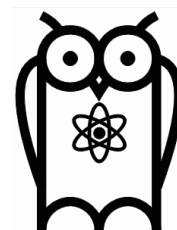




**Miskolci Egyetem**  
**Műszaki Anyagtudományi Kar**  
**Tudományos Diákköri Konferencia**



**Új típusú mágneses nanorészecskék molekuláris  
biológiai eljárásokban való alkalmazhatóságának  
vizsgálata**

Analysis of the applicability of new types of magnetic  
nanoparticles in molecular biological processes

**Szerző:** Szilágyi Gergely

**Témavezető:** Dr. Szőri-Dorogházi Emma  
tudományos munkatárs

Kémiai Intézet

2021. 11. 18.

# Tartalomjegyzék

|       |                                                                                                    |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Bevezetés.....                                                                                     | 2  |
| 2     | Irodalmi áttekintés.....                                                                           | 2  |
| 2.1   | Nukleinsavak (DNS és RNS) szerepe a molekuláris biológiában.....                                   | 2  |
| 2.2   | DNS kettős hélix felépítése és jellemzői.....                                                      | 4  |
| 2.2.1 | A DNS szál érzékenysége hőmérsékletre és pH-ra.....                                                | 4  |
| 2.2.2 | Genomi DNS.....                                                                                    | 4  |
| 2.2.3 | Plazmid DNS.....                                                                                   | 5  |
| 2.3   | Mik azok a mágneses nanorészecskék (MNP)?.....                                                     | 5  |
| 2.3.1 | Mágneses nanorészecskék felhasználása.....                                                         | 6  |
| 2.3.2 | Mágneses nanorészecskék felhasználása a molekuláris biológiában.....                               | 6  |
| 3     | Célkitűzések.....                                                                                  | 9  |
| 4     | Anyagok és módszerek.....                                                                          | 10 |
| 4.1   | Tesztelt mágneses nanorészecskék.....                                                              | 10 |
| 4.2   | A kísérletekhez felhasznált anyagok és reagensek:.....                                             | 11 |
| 4.3   | Felhasznált modell organizmus.....                                                                 | 12 |
| 4.4   | Plazmid DNS-izolálása gyári GenElute™ plazmid izoláló készlettel.....                              | 13 |
| 4.5   | Plazmid DNS mágneses nanorészecskékhez való reverzibilis kötődésének vizsgálata.....               | 13 |
| 4.6   | Plazmid DNS izolálása baktérium sejtszuszpenzióból MNP-ék felhasználásával.....                    | 14 |
| 4.7   | Agaróz gélelektroforézis.....                                                                      | 15 |
| 5     | Eredmények.....                                                                                    | 17 |
| 5.1   | Plazmid DNS mágneses nanorészecskékhez való reverzibilis kötődésének vizsgálata.....               | 17 |
| 5.2   | Plazmid DNS közvetlenül bakteriális sejtlyázátumból való izolálása mágneses nanorészecskékkel..... | 20 |
| 6     | Eredmények összefoglalása és további tervek.....                                                   | 22 |
| 7     | Köszönetnyilvánítás.....                                                                           | 23 |
| 8     | Irodalomjegyzék.....                                                                               | 24 |

# **1 Bevezetés**

A nanotechnológia napjaink egyik meghatározó tudományterülete, melynek eredményeként új tulajdonságokkal rendelkező anyagok (nanorészecskék) megalkotására van lehetőség. Ezen anyagok felhasználhatóak a molekuláris biológia területén is. Kiemelten fontos terület lehet a mágneses tulajdonsággal rendelkező nanorészecskék nukleinsav (DNS, RNS) molekulák izolálásában, tisztításában történő alkalmazhatósága, mivel a hagyományos (alkáli-lízises) preparálás időigényes és olyan szerves oldószerek használatát igényli, melyek hosszútávon egészségre káros hatásúak. Az egészségre káros reagensek használatának elkerülése érdekében a gyakorlatban korábban különböző affinitás oszlopok használata terjedt el, melynek lényege, hogy a DNS molekulák nagy affinitással kötődni képesek az oszlopban található speciális töltethez, ezáltal a reakcióelegyben található mérgező szerves komponensektől megszabadulhatunk. Ezek az „oszlop-alapú” eljárások azonban eszközigenyesek, és a kereskedelmi forgalomban kapható költséges, oldatok és speciális oszlopokat tartalmazó készletek megvásárlását igénylik. Ezen affinitás oszlopokat alkalmazó technológiáknak kitűnő alternatívái lehetnek a különböző mágneses tulajdonságú nanorészecskéket alkalmazó eljárások. Munkám célja volt olyan mágneses nanorészecskék tesztelése, melyek nukleinsav kötő képességük révén nukleinsav izolálás és DNS/RNS tisztítási eljárásokban alkalmazhatóak. Továbbá meghatározni ezen részecskék nukleinsav kötő képességének hatékonyságát, majd azt a kereskedelmi forgalomban már elérhető mágneses részecskék hatékonyságával összehasonlítani. Az elvégzett összehasonlítás eredményeként javaslat fogalmazható meg, hogy a későbbiekben, melyek a biológiai szempontból is hasznosítható mágneses nanorészecskék.

## **2 Irodalmi áttekintés**

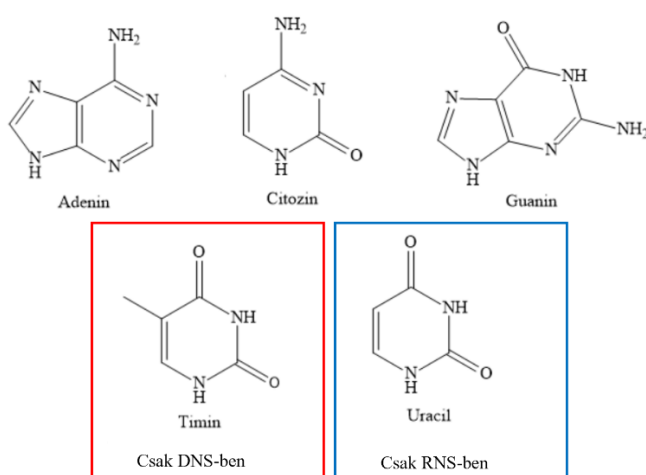
### **2.1 Nukleinsavak (DNS és RNS) szerepe a molekuláris biológiában**

A sejtjeinkben található örökítő anyag, a DNS lényegében minden öröklődő biológiai információt tartalmaz [1]. Ebből adódóan számos tudományterület fókuszál és kutatja a DNS szerkezeti felépítését, működésének sajátosságait, a működést szabályozó, javító mechanizmusokat. A DNS szerkezete és működése közötti összefüggések megértése alapvető jelentőségű a génszabályozással (idegen kifejezéssel genetic engineering) foglalkozó tudományterület, a molekuláris biológia számára. A molekuláris biológiai kutatások szempontjából így alapvető fontosságú a különböző forrásból származó nukleinsavak tisztítása

és a feladatnak megfelelő manipulációja. Nukleinsavak tisztítása leggyakrabban különböző baktériumtenyészetekből, növényi vagy állati sejtekből, szövetekből történik. De nukleinsavak származhatnak sejtmentes forrásokból is, például vérplazmából, vagy mesterségesen (in vitro) reakciókból (például polimeráz láncreakcióból, PCR) is.

A molekuláris biológiai tudományok által tanulmányozott nukleinsavak a dezoxiribonukleinsav (DNS) és a ribonukleinsav (RNS) nukleotid egységekből álló makromolekulák. Ezen molekulák felelősek a sejten belüli genetikai információ tárolásáért, és kijelölik, hogy sejtjeink „élete” során mikor, milyen fehérjék termelődjenek, meghatározzák a fehérjék működését, élettartamát. A nukleinsavakat felépítő nukleotidok alapvetően három összetevőből állnak: egy nitrogénalapú heterociklusos bázisból, ami purin, vagy pirimidin bázist jelent, egy pentóz cukorból (ribóz az RNS, vagy dezoxiribóz a DNS esetében), és egy foszfátcsoportból. A nukleinsavak, a DNS és az RNS nemcsak a nukleotidokat alkotó cukrok típusában térnek el egymástól, de a nukleotidokban lévő nitrogénalapú bázisok is különböznek egymástól (**1. ábra**) [1]. Az adenin, a guanin és a citozin mind a DNS-re mind az RNS-re jellemző. Azonban timin csak a DNS-ben, míg uracil csak az RNS felépítésében vesz részt. Léteznek még egyéb ritkán előforduló nukleobázisok, ilyen az inozin, amely a tRNS szálaiban fordulhat elő [2].

