

36. OTDK Biológia szekció

SARS-CoV-2 vírus kimutatása RNS extrakció nélkül RT-qPCR-el

Hallgatók: László Szilvia - Génsebészeti szak, IV. év

Tompos Gellért - Génsebészeti szak, IV. év

Témavezetők: dr. Bálint Emese-Éva - Biomérnöki Tanszék

drd. Salamon Pál - Biomérnöki Tanszék

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Biomérnöki Tanszék – Csíkszereda
Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház Molekuláris Diagnosztika Kutatólaboratóriuma

Csíkszereda

2022. május 10.

Tartalomjegyzék

1. Kivonat.....	3
2. Bevezetés	4
2.1. Sejtfeltárás.....	5
2.1.1. Optikai sejtfeltárás	6
2.1.2. Mechanikai sejtfeltárás.....	6
2.1.3. Ultrahangos sejtfeltárás	6
2.1.4. Elektromos sejtfeltárás	7
2.1.5. Kémiai sejtfeltárás.....	7
2.1.6. Hővel történő sejtfeltárás	8
2.2. Valós idejű reverz transzkripció polimeráz - láncreakció (RT-qPCR).....	8
2.2.1. Valós idejű polimeráz láncreakció detektálási módszerek.....	9
3. Célkitűzés.....	15
4. A kutatás módszertan	16
4.1. Elemzett minták	16
4.1.1. A vírus transzport médium (VTM)	16
4.2.1. Extrakcióval történő RNS kivonás és tisztítás	16
4.2.3. Valós idejű reverz transzkripció polimeráz - láncreakció (RT-qPCR).....	18
4.3. Statisztikai elemzés	19
4.4. Normalizáció a VTM -re nézve.....	19
5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása	20
5.1. FAM.....	20
5.2. Cal Red 610.....	22
5.3. Quasar 670	25
5.4. Az eredmények statisztikai kiértékelése	28
6. Következtetés	29
7. Köszönetnyilvánítás	30
8. Irodalomjegyzék.....	31
9. Mellékletek.....	34

1. Kivonat

A súlyos akut légzőszervi szindrómát kiváltó SARS-CoV-2 koronavírus 2019. év decemberi megjelenése és gyors terjedése napjainkig tartó világjárványt okozott. Megnőtt az igény a fertőzöttek molekuláris diagnosztikai módszerrel való azonosítására. Erre a kvantitatív reverz transzkripción alapuló polimeráz-láncreakció (RT-qPCR) a legalkalmasabb módszer. A járvány elején azonban korlátozott mennyiségben álltak rendelkezésre a minták feldolgozásához szükséges anyagok és eszközök, amelyek az RT-qPCR-t megelőző RNS extrakcióhoz, valamint az RT-qPCR-hez szükségesek. Mindezek mellett ezen folyamat időigényes, amely a sürgősségi minták feldolgozása szempontjából nem kedvező.

Tudományos kutatásunk célja az RNS extrakció optimalizálása a SARS-CoV-2 vírussal fertőzött kórházi betegek diagnosztizálására, amely során a virális RNS extrakciója nélkül is detektálható annak jelenléte. Ezáltal jelentősen csökken a tesztelés idő-, illetve költségigénye, mindeközben egyszerűbb a módszertan, továbbá kisebb környezeti terheléssel is jár ezen folyamat. Munkánk során az izolálást kiváltó hőkezelés megfelelő paramétereit határoztuk meg annak érdekében, hogy az így végzett mérések eredménye, valamint az extrakcióval mért eredmények között a korreláció megfelelő mértékű legyen. Mérési eredmények kiértékelése nyomán azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a teljes extrakciós eljárás kiküszöbölhető a SARS-CoV-2 vírussal fertőzött betegek RT-qPCR módszerrel való diagnosztizálása során. A mintából megfelelő arányban való hígítással és optimális hőmérsékleten való kezeléssel ugyanolyan hatékonysággal nyertük ki a detektálni kívánt RNS-t, mint extrakcióval. Ezáltal bizonyítást nyert, hogy a SARS-CoV-2 vírus jelenlétét egy mintában ki lehet mutatni RNS izolálás nélkül, csupán hőkezeléssel.

