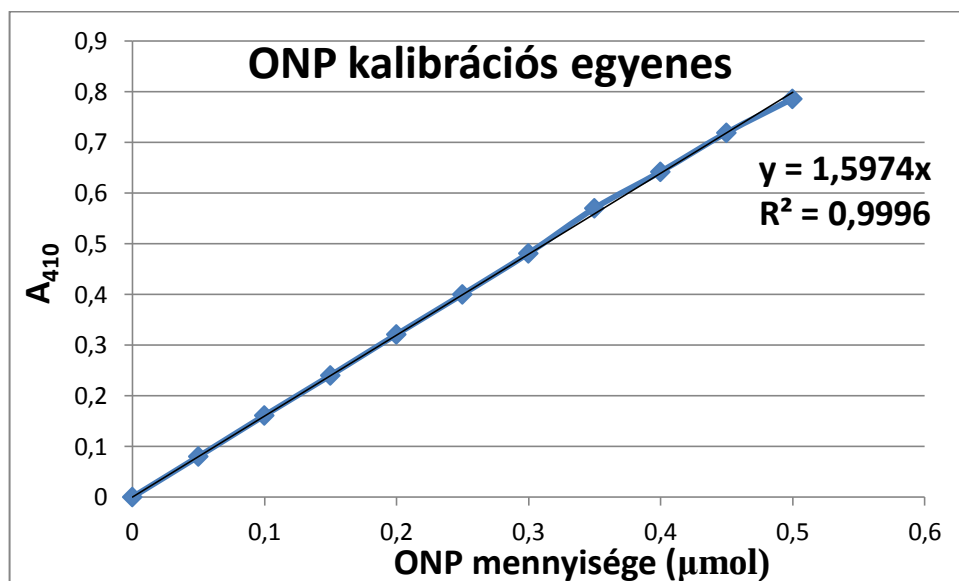
36. Grodberg J, Dunn JJ (1988): *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245–53
37. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J (1997): The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein 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
42. QIAGEN (2003): The QIAexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins
43. MACHEREY-NAGEL (2011): Purification of His-tag proteins, User manual
44. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598–599
45. Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3**: 1-7
46. Nakari-Setälä T, Penttilä M (1995): Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl Environ Microbiol* **61 (10)**: 3650-3655
47. Jurado E, Camacho F, Luzón G, Vicaria JM (2002): A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbial Tech.* **31**: 300-309
48. Sutendra G, Wong S, Fraser ME, Huber RE (2007): β -Galactosidase (*Escherichia coli*) has a second catalytically important Mg^{2+} site. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **352**: 566–570

49. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete É, Kubicek CP, Flipphi M (2012): Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Gen. Bio.* **49**: 415–425
50. Braga ARC, Manera AP, Ores JC, Sala L, Maugeri F, Kalil SJ (2013): Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides. *Food Tech. Biotech.* **51.1**: 45-52
51. Edwards A (2008): Protein production and purification, *Nat Methods*. **5(2)**: 135–146

7 Függelék

7.1 ONP kalibrációs egyenes felvétele

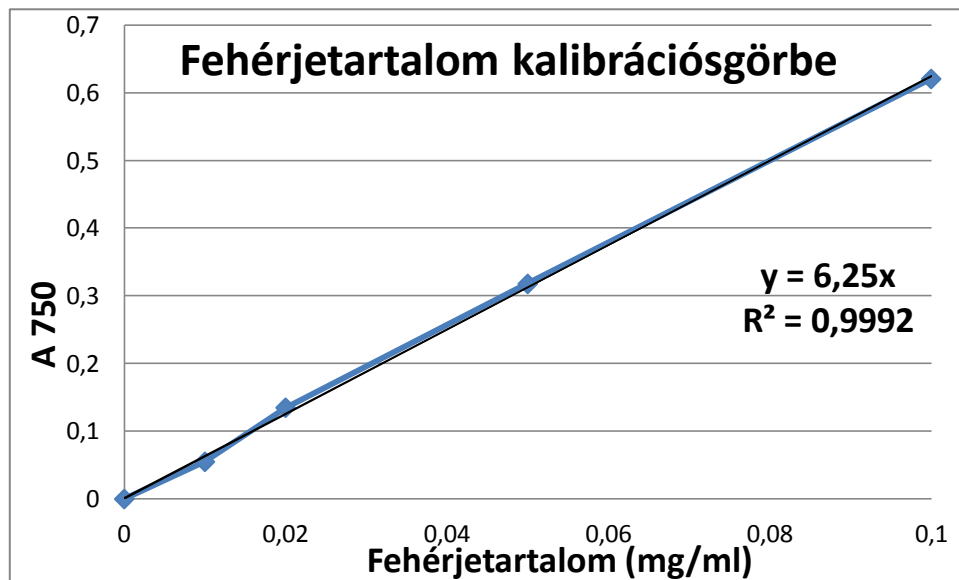
1 mM ONP törzsoldatot készítünk, és a következő ONP mennyiségeket mérjük ki: 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45 és 0,50 μmol és a méréshez használt pufferrel 0,5 ml-re egészítjük. A mérés további részét a **3.9 részben** leírtak szerint végezzük. A 410 nm-en mért abszorpcia értékeket a bemért ONP mennyiségének függvényében ábrázoljuk, a kapott pontokra egyenest illesztünk (**19. ábra**). Az egyenes egyenlete alapján később meghatározhatóak az ismeretlen minták ONP tartalma.