A nukleinsavak szerkezetüket tekintve általában egy, vagy kettős szálúak. Az RNS molekula alapvetően egyszálú nukleinsav, de egyes formái, mint pl. a transzfer RNS (tRNS), a nukleinsav lánc részleges bázispárosodásának köszönhetően, helyenként kettős láncú formát vesz fel. Sejtjeink örökítőanyagát jelentő DNS azonban jellemzően kettősszálú makromolekula [1].



**1. ábra. A nukleinsavak felépítésében résztvevő nitrogéntartalmú bázisok.**

## 2.2 DNS kettős hélix felépítése és jellemzői

A DNS molekulát felépítő nukleotidok nukleobázisai a korábban már említett citozin, timin (ezek az ún. pirimidin bázisok) valamint a guanin, és adenin (a purin bázisok). Ezen nukleobázisok egymással szigorú bázispárosodási szabályt követve meghatározott számú hidrogénhíd kialakításával kapcsolódni tudnak egymáshoz. A guanin-citozin esetében három adenin-timin páros esetében csak két hidrogénhíd kialakulására van lehetőség. A nukleinsavakban ismétlődő monomer részeket nukleozidoknak hívjuk. A nukleozidokat 3',5'-helyzetben foszforsav kapcsolja össze észter kötéssel. Annak ellenére, hogy a különböző DNS-ek bázisösszetétele széles határok között változhat, az adenin és timin, illetőleg a citozin és guanin aránya megközelítőleg 1:1. A DNS két fonalát (melyek egymással ellentétes irányban futó, azaz antiparallel láncok) az adenin-timin ill. guanin-citozin bázispárok közötti hidrogénkötések tartják össze. Két ilyen lánc egymásra csavarodik és így alkotja a DNS molekula dupla-hélix (kettős spirál) formáját [1].

### 2.2.1 A DNS szál érzékenysége hőmérsékletre és pH-ra

Mivel a DNS kettős hélixet nem kovalens erők tartják össze, ezért a láncok laboratóriumi körülmények között könnyen szétválaszthatóak. A láncokat hidrogén kötés tartja össze, amely a pH és a hőmérséklet növelésével gyengíthető, így a két lánc elválik egymástól. Ezt a folyamatot denaturációnak nevezzük, amely egy reverzibilis folyamat. A hőmérséklet és a pH csökkentésével a megfelelő láncok újra képesek lesznek egyesülni. A DNS ezen tulajdonsága a sejtekből való izolálás során és különböző genetikai kutatások során is alkalmazható (egyes DNS szekvenciák eltávolíthatóak és kicserélhetőek lesznek a kettős hélixben) [3].

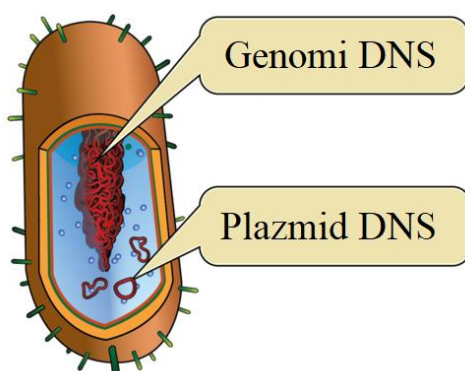
### 2.2.2 Genomi DNS

Minden élő szervezet öröklődési alapja az adott szervezet genomja (**2. ábra**). A genom a teljes DNS állomány, amely tartalmazza a sejtek kialakulásához és működéséhez szükséges információt. Nagy része a kromoszómális DNS, azonban vannak extrakromoszómális kiegészülések is. Eukarióták esetében ezen extrakromoszómális elemek a mitokondriális DNS (állatokban) és a kloroplaszt DNS (növényekben), prokarióták esetén pedig plazmidoknak nevezzük őket. [4]

### 2.2.3 Plazmid DNS

A plazmidok olyan kettős szálú cirkuláris szerkezetű DNS molekulák, melyek lehetővé teszik az örökítő információk sejtek közötti átadását kromoszómáktól függetlenül. A plazmidok a kromoszómáktól függetlenül replikálódhatnak és egyik sejtől a másikba átadódhatnak. Elhelyezkedésüket tekintve a baktériumok citoplazmájában találhatók meg (**2. ábra**).

A plazmidokban hordozott információ vonatkozhat például az antibiotikumokkal szembeni ellenállóképességre, mely tulajdonságot a mikroorganizmusok átvihetik, akár különböző kórokozó fajok között is. Arra is képessé teheti a baktériumot, hogy mérgeket szintetizáljon konkurens baktériumok ellen. A plazmidokban található gének a kromoszómán tárolt információktól eltérő tulajdonságokat hordoznak, olyanokat, amelyek a szervezet számára rendes körülmények között nem lennének létfontosságúak [4].

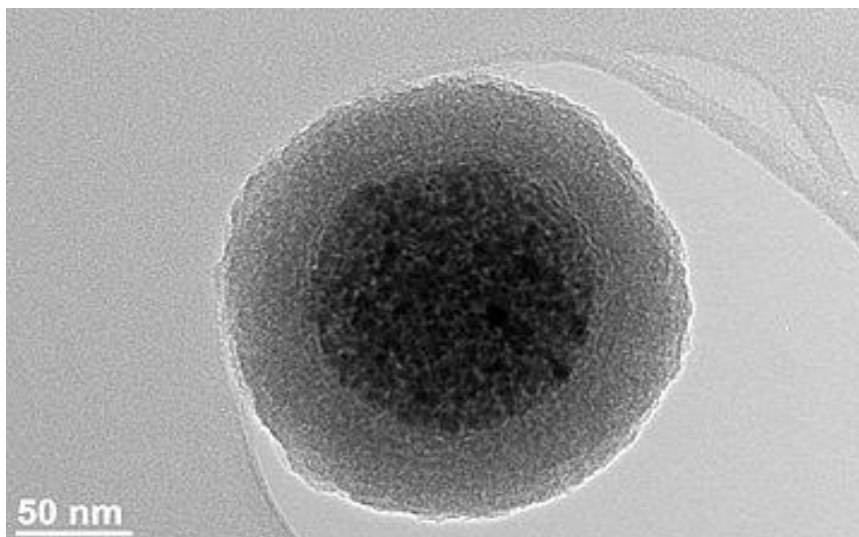


*2. ábra. Genomi és plazmid DNS elhelyezkedése [5].*

### 2.3 Mik azok a mágneses nanorészecskék (MNP)?

A nanorészecskék (**3. ábra**) olyan anyagok, melyek nagyon apró (1-100 nm) szemcsemérettel rendelkeznek. Ezen ultrafinom szemcsemérettel magyarázható a nanorészecskék eltérő viselkedése, hiszen a mérettartományuk közelebb esik az atomi méretekhez, mint a nagyméretű anyagi részecskékhez.

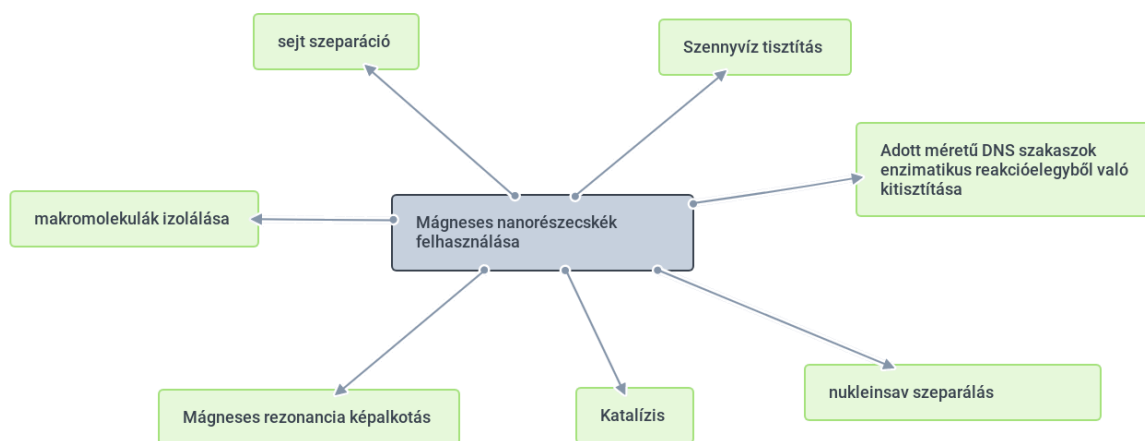
Az egyik említésre méltó tulajdonságuk a nagy felület/tömeg arány, aminek következtében az abszorpciós folyamatok is gyorsabban zajlanak le. Emellett bizonyos nanorészecskék erős paramágneses tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek felhasználhatóak molekuláris biológiai kísérletek elvégzésére [6-8].



3. ábra. Mágneses nanorészecskéből álló mag szilícium-dioxid héjjal [9].