2. Bevezetés

A 2019. évi koronavírus-betegség (COVID-19) egy újonnan felbukkanó kóros állapot a súlyos akut légúti szindróma 2. számú koronavírus (SARS-CoV-2) - által okozott légúti fertőzés, amelyet először 2019 decemberében ismertek fel a kínai Hubei tartománybeli Wuhanban. A vírus szekvenálása során arra a következtetésre jutottak, hogy a SARS-CoV-2 egy béta-koronavírus, amely szorosan kapcsolódik a SARS-CoV-1-hez. A β -koronavírusok a *Coronaviridae* családba tartoznak, burkolt RNS-vírusok, amelyek pozitív szállal rendelkeznek. Ebben az évszázadban a β -koronavírusok nemzetségének több tagja is megjelent, zoonózisos járványos fertőzéseket okozva, beleértve a súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 1-et (SARS-CoV-1) és a közel-keleti légúti koronavírus is (MERS-CoV-1). A β -koronavírussal való megfertőződés erőteljes proinflammatorikus citokin felszabaduláshoz vezethet (például: a tumor nekrosis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β és interferon (IFN)- γ 3,4,5,6). (S. J. Lee, Channappanavar és Kanneganti 2020) Bár ezek a citokinek a veleszületett immunrendszerünk immunválaszának kritikus összetevői (és segítik a vírusfertőzések tisztulását) a proinflammatorikus citokinek szabályozatlan felszabadulása citokinviharhoz vezethet, amely a gyulladásos sejtpusztulás (nekroptózis, piroptózis) kiváltásával súlyos károkat okoz a gazdaszövetekben és szervekben. (Arias-Reyes et al. 2020).A koronavírusok genomja 4 fő strukturális fehérjét kódol: S, N, M és E, ahol S a tüske fehérje, N a nukleokapszid fehérje, M a membrán fehérje és E a burkoló fehérje (Zheng és mtsa. 2021; Szabó és mtsa. 2020).

A nagy felületi nyúlványokat az S fehérje alkotja, a genomi RNS-t körülvevő nukleokapszid helikális szimmetriájáért az N fehérje felelős, a vírus legkisebb szerkezeti fehérjének, az E fehérjének feltehetőleg a vírus “bimbózásában”, míg a háromszoros kiterjedésű M transzmembránfehérjének a transzmembrán folyamatokban van szerepe. Ezen specifikus szekvenciák jelenlétét vizsgálva állapítható meg egy mintáról, hogy SARS-CoV-2 vírusra pozitív-e (Szabó és mtsa. 2020).

A vírus standard molekuláris diagnosztikai tesztje egy többlépcsős eljárás, amely magában foglalja a virális RNS extrakcióját és kvantitatív reverz transzkripción alapuló polimeráz-lánreakciót (RT-qPCR-t). A méréseket diagnosztikai laboratóriumban, korlátozott számú automatizált platformon végzik és bár számos vállalat gyárt PCR-, valamint az RNS feltárásához szükséges kitteket, a vírus nagyobb terjedési hullámai alatt igencsak korlátozott mennyiségben voltak elérhetők a speciális reagensek. Ez jelentős erőfeszítésekhez vezetett annak érdekében, hogy

a vizsgálati kapacitást növelni tudják, nagy laboratóriumokat építsenek ki meglévő kutatási berendezésekkel, és az RNS-t olyan módon vonják ki, amely lehetővé teszi a nem specifikus reagensek és műanyag fogyó eszközök használatát (Grant és mtsa. 2020; Smyrlaki és mtsa. 2020).

A COVID-19 világ méretű járvány az Egyesült Királyságban és egész Európában súlyos korlátokat támasztott a molekuláris diagnosztikához szükséges laboratóriumi berendezések, reagensek és fogyóeszközök elérhetőségében (olyanokban is, amelyek nem a SARS-CoV-2 jelenlétének a kimutatásához szükségesek). Ez késleltette az egészségügyi ellátáshoz és a lakossági szűréshez szükséges vizsgálati kapacitás növelésének lehetőségét (Zheng és mtsa. 2021; S. J. Lee, Channappanavar és Kanneganti 2020).

2.1. Sejtfeltárás

A sejt minden élőlény funkcionális alapegysége, amely szaporodásra és anyagcserére képes. A sejtben található a szervezetre jellemző összes genetikai információ, a sejtmagban található a genomi DNS (vagy RNS), a mitokondriumba a mitokondriális DNS (vagy RNS) és a növények esetében pedig a kloroplasztisba a plasztisz DNS (vagy RNS). Mivel az örökítőanyaghoz csak úgy lehet hozzáférni, hogy ha megszűnik a sejt mechanikai szilárdságát és védelmét biztosító sejthártya, ezért különböző módszereket dolgoztak ki a sejtfeltárás minél hatékonyabbá tételére (Ben-Ami és mtsa. 2020).

A sejtek feltárásának módszereit két fő csoportba lehet besorolni, mechanikai és nem - mechanikai. A mechanikai módszerek elkülöníthetők az alapján, hogy szilárd vagy folyékony fázisban történik a feltárás. Elkülönítünk akusztikus (ultrahanggal), kevertetés, homogenizátorok, malmok (örlés) segítségével történő sejtfeltérési eljárásokat. Abban az esetben, ha a sejtfeltérás nem- mechanikai, szárításról (levegő-, vákuum-, fagyasztó-, oldószer esetében) vagy lízisről beszélhetünk. A lízist további három csoportra lehet osztani, annak megfelelően, hogy milyen hatásnak van kitéve. Beszélhetünk fizikai(pl: optikai, mechanikai, elektromos és hősök), kémiai-(pl: detergenssek és lúgok), vagy biológiai sejtlízisről (pl: enzimek és fágok)(Ambrosi és mtsa. 2021; Nagappan és mtsa. 2019).