19. ábra ONP kalibrációs egyenes meghatározása.

7.2 Fehérjetartalom kalibrációs egyenes meghatározása

BSA fehérje standardból 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítünk, és a következő fehérje mennyiségeket mérjük ki: 0, 10, 20, 50 és 100 μg , és deszt. vízzel 1 ml-re egészítjük. A fehérjetartalmat a 3.9 részben leírtak szerint végezzük. A 750 nm-en mért abszorpcia értékeket a bemért fehérje mennyiségének függvényében ábrázoljuk, a kapott pontokra egyenest illesztünk (**20. ábra**). Az egyenes egyenlete alapján később meghatározhatóak az ismeretlen minták fehérje tartalma.

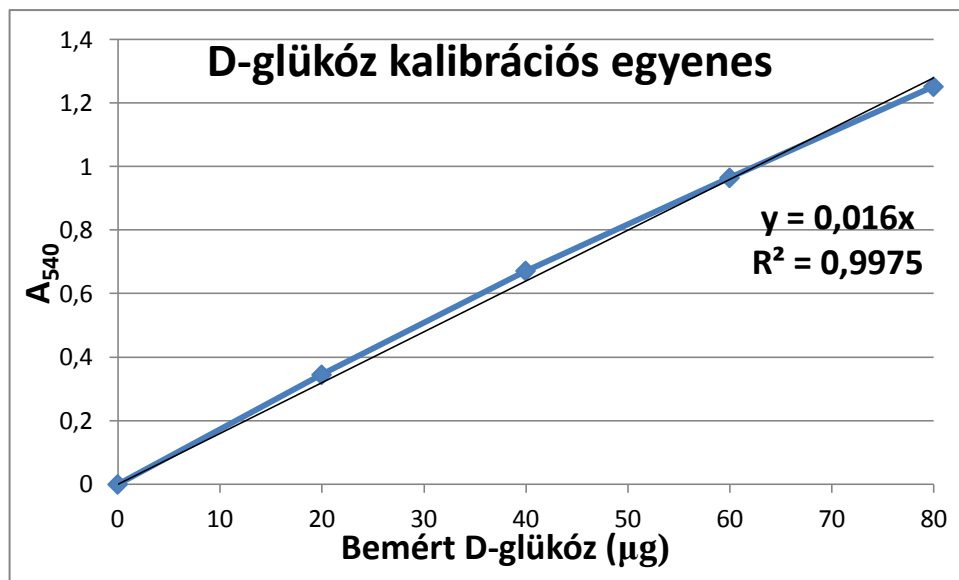


20. ábra Fehérjetartalom kalibrációs egyenes meghatározása.

7.3 Glucose-oxidase assay kit protokollja, D-glükóz kalibrációs egyenes meghatározása

1 ml mintát 1 perce 37°C-os vízfürdőbe teszünk, majd hozzámérünk 2 ml Assay reagenst, és 37 °C 30 percig inkubáljuk. A reakciót 2 ml 12 N H₂SO₄-val állítjuk meg. A minták abszorbancia értékét 540 nm-en mérjük.

1 mg/ml koncentrációjú D-Glükóz törzsoldatotból, és a következő D-glükóz mennyiségeket mérjük ki: 0, 20, 40, 60 és 80 µg, és deszt. vízzel 1 ml-re egészítjük. A glükóztartalmat a fenti részben leírtak szerint végezzük. Az 540 nm-en mért abszorbcia értékeket a bemért D-glükóz mennyiségének függvényében ábrázoljuk, a kapott pontokra egyenest illesztünk (**21. ábra**). Az egyenes egyenlete alapján később meghatározhatóak az ismeretlen minták D-glükóz tartalma és a laktóz hidrolízis mértéke.



21. ábra D-glükóz kalibrációs egyenes meghatározása.