### 2.3.1 Mágneses nanorészecskék felhasználása

A mágneses tulajdonságú nanorészecskék több területen is felhasználhatóak, kezdve a molekuláris biológiai felhasználástól szennyvíz tisztításon át a katalízisig és a mágneses rezonancia képalkotásig (4. ábra).

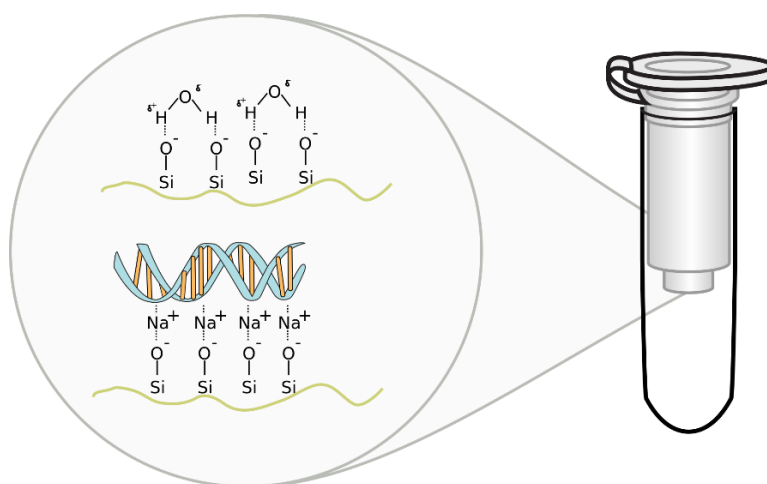


4. ábra. Mágneses nanorészecskék felhasználásának lehetőségei.

### 2.3.2 Mágneses nanorészecskék felhasználása a molekuláris biológiában

A molekuláris biológia az élőlények és sejtek működésének molekuláris szintű tanulmányozása, a különféle sejteken belüli interakciók és szabályozásuk megértésével foglalkozik, beleértve a DNS, RNS és a proteinszintézis témakörét [10]. Ebből adódóan könnyen belátható, hogy a molekuláris biológiai laboratóriumi folyamatokhoz szükség van

kiváló minőségű, a megfelelő forrásból tisztított DNS-re. A DNS tisztítás klasszikus megközelítése a sejtlízis (a sejttartalom felszabadítása), majd a sejtszennyeződések (sejttörmelék) és az extracelluláris komponensek (RNS, fehérjék, sejtmembrán komponensek) eltávolítása kicsapási és centrifugálási lépések sorozatával [11]. Napjainkban kereskedelmi forgalomban lévő oszlop alapú készletek (kit-ek) segítségével könnyebben izolálhatunk DNS-t, mint a klasszikus (szerves oldószereket alkalmazó) módszerrel. Ezekben az eljárásokban a szerves oldószerek (fenol, kloroform) használatát általában szilícium-dioxid tartalmú oszlopokkal helyettesítik. Ezen eljárás tehát egy szilárd fázisú extrakciós módszer, melynek alapja, hogy a nukleinsav speciális körülmények között kötődik ehhez a szilícium-dioxid szilárd fázisához (5. ábra) [11]. A szilícium-dioxid membránhoz nem kötődő részecskék és inhibitorok pedig specifikus összetételű pufferekkel lemoshatóak, eltávolíthatóak a rendszerből. Az oszlop töltetéhez reverzibilisen kötődő DNS, a tisztítási folyamat végén, egy vizes fázissal „leoldható”, leválasztható az oszlopról. Végeredményként pedig egy nagy tisztaságú, megfelelő töménységű DNS oldatot kapunk.

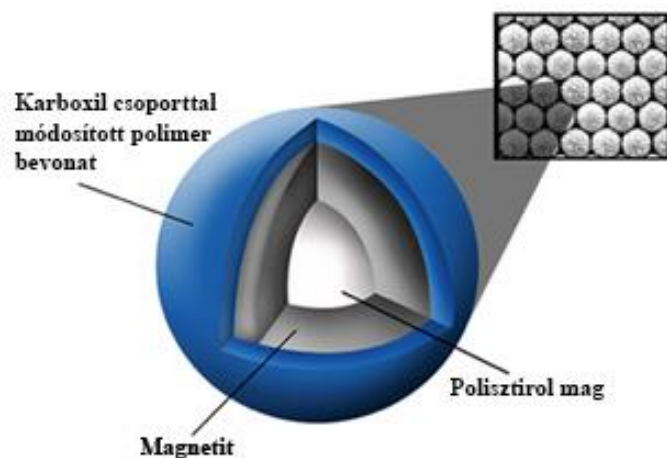


**5. ábra.** Szilícium-dioxid tartalmú oszlopok DNS izoláláshoz [12]

Az oszlop alapú DNS izolálási, tisztítási módszerek mellett egyre elterjedtebbek a szilícium-dioxiddal bevont mágneses részecskék alkalmazása is erre a célra. Ezen részecskék felületéhez is reverzibilisen tud kapcsolódni a DNS. A DNS sejtől való izolálása, vagy egyéb enzimátikus reakció elegyekből való tisztítása mágneses nanorészecskék alkalmazásával lehetőséget nyújt arra, hogy ezen folyamatokat egyszerre nagy mintaszámmal, de ugyanakkor nagy hatékonysággal, viszonylag olcsón végezhessük el. A mágneses nanorészecskék ilyen módú felhasználása lehetővé teszi továbbá az izolálási és tisztítási lépések automatizálását is. A molekuláris biológia így nemcsak az élő sejtek működésének molekuláris szintű tanulmányozását jelenti, hanem a molekuláris laboratóriumi technikák fejlesztését is, ebben az

esetben nanotechnológia alkalmazásával. A mágneses nanorészecskék előnye, hogy kevésbé egészség és környezet károsítók, emellett gyors és hatékony alkalmazhatóságot tesznek lehetővé.

A molekuláris biológiában általánosan használt mágneses részecskéknek (mágneses gyöngyök) két fő formája van: egyrészt a viszonylag kicsi (50 nm-től 2  $\mu\text{m}$ -ig terjedő) részecskék, amelyek szilárd ferritmagból állnak, másrészt a nagyobbak ferrit-és valamilyen polimer kombinációi, melyek átlagos mérete 1-5  $\mu\text{m}$  között van [13]. Mindkét mágneses gyöngytípus jól használható a nukleinsav izolálására, tisztítására és manipulálására. Ezen mágneses részecskék nagy előnye, hogy méretükhöz képest nagy relatív felülettel rendelkeznek, és egy általános felszereltségű laboratóriumban is könnyen elkészíthetők [14-15]. A molekuláris biológiában használt mágneses gyöngyökkel szemben támasztott igények közül az egyik legfontosabb szempont a mágneses nanorészecskéket tartalmazó diszperzió stabilitása. Ennek érdekében legtöbbször különböző bevonatokkal látják el a mágneses részecske „magját” (így épülnek fel például a kereskedelmi forgalomban lévő AmPure XP vagy a Sera-Mag típusú mágneses részecskék is (6. ábra)). A nanorészecske magot burkoló funkcionális bevonat (nukleinsavak tisztításához való felhasználás esetén) leggyakrabban a semleges felületet jelentő szilícium-dioxid, vagy negatív felületi töltést jelentő karboxil burok [17]. Mágneses nanorészecskéket egyébként fehérjék specifikus megkötésére, elválasztására, vagy különböző betegségek diagnosztizálásra is használnak. Ilyenkor a mágneses részecskéket például tozil, epoxi, vagy klorometil csoportokat tartalmazó burokkal látják el. Hasonlóan elterjedtek a fehérjék megkötésére a sztreptavidin-biotin nem kovalens kölcsönhatáson alapuló sztreptavidin vagy biotin ligandumokat tartalmazó funkcionális mágneses nanorészecskék is [18].



**6. ábra.** Karboxil csoportokkal rendelkező funkcionális burokkal ellátott gyöngyök felépítése [16].

### 3 Célkitűzések

A funkcionalizált burokkal rendelkező felület módosított részecskék kiválthatók olyan specifikusan előállított nanorészecskékkel, melyek mágneses tulajdonsággal rendelkeznek. Munkám célja volt különböző, ilyen új típusú mágneses nanorészecskék molekuláris biológiai vonatkozású felhasználhatóságának vizsgálata, elsősorban nukleinsav kötő képesség, nukleinsav izolálás és DNS/RNS tisztítási eljárásokban való alkalmazhatóság szempontjából. A mágneses részecskék nukleinsav kötő képességének teszteléséhez megfelelő tesztelési eljárást, protokollt kell kidolgozni. A kidolgozott manuális protokollok validálását követően, nagy áteresztőképességű robotizálható eljárásokra való adaptálása a cél, mely eljárások a DNS-károsodás kutatásban, bakteriális fertőzések kimutatásában, és klinikai diagnosztikában lesznek majd alkalmazhatóak.