2.1.1. Optikai sejtfeltárás

Az impulzuslézeres mikronyalábok által indukált sejtízis során egy 532 nm-es lézer nanoszekundum időtartam alatt történő impulzusát egy nagy felbontóképességű objektív lencsén keresztül irányítják, és így egy kis pontra fókuszálják, ahol lokalizált plazmaképződés következik be (Brown és Audet 2008). Ennek eredményeképpen fizikai lökéshullám keletkezik, majd kavitációs buborék jön létre, amely néhány μs időtartam során kitágul és összehúzódik, ezzel a célzott terület középpontja közelében elhelyezkedő sejtek lízisét okozva (Ensign és Wolfe 1965).

2.1.2. Mechanikai sejtfeltárás

A közvetlen mechanikai lízis éles, nanoszemcsés felületeket, úgynevezett "nanokések"-et használ, mint eszközt az egyes sejtek líziséhez. Ezzel a módszerrel a sejteket egy 3 μm széles fogazott rácson (függőlegesen 0,34 μm távolságra egymástól éles gerincek találhatók, amelyeket 3 μm széles rések választanak el egymástól) keresztül préselik. Az ilyen "nanokések" tömbön megfelelő sebességgel áthaladó sejtek általában hatékonyan lizálódnak (Brown és Audet 2008). Egyes sejtek azonban a tömb felfelé eső felületén megtapadnak, és lassan megnyúlnak a "nanokések" között, végül több vezikulára válnak szét. Bár ez a módszer 99%-os sejtízist eredményezett a tripán-kék festési próba szerint, a lízis utáni szabad fehérje mérése azt mutatta, hogy az összes fehérjének csak 6%-a szabadult fel. A számok közötti eltérés azt jelzi, hogy a fehérje nagy része a lízis után a vezikulákban rekonstruálódott, vagy olyan sejtekben maradt, amelyek csupán porózusak voltak, nem pedig teljesen felbomlottak (Di Carlo, Jeong és Lee 2003).

2.1.3. Ultrahangos sejtfeltárás

A szonikáció során ultrahang hullámok segítségével lokalizált magasnyomású területeket hoznak létre, ami kavitációt eredményez, amely roncsolja a sejteket (Lorincz, A. és Neményi 2002). A szonikáció egyik hátránya, hogy ha nem megfelelő ideig szonikáljuk az elegyet, az felmelegedhet és a fehérjék kicsapódásához vezethet (Brown és Audet 2008). Ezért az a megfelelő megoldás, hogy a sejteket először gyenge detergenssel, például digitoninnal kezelik, így a szonikáció 3 másodpercen belül képes a sejtek lízisére (Ensign és Wolfe 1965).

2.1.4. Elektromos sejtfeltárás

A 0,2-1,5 V nagyságrendű transzmembrán potenciál generáló elektromos mezők a pórusokat képező lipid kettősréteg felszakadását okozzák, és megfelelő nagyságú elektromos térerősség, valamint expozíciós idő esetén sejtlyízishez vezetnek. A sejtlyízist elősegítő küszöbérték eléréséhez szükséges elektromos térerősség tehát a sejtmérettől, formától, továbbá a membrán összetételétől (fluiditás) függ. Megállapították, hogy 10 μ s-os impulzusok elegendőek a sejtlyízishez, ha 40 V-os csökkenést és 20 μ m-es elektródák közötti rést használnak (D. W. Lee és Cho 2007; Brown és Audet 2008).

2.1.5. Kémiai sejtfeltárás

2.1.5.1. Detergenssel történő sejtlyízis

A detergens alapú lyízis egy kíméletes módszer, amely emlőssejtek, baktériumsejtek, élesztőgombák és növények esetében alkalmazható. A sejtszuspenziókat kíméletesen centrifugálják, majd a sejtmembránt megbontó detergenseket tartalmazó lyízisoldatban újra szuszpendálják.

A detergens alapú lyízis a detergens sejtmembránba való beépülésével jön létre, ami a membránban lévő lipideket és fehérjéket szolubilizálja, pórusokat hozva létre a membránon belül, és végül teljes sejtlyízist eredményez. A detergens lyízist jól kidolgozták a tömeges biokémiai vizsgálatokhoz, így jól alkalmazható egysejtes szinten is. Erre a célra számos különböző detergens használható, beleértve az ionos, nem ionos és ikerionos detergenseket. A felületaktív anyag megfelelő kiválasztása fontos, mivel befolyásolhatja a sejtlyízis sebességét, valamint a fehérje extrakció hatékonyságát. Az erős ionos detergens, mint például a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) képes biztosítani másodpercek alatt a sejtek lyízisét és a sejtekből származó fehérjéket denaturálását. Ez a módszer előnyös a fehérjék későbbi elválasztásához micelláris elektrokinetikus kapilláris elektroforézissel, amely a molekulatömeggel arányos negatív töltést biztosít a fehérjéknek, azonban kevésbé alkalmas, ha a kivont fehérjét fehérjekötési vagy enzimaktivitási vizsgálatokban kívánják felhasználni (Brown és Audet 2008).