E célok eléréséhez a következő gyakorlati eljárások megvalósítására van szükség:

- A nukleinsav (DNS) forrást jelentő modellorganizmusok kiválasztása, a megfelelő baktérium törzsek fenntartása a tesztelés idejére.
- Nukleinsavak (elsősorban a DNS) izolálása különböző technikákkal (specifikus oszlopos kialakítású izolálási, tisztítási eljárások, valamint mágneses nanorészecskékkel történő DNS izolálás, tisztítás).
- A tesztelésre kiválasztott új típusú mágneses részecskék összehasonlítása molekuláris biológiai felhasználhatóság szempontjából (alkalmasak-e DNS tartalmú komplex reakcióelegyekből specifikusan a DNS megkötésére, azaz DNS molekulák tisztítására).
- A tesztelt mágneses részecskék alkalmazhatóságának vizsgálata közvetlenül bakteriális sejtlizátumból való DNS izolálásra (DNS kinyerésre).
- A különböző módon tisztított nukleinsavak vizualizálása gélelektroforetikus módszerrel.
- A különböző tisztítási, izolálási módszerek hatékonyságának összehasonlítása (elsősorban gélelektroforetikus módszerrel).

## 4 Anyagok és módszerek

### 4.1 Tesztelt mágneses nanorészecskék

- Ampure XP Beads mágneses nanorészecske (forgalmazó: Beckman Coulter Life Science)
- Vas-citrát ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) tartalmú mágneses nanorészecske [19]
- Kobalt-ferrit ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) tartalmú mágneses nanorészecske (forrás: MAK Kémiai Intézet)
- Mangán-ferrit ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) tartalmú mágneses nanorészecske (forrás: MAK Kémiai Intézet)
- Réz-ferrit ( $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ) tartalmú mágneses nanorészecske (forrás: MAK Kémiai Intézet)

A tesztelésre kapott részecskék egyes fizikai és kémiai tulajdonságait ( $\zeta$ -potenciál, átlagos részecskeméret, elemösszetétel) a **2. táblázat** foglalja össze. Ezen részecskéket Dr. Vanyorek László és csoportja készítette és jellemezte.

*1. táblázat. Tesztelt részecskék fizikai és kémiai tulajdonságai.*

| Tesztelt részecskék | $\zeta$ -potenciál<br>[mV] | átlagos részecskeméret<br>[nm] | Összetétel<br>[wt%]                           |
|---------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| vas-citrát          | -4,1                       | 23,9                           | Maghemit: 93,2<br>Hematit: 6,8                |
| kobalt-ferrit       | -8,7                       | $14 \pm 3$                     | $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ : 99,6<br>CoO: 0,4  |
| mangán-ferrit       | -1,0                       | $11 \pm 3$                     | $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ : 100               |
| réz-ferrit          | -2,1                       | $15 \pm 3$                     | CuO: 16.5<br>$\text{CuFe}_2\text{O}_4$ : 83.5 |

## 4.2 A kísérletekhez felhasznált anyagok és reagensek:

*2. táblázat. Felhasznált anyagok nevei és forrása, forgalmazói.*

| Anyag neve                        | Összetétel/képlet:                                                                                         | Forgalmazó              |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Tripton                           | tripszinnel emésztett kazein                                                                               | VWR Chemicals           |
| Élesztő kivonat                   |                                                                                                            | VWR Chemicals           |
| NaCl                              |                                                                                                            | VWR Chemicals           |
| Agar                              | tengeri vörösmoszatokból<br>nyert poliszacharid-keverék<br>(70% agaróz, 30%<br>amilopektin)                | VWR Chemicals           |
| Renaturáló oldat                  | glükóz-trisz-EDTA tartalmú<br>puffer oldat (gyártó által<br>meghatározott összetétel)                      | Merck Life Science Kft. |
| Lízis (sejtfeltárási oldat) oldat | NaOH-SDS tartalmú puffer<br>oldat (gyártó által<br>meghatározott összetétel)                               | Merck Life Science Kft. |
| Neutralizáló oldat                | Kálium-acetát tartalmú puffer<br>(gyártó által meghatározott<br>összetétel)                                | Merck Life Science Kft. |
| Oszlop mosó oldat                 | gyártó által meghatározott<br>összetétel                                                                   | Merck Life Science Kft. |
| Etanolos mosó oldat               | gyártó által meghatározott<br>összetétel                                                                   | Merck Life Science Kft. |
| Elúciós oldat                     | Trisz-EDTA tartalmú puffer<br>oldat gyártó által<br>meghatározott összetétel                               | Merck Life Science Kft. |
| MNP kötő puffer (1)               | NaCl (2,5 M),<br>tris-HCl pH 8.0 (10 mM),<br>EDTA (1 mM),<br>PEG 1540 (20 w/v %), Tween<br>20 (0,05 v/v%). | [20]                    |
| MNP kötő puffer (2)               | NaCl (2,5 M),                                                                                              | [17]                    |

|                                                     |                                                                                                                                                                                                                                 |                          |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|                                                     | trisz-HCl pH 8,0 (10 mM),<br>EDTA (1 mM),<br>PEG 6000 (20% w/v), Tween<br>20 (0,05%)                                                                                                                                            |                          |
| Trisz-etanol mosó puffer                            | trisz-HCl pH 7,5 (10 mM),<br>etanol 80 %                                                                                                                                                                                        | [17]                     |
| Agaróz I <sup>TM</sup>                              | D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-<br>galaktopiranoz lineáris<br>polimere                                                                                                                                                             | VWR Chemicals            |
| GelRed fluoreszcens DNS<br>festék                   | gyártó által meghatározott<br>összetétel                                                                                                                                                                                        | Biotium/VWR Chemicals    |
| GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb<br>molekulasúly marker | gyártó által meghatározott<br>összetétel                                                                                                                                                                                        | Thermo Fisher Scientific |
| TAE puffer<br>elektroforézishez                     | Trisz(hidroximetil)-<br>aminometán (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )<br>Ecetsav (CH <sub>3</sub> COOH)<br>EDTA: etilén-diamin-<br>tetraecetsav (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) | VWR Chemicals            |

### 4.3 Felhasznált modell organizmus

A nukleinsav tisztítási és izolálási vizsgálatokhoz *Escherichia coli* DH5α Gram negatív, nem patogén baktériumot használtuk modellorganizmusként. Laboratóriumunkban többféle plazmid DNS-t tartalmazó *E. coli* is rendelkezésre áll. Az *E. coli* pBAD törzsben a pBAD24 típusú plazmid van jelen, mely egy alacsony kópiaszámú plazmid (baktérium sejtenként 15-20 db plazmid van jelen), az *E. coli* pBluescript baktérium törzsben pedig a pBtKS+ plazmid termelődik (ez egy magas kópiaszámú plazmid, 100-200 db sejtenként). A kísérletekhez szükséges *E. coli* sejtuszuspenziót LB tápoldatban (Luria Bertani tápoldat: 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl, 1000 ml-re egészítve ultratiszta vízzel) készítettem el úgy, hogy LB agar lemezről (LB táplemez: LB tápoldat 1,5% agarral szilárdítva) steril oltókaccsal egy telepet a tápoldatba mostam. Majd ezt a starter (kiindulási) szuszpenziót 12-16 órán át folyamatos rázatással 37 °C-on inkubáltam.

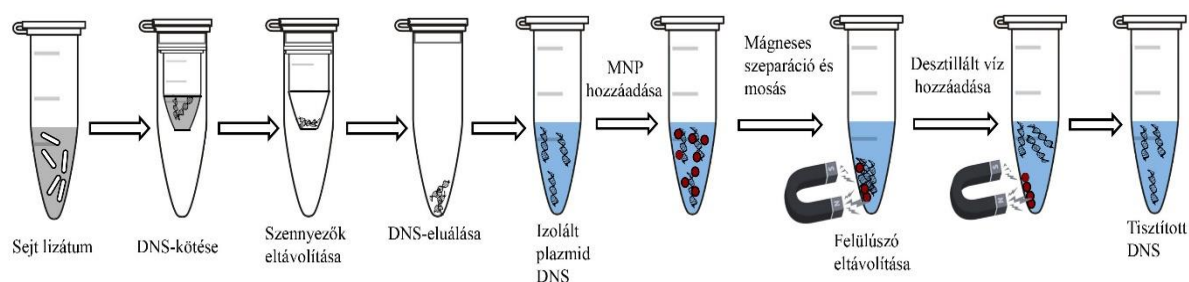
#### **4.4 Plazmid DNS-izolálása gyári GenElute™ plazmid izoláló készlettel**

Kísérlettől függően 1-5 ml starter sejtszuszpenziót 13000 rpm-en 1 percre centrifugáltam, hogy külön lehessen választani a baktérium sejteket a növesztéshez használt tápoldattól. Az így összegyűjtött sejteket a 200 µl renaturáló oldattal újra felfuszpendáltam, majd 200 µl lízis oldattal feltártam a sejteket. A gyártói (Merck Life Science Kft) protokoll által meghatározott inkubációs idő leteltével az eddigi szuszpenzióhoz 350 µl neutralizáló oldatot adtam, mely hatására a bakteriális sejtekből kiszabaduló fehérjék, RNS molekulák, membrán komponensek irreverzibilisen kicsapódnak, és centrifugálással (13000 rpm 10 perc) könnyen elválaszthatóak lesznek a szintén a sejtekből felszabaduló plazmid DNS molekuláktól. A centrifugálást követően a denaturálódott makromolekulák és a sejttörmelék a csapadék fázisban marad, míg a plazmid DNS a felülúszó frakcióba kerül. Ezt a felülúszó frakciót kell a gyártó által a készletbe helyezett szilikagél oszloptöltettel rendelkező, megfelelően előkészített oszlopra tölteni. Itt a felülúszóban lévő plazmid DNS megkötődik, míg az esetlegesen a felülúszóban maradt egyéb molekulák, szennyeződések az oszlopon áthaladva centrifugálással (13000 rpm 1 perc) eltávolíthatóak. Az oszlop töltetéhez kötődött plazmid DNS-t 750 µl etanol tartalmú pufferrel tovább mossuk, centrifugáljuk (13000 rpm 1 perc), majd a készletben lévő Trisz-EDTA összetételű elúciós puffer 100 µl-ével a folyamat végén az oszlopról leválasztjuk (eluáljuk)

#### **4.5 Plazmid DNS mágneses nanorészecskékhez való reverzibilis kötődésének vizsgálata**

A tesztelésre kapott mágneses nanorészecskék reverzibilis DNS kötő képességét vizsgáltam előre izolált plazmid DNS oldattal (oszlopos módszerrel *E. coli* törzsből izolált plazmid DNS). A DNS-MNP reverzibilis kötődésének (DNS oldat MNP-kel való tisztításának) tesztelésére alkalmas eljárás alapját egy szakirodalomban fellelhető módszer jelentette [17], melyet a korábbiakban elvégzett tesztek tapasztalatai alapján módosítva alkalmaztam. A tesztekhez 20 mg/ml-es MNP diszperziókat készítettem ultratiszta vízzel, majd közvetlenül a tesztelés megkezdése előtt 90 µl-t a MNP diszperziókból 5 percre mágneses tartóállványra helyeztem. Ebben az állványban a mágneses tulajdonságú részecskék különválnak a diszperzió folyadék fázisától (7. ábra). Az így kialakult felülúszót pipettával távolítottam el. A mágnesről leválasztva a mintartó Eppendorf csövet, a cső alján lévő MNP-eket 125 µl MNP kötő puffer (1)-gyel újra felfuszpendáltam, és 50 µl DNS oldatot adtam hozzá (kontroll esetén DNS helyett 50 µl ultratiszta vizet használtam). A DNS oldatot a MNP-kel 5 percre rázógéppbe

helyeztem (rázatás kb 600 rpm sebességgel), majd ismét visszahelyeztem a csöveket a mágneses mintatartóba. A fázissétválást követően (max. 5 perc) a kialakult felülúszót leszívtam (ez lesz az F=felülúszó frakció). A visszamaradt pelletet (szilárd fázis, melyhez megfelelő kötődés esetén a DNS molekulák kötve vannak) 200 µl frissen készített 80%-os etanollal kell mosni. A mosó oldatot a mágneses tartóra helyezett csövekből pipetázással távolítjuk el. A mosási lépést még egyszer ismételttem (ezzel a MNP-khez nem kötődő molekulák eltávolíthatók a rendszerből). A második etanolos mosás után 1 percre centrifugálni kell a mintatartó csöveket, hogy az etanolt minél teljesebben el lehessen távolítani, hiszen az a tisztított DNS oldat további felhasználását zavarná. Az alkohol teljes eltávolítása érdekében a MNP-DNS szilárd fázisú pelletet tartalmazó Eppendorf csövet 37°C-os inkubátorba kell helyezni (max. 5-6 percig), majd a szárított pellet felszuszpendálása következik 50 µl TE elúciós pufferrel (1M TRIS, 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA, pH: 8.0). Ez lesz az E=elúciós frakció. A fenti folyamatot a **7. ábra** foglalja össze.

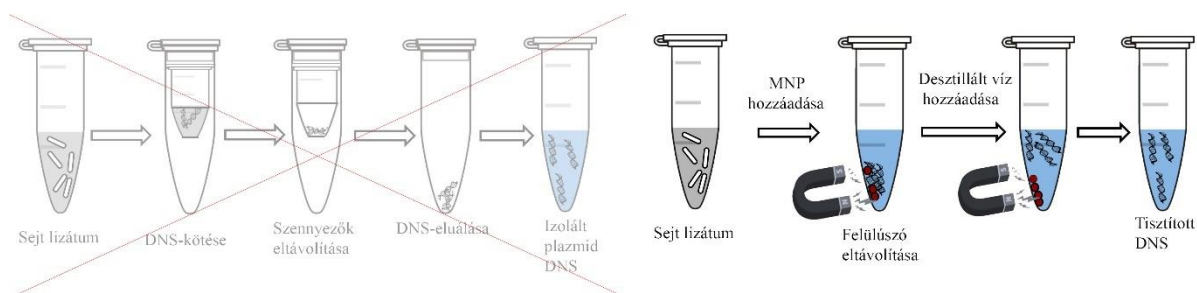


**7. ábra. Plazmid DNS mágneses részecskékhez való reverzibilis kötődésének folyamata (plazmid DNS tisztítás) [19].**

#### **4.6 Plazmid DNS izolálása baktérium sejtszuszpenzióból MNP-ék felhasználásával**

Vizsgálni kellett azt is, hogy a tesztelésre kapott MNP-ék közvetlenül sejtlyizátumból való DNS izolálásra is alkalmazhatóak-e. Ehhez is a Oberacker és mts-ai által közölt eljárások egyike jelentette a kiindulási alapot [17]. Az 5 ml kiindulási sejtszuszpenziót 6000 g-n (g: nehézségi gyorsulás) 5 percig centrifugáltam, majd a felesleges tápfolyadék eltávolítása után a visszamaradt sejttömeget az oszlopos DNS izolálási eljárásnál ismertetett feltárási oldatokkal kezeltem, és a sejteket feltártam. A kapott sejtlyizátumot 10 percig centrifugáltam 14500 g-n 4°C-ra hűtött centrifugátorban. Időközben a tesztelni kívánt MNP-k diszperzióját is előkészítettem. 350 µl MNP diszperzót tartalmazó Eppendorf csövet mágneses tartóba helyeztem 5 percre. Majd a fázissétválás után a felülúszót eltávolítottam és a visszamaradt

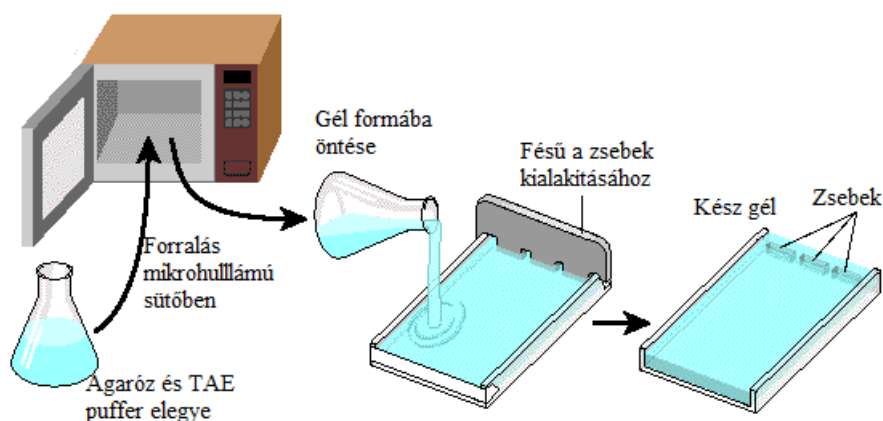
szilárd fázist 600  $\mu$ l MNP kötő puffer (2)-vel újra szuszpendáltam. Ehhez adtam hozzá a sejtlizátum cetrifugálása után kapott tiszta felülúszót. A MNP-DNS kötődéshez a Eppendorf csövet 5-10 percre rázógéphez helyeztem (rázatás kb 600 rpm sebességgel). Az Eppendorf csövet ezután mágneses tartóba tettem 5 percre. Ezt követően a felülúszót eltávolítottam (F=felülúszó frakció), a visszamaradt szilárd frakciót 1 ml trisz-etanol mosó pufferrel mostam, majd a mosópuffer eltávolítása után a DNS-MNP szilárd pelletet hagytam kiszáradni (37°C-os inkubátor 5 perc). A száradás után 50  $\mu$ l 10 mM trisz-HCl (pH 8.5) elúciós pufferrel választottam le a DNS molekulákat a MNP-kről (E=elúciós frakció). A folyamatot a **8. ábra** szemlélteti.