2.1.5.2. Lúggal történő lízis

A kémiai sejtfeltárás egy újszerű módszere a OH^- ionok elektródokon történő előállítására támaszkodik. Megfigyelték, hogy a sejtek (HeLa, CHO, eritrociták) kizárólag a katód közelében lizálhatók, ha a palládium elektródák között kis, 43 V cm^{-1} elektromos teret alkalmaznak. A sejtízis eredményeinek szimulációkkal való összehasonlításával megállapították, hogy a lízis olyan régiókban következett be, ahol a puffer elektrolízise 20 mM feletti OH^- koncentrációt generál, ami jól illeszkedett a NaOH hozzáadásával vizsgált sejtek líziséhez szükséges OH^- határértékhez (Brown és Audet 2008).

2.1.6. Hővel történő sejtfeltárás

Ez a módszer alkalmazható emlős- vagy baktériumsejtek szuszpenziójára.. A sejtmembránra hatást lehet gyakorolni a hőmérséklet hirtelen növelésével vagy csökkentésével. A hőmérséklet hirtelen megnövelésével a sejtmembrán roncsolódik, a sejtalkotók pedig kikerülnek az extracelluláris térbe. Centrifugálás hatására a nagyobb tömegű sejtalkotók leülepednek a pelletbe, míg a kisebb tömegű sejtalkotók (RNS, DNS) a felülúszóban maradnak. A hőmérséklet gyors csökkentése érdekében általában a sejtsuszpenziót folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztják. A felolvasztás után, a folyamatot többször megismételve lízispufferben pipetázással vagy enyhe vortexeléssel újraszuszpendálják az elegyet (Baek, Min és Park 2010; Byrnes és mtsa. 2021; Guan és mtsa. 2021; Genoud és mtsa. 2021).

2.2. Valós idejű reverz transzkripció polimeráz - láncreakció (RT-qPCR)

A reverz transzkripció polimeráz láncreakció (a továbbiakban: RT-qPCR) egy kifejezetten genomi RNS kimutatására kifejlesztett PCR-módszer, amely nagy mennyiségű minta kvalitatív vizsgálatára alkalmas és néhány óra alatt gyors, megbízható eredményt produkál (Mackay, Arden és Nitsche 2002). A technika két egymást követő reakción alapul. Az első reakcióban a reverz transzkriptáz által az RNS komplementer DNS-é (a továbbiakban: cDNS) alakul, amely templátként szolgál a második reakcióban lejátszódó polimeráz láncreakcióban. A génspecifikus primerek segítségével és az ismétlődő hőciklusok hatására a cDNS templátból kiindulva elkezdődik a DNS molekulák sokszorozódása. Az amplifikáció flurenszcensen jelölt

hidrolízis szondák segítségével detektálható és számszerűsíthető (Navarro és mtsa. 2015; Filiztekin és Ozkaya 2021).

A valós idejű polimeráz láncreakció (a továbbiakban: qPCR) a molekuláris diagnosztikában manapság széles körben elterjedt. Megbízhatósága, gyorsasága, reprodukálhatósága, érzékenysége és alacsony költségei alkalmassá teszik arra, hogy a mezőgazdaságtól, az élelmiszeriparon, toxikológián és farmakológián át az orvostudományig felhasználják. A kiindulási RNS/DNS mennyiség pontosan meghatározható, az eredmények kiértékelése pedig zárt rendszerben történik, így csökken a szennyeződés lehetősége, valamint egyszerűbb a minták további felhasználása. Az említett technológiai sajátosságok miatt a qPCR eredményei kvantitatívak. Alkalmas betegségek diagnosztizálására, kvalitatív eredményeivel támogatva például a klinikai diagnosztikát, amely által a 2019 óta tartó világijárvány időszakában a köztudatba is bekerült. A qPCR-műszer alapvetően egy termikus cikláló egy beépített gerjesztő fényforrással (lámpa, lézer vagy LED), egy fluoreszcens detektáló rendszerrel és egy szoftverrel, amely a rögzített fluoreszcens jelek alapján megjeleníti a DNS amplifikáció görbáját (Mackay, Arden és Nitsche 2002; Navarro és mtsa. 2015).

2.2.1. Valós idejű polimeráz láncreakció detektálási módszerek

2.2.1.1. A kettősszálú DNS-hez kötődő festékek

A fluoreszcens jelet kibocsátó ágens és a PCR detektálás specifikussága alapján csoportosítani lehet a qPCR módszereket. Az egyik csoportba a kettős szálú DNS-hez kapcsolódó anyagokat használó módszerek tartoznak (SYBRGreen I, EvaGreen, YO-PRO 1, SYBRGold BEBO, BOXTO, stb). Ezek alkalmasak specifikus és nem specifikus amplifikálódott termékek, valamint primer dimerek kimutatására (Mackay, Arden és Nitsche 2002). Az egyik leggyakrabban használt festék a két pozitív töltéssel rendelkező, aszimmetrikus szerkezetű cianin festék, a SYBRGreen. Az említett pozitív töltések normál PCR körülmények között nagyban segítik a festék DNS-hez való kötődését. A DNS- festék komplex elnyeli a kék fényt 497 nm-en és zöld fényt bocsát ki 520 nm-en, amelyet a detektáló rendszer rögzít a meghosszabbítási szakaszban. Jelentősen zavarhatja az érzékelést a primer dimerek létrejötte. Az amplikonok specifikitásának

ellenőrzése céljából érdemes olvadási görbe analízist végezni, amely a hőmérséklet és az idő függvényében ábrázolja a fluoreszcens jel kibocsátást (Taylor és mtsa. 2010). A módszer alacsony költségei és egyszerűsége miatt nagyon népszerű, ugyanakkor például a SYBRGreen festéknek van PCR gátló hatása, valamint stabilitása változik a körülményekkel. A kettős szálú DNS-hez kapcsolódó festékeket alkalmazzák egy vagy több különböző DNS szekvencia, kórokozók, génexpresszió, GMO-k és SNP-k (Single Nucleotid Polimorfism) kimutatására (Navarro és mtsa. 2015; Joyce 2002).

2.2.1.2. Oligonukleotidokhoz kapcsolt fluorofórok

A másik csoportba az oligonukleotidokhoz kapcsolódó fluorofórokkal, oligoszondákkal történő detektálási módszerek tartoznak, amelyek csak a specifikus amplifikációs termékeket detektálják. Az oligonukleotidhoz bizonyos távolságra egymástól egy donor vagy riporter és egy akceptor vagy kioltó fluorofór kapcsolódik. A donor molekula gerjesztett állapotba kerül a PCR műszer gerjesztő fényforrásától, majd visszatér alapállapotba miközben energiát/fényt bocsát ki, amely kisebb energiájú és frekvenciájú, mint a fényforrásból származó. A donor által kibocsátott fényt/energiát az akceptor molekula elnyeli, kioltja a donorból származó fluoreszcens jelt, ha megfelelő közelségben van (10-100 Å). Ezt a folyamatot FRET-mechanizmusnak nevezik (fluoreszcencia-rezonancia-energiaátvitel). Az elnyelt fény hő formájában disszipálódik vagy fluoreszcens jel formájában kibocsátódik az akceptor molekula típusától függően. Amikor a donor és az akceptor molekula egymástól eltávolodik, az akceptor nem képes kioltani a donor által kibocsátott fényt. Ezt a fluoreszcens jelt méri a PCR műszer, ez alapján követhető nyomon a PCR termékek amplifikációja. Az oligonukleotid-fluorofór molekulák típusok alapján különböző csoportokra bonthatók. Működhetnek primerként a fluoreszcens szondák, lehetnek hidrolízis nyomán detektálható szondák, hibridizációs szondák, valamint analóg nukleinsav szondák (Navarro és mtsa. 2015).

A primer szondák olyan oligonukleotidok, amelyek primert és szondát is tartalmaznak egyetlen molekulában. Több csoportra bomlanak alakjuk és hatásmechanizmusuk alapján.

A hajtűprimer szondák olyan egyszálú oligonukleotidok, amelyek tartalmaznak egy génspecifikus, a célgén egy szakaszával komplementer szakaszt, ennek két végén egy-egy hajtű alakú másodlagos szerkezetet biztosító szakaszt. A hajtű két végéhez egy donor és egy akceptor

molekula kapcsolódik, amely FRET-csendesítés alatt áll egészen a hajtúszerkezet felbomlásáig. A hajtú végéhez primer is kapcsolódhat (Amplifluor vagy Sunrise és Skorpión primer szondák), melynek végén valamilyen blokkoló molekula akadályozhatja a polimeráz működését a szonda irányába (Skorpión primer szondák). Miután a szonda a célpontához kötődik, a DNS-polimeráz lemásolja a célszekvenciát. A következő denaturálási lépésben a szonda specifikus szekvenciája kötődik a komplementer régióhoz az újonnan létrehozott DNS ugyanazon szálán belül, ami fluoreszcencia-kibocsátáshoz vezet. A detektálás a denaturálási fázisban történik. Előnyei ezen szondáknak, hogy nem keletkeznek primer dimerek, a beépítetlen szondák nem növelik a háttérzajt, a másodlagos szerkezet lehetősége miatt nagyon specifikusak, nem kell bontani enzimatikusan és olcsók, mert primer és szonda is egy molekulában van (Navarro és mtsa. 2015).

A LUX primer szondák Amplifluor-hoz és Scorpions típushoz hasonlóan egy hajtú másodlagos szerkezettel rendelkező egyszálú oligonukleotidok, melyeknek végéhez primer van kapcsolva. Ezen primer guaninban gazdag részén van egy fluoreszcens donor/riporter molekula. A riporter kibocsátása a primer beépülésekor maximalizálódik, amíg a szonda szabadon van az emisszió nagyon alacsony. A kibocsátást a hosszabbítási fázisban mérjük. Ugyanazon előnyökkel rendelkeznek a már említett hajtúprimer szondák (Navarro és mtsa. 2015).