**8. ábra.** A MNP-kel történő plazmid DNS izolálás leegyszerűsített folyamatábrája.

## 4.7 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gél készítéséhez 1g agarózhoz 100 ml TAE puffert adtam, majd mikrohullámú sütőben az agaróz teljes oldódásáig melegítettem az elegyet (**9. ábra**). Ezután az oldathoz pipettáztam 2  $\mu$ l **GelRed™** fluoreszcens festéket, mely a plazmidok gélben történő láthatóvá tételére szolgál. A folyékony gél a gélöntő formába öntöttem és belehelyeztem a zseb kialakításához szükséges műanyag fésűt. A gél szilárdulása után a fésű eltávolításával, a fésű helyén kis mélyedések, zsebek maradnak a gélben. Az agaróz gél után a futtató pufferrel (TAE puffer) feltöltött gélelektroforézis kádba kell helyezni. Itt történik meg a minták zsebekbe pipettázása. Az elektroforézis leggyakrabban 90 V-on 45 percig tartott.



**9. ábra. Agaróz gél öntésének sematikus ábrája.**

A gélfuttatás végeztével ultraibolya fény alatt (254 nm-en) látható sikeres tisztítás, vagy izolálás után a DNS minta.

Referenciaként minden alkalommal DNS molekulaszúly markert (DNS markert) is kell futtatni. A DNS molekulaszúlymarker egy gyárilag kialakított, különböző méretű (bázispár hosszúságú) DNS szakaszokat tartalmazó elegy. Gélelektroforézis során egy DNS szakasz minél több bázispárból áll (minél hosszabb), annál lassabban halad a gélben, míg a kisebb DNS darabok gyorsabban haladnak, a gélben messzebbre jutnak. Így a DNS markerben lévő különböző hosszúságú DNS szakaszok létrázatot alakítanak ki, mely segítségével az általunk futtatott minták mérete, és (hozzávetőlegesen) a minta DNS tartalmának mennyisége is meghatározható.

## 5 Eredmények

A tesztek megkezdése előtt megvizsgáltam, hogy a kapott részecskékből készített vizes diszperziókban a szilárd részecskék mennyi idő alatt ülepednek le. Ez a MNP-k molekuláris biológiai felhasználhatósága szempontjából nagyon fontos tulajdonság, ugyanis, ha az ülepedés gyors, kevesebb biológiai minta (esetünkben DNS molekula) tud a MNP-k felületéhez kötődni.

Az elkészített diszperziók ülepedésének adatait a **3. táblázat** foglalja össze.

**3. táblázat. 20 mg/ml-es mágneses nanorészecske diszperziók ülepedési ideje (s).**

| Mérés száma | Ülepedési idő [s] |               |               |            |
|-------------|-------------------|---------------|---------------|------------|
|             | vas-citrát        | kobalt-ferrit | mangán-ferrit | réz-ferrit |
| 1           | 4,82              | 28,69         | 2,18          | 1,40       |
| 2           | 4,48              | 27,29         | 2,29          | 1,19       |
| 3           | 4,04              | 31,12         | 2,06          | 1,11       |
| 4           | 5,43              | 27,65         | 2,77          | 1,3        |
| 5           | 4,52              | 26,31         | 2,66          | 1,35       |
| Átlag       | 4,66              | 28,21         | 2,39          | 1,27       |
| Szórás      | 0,51              | 1,83          | 0,31          | 0,11       |

Az eredmények alapján azt láttam, hogy a mangán-ferrit és a réz-ferrit esetén kiemelten fontos, hogy a diszperzió összeállítása után az elegy azonnal felhasználásra kerüljön, mert ezeknél a részecskéknél volt legkevésbé stabil a diszperzió (mangán-ferrit esetén átlagosan 2,39 s, míg réz-ferrit esetén 1,27 s).

### 5.1 Plazmid DNS mágneses nanorészecskékhez való reverzibilis kötődésének vizsgálata

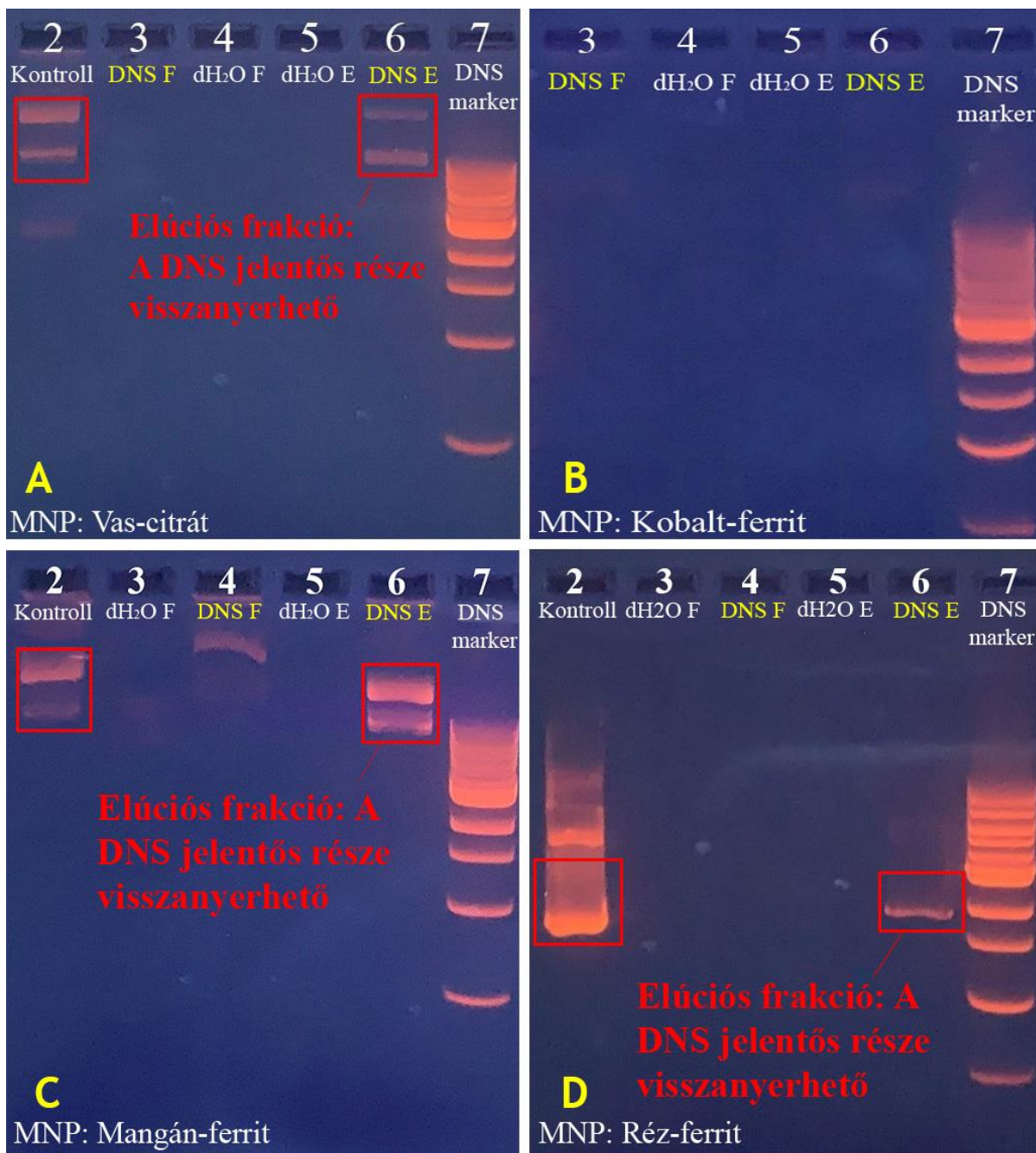
A tesztelt mágneses nanorészecskéknél vizsgálni kellett, hogy alkalmazhatóak-e előre tisztított plazmid DNS reverzibilis kötésére, valamint, hogy közvetlenül a sejtlizátumból való DNS izolálásra is felhasználhatóak-e. Az első esetben azt lehet eldönteni, hogy a vizsgált nanorészecske a későbbiekben felhasználható lesz-e DNS-t tartalmazó enzimátikus reakcióelegyekből (PCR reakcióelegy, restrikciós/modifikációs enzimeket tartalmazó reakcióelegy) a termék DNS molekulák kinyerésére, reakcióelegyből való kitisztítására. A második esetben pedig magából a bakteriális sejtekből való DNS kinyerés (izolálás) a cél. Ez

utóbbi felhasználási mód lehetővé tenné, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő oszlopos DNS izoláló készleteket saját készítésű mágneses részecskékel való izolálási módra cseréljük.

Először tehát a kereskedelmi forgalomban kapható GenElute™ készlet segítségével izoláltam plazmid DNS-t, majd az így kapott tiszta DNS oldatot használtam fel a különböző mágneses nanorészecskék reverzibilis DNS kötési tulajdonságainak meghatározására (**7. ábra**). A vizsgálatok során két plazmid típust alkalmaztam (**pBAD24** vagy a **pBtKS+**). Erre azért van szükség, mert a különböző típusú MNP-k DNS megkötési hatékonysága eltérő lehet alacsony kópiaszámú plazmidok (pl. pBAD24) és magas kópiaszámú plazmidok (pl. pBTKS+) esetén. A kísérletek elvégzésekor azonban nem mindig tudtam szisztematikusan haladni és minden részecskét mindkét plazmid típusal is tesztelni. Így az egyes teszteknel mindig feltüntettem, hogy adott esetben melyik volt az éppen rendelkezésre álló plazmid.

A MNP-k reverzibilis DNS kötő tulajdonságának vizsgálatakor az MNP-DNS közös inkubálást követően a mintákat tartalmazó Eppendorf csöveket mágneses térbe helyeztem, ezzel megkötve a mágneses részecskéket és a hozzájuk reverzibilisen kötődő plazmid DNS-t is. A felülúszót lepipettázva (**DNS F**), és különböző mosási lépéseket követően elúciót hajtottam végre (ez lesz a **DNS E**). Az így kapott elúciós mintát gélelektroforézis segítségével összehasonlítottam a kiinduláshoz használt GenElute™ oszlopos rendszerrel izolált DNS mintával (+ **kontroll**). A teszt során negatív kontrollt is használtam. Ebben az esetben a vizsgálati metódus a korábbival teljesen megegyezett, de itt a minta nem tartalmazott plazmid DNS-t, helyette ultratiszta vizet használtam a plazmid DNS mintával ekvivalens mennyiségben. Az eredményként bemutatott ábrákon (**10. ábra. A-D**) minden esetben a negatív kontroll felülúszó frakciója (**dH<sub>2</sub>O F**), és a negatív kontroll elúciós frakciója (**dH<sub>2</sub>O**) is szerepel.

Ahogy a **10. ábra** is mutatja a vas-citrát, a mangán-ferrit és a réz-ferrit MNP-knél csak az elúciós frakciónál (**DNS E**) volt kimutatható DNS (**10. ábra. A, C, D** jelű gélképeknél a 6. oszlop), melynek mennyisége közel olyan volt, mint amennyi a kiindulási minta (+ kontroll) DNS tatalma volt (**10. ábra. A, C, D** gélképek 2. oszlopa). Ez azt jelenti, hogy ezen MNP-k képesek reverzibilisen kötni a vizsgált plazmid DNS-eket, és az alkalmazott elúciós körülmények is megfelelőek voltak. Kobalt-ferrit részecskék esetén azonban a gélképen DNS molekulára vonatkozó specifikus jel nem volt látható sem a felülúszó frakcióban (**DNS F**), sem az elúciós frakcióban (**DNS E**), ami azt jelenti, hogy ebben az esetben a DNS irreverzibilisen kötődött a kobalt-ferrit részecskékhez és a részecskékről nem sikerült azt leválasztani (**10. ábra. B** jelű gélkép).



10. ábra. DNS-MNP reverzibilis kötődési tesztek gélelektroforetikus képeinek összehasonlítása. Az A, B, C ábrákon bemutatott teszteknel a kiindulási DNS minta pBAD24 plazmid, az ábra D jelű részén a kiindulási minta a pBtKS+ plazmid

Összességében tehát elmondható, hogy a kísérlet elvégzése után és a vizuális kiértékelést követően látható, hogy vas-citrát, mangán-ferrit és réz-ferrit MNP-k esetén sikeresek voltak az elúciós lépések, és sikerült jó hatékonysággal a részecskéhez kötött DNS molekulákat visszanyerni.

## 5.2 Plazmid DNS közvetlenül bakteriális sejtlyázátumból való izolálása mágneses nanorészecskékkel

A reverzibilis kötődések vizsgálata után megállapítható, hogy mely részecskék lehetnek potenciálisan alkalmasak arra, hogy összetettebb, többféle makromolekulát is tartalmazó elegyből is specifikusan ki tudjuk izolálni plazmid DNS-t.

A kiindulási sejtszuszpenzió sejtjeinek feltárása után magát a sejtlyázátumot együtt inkubálva a mágneses részecskékkel a sejtekből felszabaduló DNS, megfelelő körülmények között, a MNP-hez tud kötődni (**8. ábra**). Az eljárás során itt is külön gyűjtöttem a fázissétválások során kialakuló felülúszó (**DNS F, dH<sub>2</sub>O F**) és az elúciós frakciókat is (**DNS E, dH<sub>2</sub>O E**). A kapott eredményeket a **11. ábra** mutatja be.

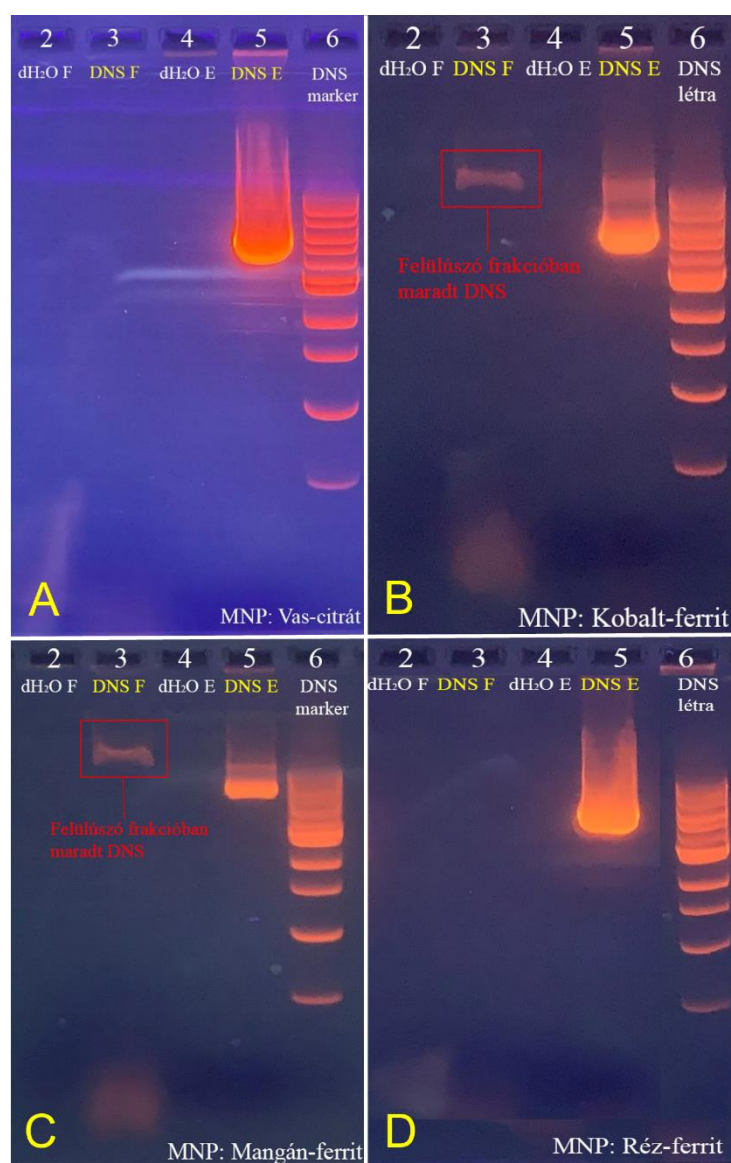
A vas-citrát (**11. ábra A**), kobalt-ferrit (**11. ábra. B**), mangán-ferrit (**11. ábra. C**) és réz-ferrit (**11. ábra. D**) MNP-kel végzett plazmid DNS izolálások esetén minden esetben a **pBAD24** plazmidot tartalmazó *E. coli* törzset használtam a kísérletekhez. A minták agaróz gélen való futtatási sorrendje a korábbiakkal megegyező módon történt:

2. oszlop: negatív, DNS mentes kontroll felülúszó frakciójából vett minta (dH<sub>2</sub>O F),
3. oszlop: DNS tartalmú mintánál a DNS kötődést követően a felülúszó frakcióból vett minta (DNS F),
4. oszlop: negatív kontroll elúció (dH<sub>2</sub>O E),
5. oszlop: A mágneses nanorészecskékről visszanyert (eluált) DNS minta (DNS E),
6. oszlop: DNS marker/DNS létra: 1 kb DNS molekulasúly marker.