A primer szondák közé tartoznak a Cyclicon primer szondák. A molekula egy módosított oligonukleotidból áll, a végén egy riporter molekulával és egy primerrel, melyhez egy csendesítő molekula kapcsolódik. A módosított oligonukleotid és a primer az 5'-5' végükön vannak összekötve, úgy hogy kialakuljon a molekula ciklikus alakja, ezáltal a csendesítő a riporterhez közel kerülve FRET-mechanizmussal megakadályozza az emissziót a primer bekötődéséig. A primer a célszekvenciához kötődésével a ciklikus szerkezet felbomlik és a riporter eltávolodik a csendesítő molekulától és fluoreszcens jelet bocsát ki. Előnye hasonlóan a már említett primer szondákhoz a primer-szonda konstrukció. Elegendő a primer mellé csak rövid oligonukleotidot kapcsolni, ezáltal csökken a költsége. Továbbá apró módosításokkal TaqMan szondákhoz is hozzákapcsolhatók (Navarro és mtsa. 2015).

Az Angler primer szondák egy kötőanyaggal összekötött reverz primerből és egy a célszekvenciával komplementer DNS szakaszból állnak. A primeren egy fluoreszcens akceptor található, amely FRET hatásra jelt bocsát ki. Az eljárásban SYBRGold DNS-be interkalálódó festéket is használnak. A primer az olvadási szakaszban kapcsolódik a célszekvenciához, majd a polimeráz a primer meghosszabbításaként lemásolja a célzott részt. Az ezt követő denaturáció

során a szekvenciával komplementer primerhez kötött DNS szakasz meghajolva összekapcsolódik a megfelelő résszel. Az interkalálódó festék kapcsolódik a kettős szálhoz és donorként viselkedik a primer végén elhelyezkedő akceptor molekulával szemben, ezáltal az jelt bocsát ki és detektálhatóvá válik. A denaturációs fázisban történik a mérés. Előnye, hogy olvadási görbe vizsgálata nélkül is meg lehet különböztetni a specifikus és nem specifikus PCR termékeket, mivel a SYBRGold és az akceptor molekula eltérő fluorofórokkal jelölt próbákban detektálódik (Mackay, Arden és Nitsche 2002; Navarro és mtsa. 2015).

A hidrolízis szondák egy oligonukleotidból és a hozzákapcsolt fluorofór molekulából, egy donorból és/vagy akceptorból állnak. Működésük a *Taq* polimeráz exonukleáz aktivitásán alapul. Használhatók egyszeres és multiplex formátumban is vírus kimutatására, vírus/baktérium terhelés kvantitatív meghatározására, génexpresszióra, microarray validálásra, allél megkülönböztetésre, mutáció, SNP-k és GMO-k kimutatására. Több típusuk létezik, ezekből egyik a TaqMan szonda. A hosszabbítási fázisban a *Taq* polimeráz 5'-3' exonukleáz aktivitása segítségével lebontja a szonda oligonukleotid részét, mely specifikusan komplementer az amplifikálni kívánt DNS egy részével. A lebomló oligonukleotid 5' végén lévő donor és 3' végén az akceptor molekulák ezáltal egymástól távolodnak, így detektálható jel szabadul fel. A hosszabbítási fázisban történik a mérés. Tervezése és előállítása egyszerű, de figyelmetlen tervezés esetén primer dimerek jöhetnek létre (Navarro és mtsa. 2015).

A Snake próba szintén a *Taq* polimeráz 5'exonukleáz aktivitására épülő módszer. Itt a célszekvencia sokszorosítása és a fluoreszcens jel detektálása térben és időben elkülönülő folyamatok (Kutyavin 2009). Egy 5'-flap szekvenciát tartalmazó forward primer kötődik a cél DNS szekvencia előtt elhelyezkedő részhez. A polimeráz ebből kiindulva szintetizál egy antiszensz szálát, ezáltal kétszálú DNS keletkezik. A denaturációs fázis során a szálak szétválnak és egy reverz primer hibridizálódik az ellentétes szálhoz. A DNS-polimeráz meghosszabbítja a komplexet, ami újabb kettős szálú amplikont eredményez. A forward primer sablonként funkcionált a DNS-szintézishez, így a teljes szekvencia jelenik meg a szensz amplikon szál 3' végén. A következő denaturáció után a szensz amplikonon megjelenik egy hajtúszerű másodlagos szerkezet, amelyben a 3' végén található nukleotid nem illeszkedik. A hidrolízis szonda a szensz szálhoz kötődik, nagyon közel a lebegő 3' vég nukleotidhoz, létrehozva az optimális hasítási struktúrát. A riporter molekula felszabadul és az általa kibocsátott fluoreszcens jel detektálhatóvá válik (Navarro és mtsa. 2015). Nagy előnye a módszernek, hogy rövid szondákat lehet használni,

alacsony a fluoreszcens háttérsugárzás és a bemutatott próbák közül a legnagyobb mennyiségű fluoreszcens jelet bocsátja ki, ha optimalizálva van (Kutyavin 2009). Hátránya, hogy a primerek tervezéséhez speciális szoftver szükséges (Navarro és mtsa. 2015).