A géleképeken jól látszik, hogy a DNS mentes mintákban (2. és 4. oszlop) aspecifikus jeleket nem kaptam, és DNS-t csak az elúciós frakciókban (5. oszlopok) lehetett kimutatni. Ezen kísérletekből az is kiderült, hogy bár a kobalt-ferrit részecskékről korábban nem sikerült az előre tisztított plazmid DNS molekulákat leválasztani, bakteriális sejtekből való DNS izolálására mégis használhatóak. A kobalt-ferrit és a mangán-ferrit nanorészecskékkel végzett izolálásnál gyenge DNS sáv volt látható a géleképeken az DNS F mintákban (**11. ábra. B és C** részletén a 3. oszlopok), ami arra enged következtetni, hogy ezen esetekben a teszteknel felhasznált MNP mennyiség valószínűleg nem volt elegendő. A továbbiakban ezen MNP-kel

történő plazmid izolálásokat meg kell ismételni úgy, hogy a tesztekhez több mágneses részecskét használunk fel, vagy kevesebb sejtmennyiségből indulunk ki.

Összességében tehát megállapítható, hogy az általam tesztelt mágneses nanorészecskék alkalmasak lehetnek bakteriális sejtekből történő plazmid DNS izolálására. Ezen eredmények véglegesítéséhez azonban még szükség van további kísérletekre, azaz a MNP-kel a sejtekből kinyert DNS koncentrációját nem csak kvalitatív módon, de kvantitativan is meg kell határozni, az elúciós frakciók DNS koncentrációját meg kell mérni. A MNP-kel történt DNS izolálás hatékonyságát továbbá össze kell vetni a már kereskedelmi forgalomban lévő mágneses részecskék DNS izolálási hatékonyságával.



**11. ábra.** Vas-citrát (A), kobalt-ferrit (B), mangán-ferrit (C) és réz-ferrit (D) MNP-kel történt DNS izolálás eredményének gélképei.

## 6 Eredmények összefoglalása és további tervek

Jelen munkám során különböző DNS tisztítási, izolálási módszerekkel ismerkedtem meg, és négy féle mágneses nanorészecskét teszteltem molekuláris biológiai felhasználhatóságuk szempontjából. Megállapítottam, hogy bakteriális sejtekből való plazmid DNS izolálásra mindegyik általam tesztelt mágneses részecske alkalmas lehet, de az izolálás hatékonyságát még tovább kell vizsgálni. Szisztematikusan tesztelni kell a részecskéket, hogy van-e eltérés a különböző típusú (alacsony (pl pBAD24) és magas (pBTKS+) kópia számú) plazmidok izolálási hatékonyságában. Továbbá összehasonlításokat szeretnék végezni ezen részecskék DNS izoláló hatékonysága és a kereskedelmi forgalomban lévő mágneses részecskék, valamint az oszlopos elrendezésű plazmid izoláló rendszerek hatékonysága között. A megfelelő izolálási körülmények kidolgozásával lehetőség van az izolálás folyamatát felgyorsítani, valamint a szerves oldószerek, és drága, kereskedelmi forgalomban lévő, izoláláshoz használt készletek alkalmazását kiváltani, megspórolva ezzel jelentős mennyiségű időt és anyagi forrást.

## **7 Köszönetnyilvánítás**

Ezúton is szeretném megköszönni Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, a Miskolci Egyetem FIEK (Korszerű Anyagok és Intelligens Technológiák Felsőoktatási és Ipari Együttműködési Központ) tudományos munkatársának, konzulensemnek a témakijelölésben, az elméleti és laboratóriumi munkában nyújtott segítségét, valamint a dolgozat megírásában való inspiráló segítségét és támogatását. Köszönettel tartozom Gerzsenyi Tímeának, a Miskolci Egyetem FIEK-ben dolgozó tanszéki mérnöknek az aktív támogatásért és a sok segítségért, amit a kísérletek elvégzése során nyújtott részemre. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Váradi Csabának a FIEK tudományos munkatársának, aki segítséget nyújtott az elméleti ismeretek elsajátításában. Köszönetet mondok Dr. Viskolcz Béla Tanszékvezető Úrnak, a kutató munkámban való támogatásért és a kutatási lehetőségek megteremtéséért.

## 8 Irodalomjegyzék

- [1] Dr. Váradi Csaba-Nukleinsavak, DNS replikáció, Transzkripció, Transzláció 7., előadás jegyzet, oktatási anyag, Miskolci Egyetem (2021)
- [2] 4. André P. Gerber, Walter Keller-An Adenosine Deaminase that Generates Inosine at the Wobble Position of tRNAs, *Science* 286, 1146-1149 DOI: 10.1126/science.286.5442.1146 (1999)
- [3] Szentirmai Attila, Naár Zoltán, *A mikrobiológia alapjai, Oktatási segédlet* (2000), <http://web.unideb.hu/szentirmai/mikrobanaar.pdf>
- [4] Ádám Veronika-Orvosi biokémia, ISBN: 9789633314005 (2016)
- [5] [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory\\_and\\_General\\_Biology/Book%3A\\_Introductory\\_Biology\\_\(CK-12\)/07%3A\\_Prokaryotes\\_and\\_Viruses/7.03%3A\\_Prokaryote\\_Structure](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_Introductory_Biology_(CK-12)/07%3A_Prokaryotes_and_Viruses/7.03%3A_Prokaryote_Structure)
- [6] Szekeres Barbara Gabriella, Szűcs-Somlyó Éva, Lehel József, Kővágó Csaba, *Nanorészecskék – múlt, jelen, jövő*, DOI:<https://doi.org/10.29179/EgTud.2020.1-2.16-38> (2020)
- [7] Application of Magnetic Nanoparticles in RNA and DNA Separation, <https://www.cd-bioparticles.com/support/application-of-magnetic-nanoparticles-in-rna-and-dna-separation.html>
- [8] Chen-Li Chiang, Ching-Shan Sung, Ting-Feng Wu, Chuh-Yean Chen, Chiung-Yuen Hsu, Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells, DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.05.017 (2005)
- [9] Slavko Kralj, Darko Makovec, Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02328> (2015)
- [10] [https://hu.wikipedia.org/wiki/Molekul%C3%A1ris\\_biol%C3%B3gia](https://hu.wikipedia.org/wiki/Molekul%C3%A1ris_biol%C3%B3gia)
- [11] [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_extraction](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction)
- [12] [https://en.wikipedia.org/wiki/Spin\\_column-based\\_nucleic\\_acid\\_purification](https://en.wikipedia.org/wiki/Spin_column-based_nucleic_acid_purification)

- [13] Philippova O, Barabanova A, Molchanov V, Khokhlov A. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *Eur Polym J.* 47: 542–559. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006> (2011)
- [14] Majidi S, Zeinali Sehrig F, Farkhani SM, Soleymani Goloujeh M, Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol.* 1–13. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.982802> PMID: 25435409 (2014)
- [15] Singh D, McMillan JM, Liu XM, Vishwasrao HM, Kabanov A V., Sokolsky-Papkov M, et al. Formulation design facilitates magnetic nanoparticle delivery to diseased cells and tissues. *Nanomedicine.* 2014; 9: 469–485. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.4> PMID: 24646020).
- [16] <http://core-genomics.blogspot.com/2012/04/how-do-spri-beads-work.html>,
- [17] Phil Oberacker, Peter Stepper, Donna M. Bond, Sven Höhn, Jule Focken, Vivien Meyer, Luca Schelle, Victoria J. Sugrue, Gert-Jan Jeunen, Tim Moser, Steven R. Hore, Ferdinand von Meyenn, Katharina Hipp, Timothy A. Hore, Tomasz P. Jurkowski, Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation,, *PLOS Biology*, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000107> (2019)
- [18] *Magnetic bead coatings: Today and tomorrow* Edited by Dr. Sergi Gassó & Dr. Lluís M. Martínez, <https://cdn2.hubspot.net/hub/213437/file-2210845694-pdf/docs/SEPMAG-Magnetic-Bead-Coatings-Today-and-Tomorrow.pdf>
- [19] Ilosvai Mária Ágnes, *Biológiai szeparációs műveletekre alkalmazható mágneses nanorészecskék szintézise és jellemzése, tudományos dolgozat, XXXV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia*
- [20] Vanyorek, L. et al., *Journal of Dispersion Science and Technology*, 42:5, 693-700, doi:10.1080/01932691.2019.1708380