Egy következő csoportot alkotnak a hibridizációs szondák. Közös előnyük, hogy lehetővé teszik az olvadási görbék elemzését, ezzel támogatva az adatok kiértékelését. Ide tartoznak a FRET-szondák, a hajtű szondák, a HyBeacon próbák, az MGB próbák, ResonSense és a Yin Yang próbák. A FRET-szondák egy pár oligonukleotidból állnak, egyiknek egy riporter molekula van a végén, a másiknak egy csendesítő molekula az egyik, egy fosztát csoport pedig a másik végén. A két szonda egymáshoz közel kapcsolódik a detektálandó célszekvenciához az anelálási fázisban létrehozva a FRET hatást, amely nyomán a csendesítő molekula emisszióját detektáljuk. Tervezése, létrehozása és alkalmazása gyors és egyszerű. A multiplex formában használható kórokozók kimutatására, vírusos/bakteriális terhelés kvantitatív meghatározására, mikroarray alapú validálásra, genotipizálásra, allél megkülönböztetésre, mutáció kimutatásra és SNP-k kimutatására (Mackay, Arden és Nitsche 2002; Navarro és mtsa. 2015).

A hajtű szonda működési elve, felépítése és felhasználása hajtű primer szondával nagyon hasonló (a hajtű szondákhoz nincs primer kapcsolva), amelyről már volt szó, így ez nem kerül részletezésre. Előnyei is hasonlóak, fontos az olvadási görbék elemzése a kapott adatok értékelése során és a termodinamikai vizsgálata a szondáknak, hogy előnyösebb legyen a szondának a cél szekvenciához kapcsolódni, mint a hajtű szerkezetben vissza alakulni (Mackay, Arden és Nitsche 2002; Navarro és mtsa. 2015; Joyce 2002).

HyBeacon próbák szondái egy egyszálú oligonukleotidból, egy nukleotidhoz kötött flouoroból és a 3' végén egy hosszabbítás gátló foszfátból állnak. Működésének alapja, hogy az oldatban lévő szondák emissziója kisebb, mint a hibridizáció után, ez a különbség a hosszabítási fázisban mérhető. Előnye, hogy egyszerű, könnyen tervezhető, használható módszer és az olvadási görbe elemzést is lehetővé teszi. Alkalmazhatók egy- és többszörös analízis szekvenciában detektálásra, DNS-kvantitatív meghatározásra, genotipizálásra, SNP kimutatására és allél megkülönböztetésére (Navarro és mtsa. 2015).

Az MGB konjugált DNS szondák olyan oligonukleotidhoz kapcsolt AT gazdag helyek kedvelő tripeptidek, amelyek stabilizálják a kettős szálú DNS-t és FRET csendesítés következtében fluoreszcens jelet bocsátanak ki. Az oligonukleotidhoz egy donor és egy akceptor molekula van kapcsolva, amelyek eltávolodnak egymástól a cél DNS-hez történő hibridizáció során, ezáltal lesz

a donor emissziója érzékelhető, amelynek detektálása az anellálási fázisban történik. Előnye, hogy nő a kettős szálú DNS olvadási hőmérséklete, ezzel csökken a nem specifikus PCR termékek létrejöttének esélye, nagy mértékben lehet csökkenteni a háttér fluoreszcenciát (NFQ-sötét foltószer használatával), alkalmas mikroszekvenciák és rövid konzervált gének sokszorosítására. Egyszeres és többszörös formátumban is használhatók kórokozók kimutatására, vírus/baktérium terhelés kvantitatív meghatározására, génexpresszió vizsgálatára, microarray validálására, allél megkülönböztetésre, mutációk, SNP-k, GMO-k kimutatására, továbbá használják a törvényszéki elemzésben is (Navarro és mtsa. 2015).

ResonSense szondák felépítése, működése és alkalmazása majdnem teljesen azonos Angler® primer-szondákéval, amely már ismertette volt.

A Yin-Yang szondák két különböző hosszúságú komplementer oligonukleotidból állnak. A hosszabb szál 5' végéhez egy riporter molekula van kapcsolva, 3'-höz pedig egy hosszabbítást gátló foszfát csoport. A rövidebb komplementer szál 3' végéhez egy csendesítő molekula van csatlakoztatva. A működése kompetíción alapszik. A denaturálási hőmérsékleten a kettős szálú szonda szétválik és a hosszabb szál a cél szekvenciához fog kapcsolódni, mert erősebben tud a hosszú szál a vele komplementer hosszú cél szekvenciához kapcsolódni mint, a rövidebbhez. Ezáltal a riporter molekula eltávolodik a csendesítőtől, a kibocsátás elnyelése megszűnik és az anellálási fázisban mérhetővé válik a riporter molekula emissziója. Előnye, hogy nagyon specifikus a kötődése a célszekvenciához, tervezése és szintézise is jóval egyszerűbb, mint a két festéket használó módszerek szondái. Egyszerű és multiplex formátumban is felhasználhatók, kórokozók, mutációk kimutatása vagy a vírusos/bakteriális terhelés mennyiségi meghatározása és SNP-k genotipizálása is elvégezhető a YingYan szondákkal. Ezen túlmenően, az ilyen szondák használatát javasolják az mRNS-ek élő sejtekben történő nyomon követésére vagy a bioszenzorok és biochipes detektáló eszközök építéséhez (Navarro és mtsa. 2015).

3. Célkitűzés

Kutatásunk célja az RNS extrakció optimalizálása a SARS-CoV-2 vírussal fertőzött kórházi betegek diagnosztizálására, amely során a virális RNS extrakciója nélkül is detektálható a SARS-CoV-2 jelenléte.

Munkánk során az izolálást kiváltó hőkezelés megfelelő paramétereinek meghatározását tűztük ki célul, annak érdekében, hogy meghatározzuk a korrelációt az így végzett mérések eredménye, valamint az extrakcióval mért eredmények között. Az RNS izolálás nélküli módszer esetén szükséges meghatározni az optimális hígítási arányt a sikeres PCR reakció érdekében. Tehát célunk megtudni, hogy a mintából a megfelelő arányban való hígítással és optimális hőmérsékleten való kezeléssel ugyanolyan hatékonysággal nyerhető-e ki a detektálni kívánt RNS, mint a kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével, extrakcióval.

4. A kutatás módszertana

4.1. Elemzett minták

Kutatásunkat a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház COVID 19 diagnosztika laboratóriumában végeztük. A minták a kórház betegeitől származtak, amelyeket anonim módon, az embereken végzett kutatások etikai felülvizsgálatáról szóló román törvénynek megfelelően kezeltük. Minden esetben újra megvizsgáltuk, hogy az adott mintákból kimutatható-e a Sars-CoV-2 vírus. Ezen kívül voltak olyan minták is, amelyek olyan emberektől származtak, akik hivatalos okok miatt teszteltették magukat, mert munkahelyi elvárás volt, vagy utazni készültek. A feldolgozott mintákat a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórházban két darab egyszerhasználatos pamut végű mintavevő pálcikával gyűjtötték, 10 mL-es 3 mL VTM-et tartalmazó (REF C67VC1001, LOT 20210623) vírus transzport médium tubusban. A feldolgozásig a mintákat hűtőben tároltuk, 4 C°-on a roncsolódás megelőzése érdekében.

4.1.1. A vírus transzport médium (VTM)

Az általunk használt mintavevő tubusokban található VTM komponensei (REFC67VC1001, LOT 20210623) befolyásolják a PCR reakció lefolyását (Zóka, Tresó és Bekő 2021) (lásd. Következtetések). Minden tubusban 3 ml VTM található. A forgalmazó által feltüntetett összetétel a következő: D-Hank kiegyensúlyozott sóoldat, HEPES, marha szérum albumin, L (+)- cisztein, L-glutaminsav, szacharóz, vankomicin, gentamicin, nisztatin, fenolvörös.

4.2.1. Extrakcióval történő RNS kivonás és tisztítás

Amint a 4.1 -es fejezetben bemutatottuk, a kutatásunkhoz használt mintákat a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórházban tartózkodó betegektől származó többletmintákból származtak. A mintából való RNS kivonására a AccuPrep® Dx Viral RNA Extrakciós (Bioneer Corporation, REF K-3033M, LOT: 20071I, Dél-Korea) kitet használtuk. Annak érdekében, hogy RNS kivonási munkához a megfelelő steril körülményeket biztosítsuk, egy Telstar Class II Microbiological Safety Cabinet Bio II Advance Plus lamináris fülke alatt dolgoztunk. Legelső lépésben a lízis puffer előkészítése valósult meg az által, hogy hozzá adtuk az elúciós pufferben (ER puffer-KB-6033) feloldott polyA-t (KB-0122). 1,5 ml-es mikrocentrifugáló tubusba pipettáztunk 300 µL lízispuffert (VB puffer-KB-2052), amihez hozzáadtunk 10 µL IC-t és 200 µL mintát tartalmazó

VTM-et . Az Allplex 2019-nCoV Assay tartalmaz egy belső kontrollt (RPV IC), amely MS2 fág genomából származik. Ez a belső kontroll biztosítja a folyamat minden lépésének, beleértve a minta extrakcióját, a reverz transzkripciót és a PCR-t, vizsgálati érvényességét. A belső kontroll pozitív jele azt jelzi, hogy minden feldolgozási lépés sikeres volt. Az összes célgén negatív jelzése, beleértve a belső kontrollt is, érvényteleníti a vizsgálatot. Ebben az esetben a vizsgálat megismétlése elengedhetetlen.. A következő lépésben az elegyet vortexeltük (BioSan Vortex V-1 plus) és betettük a rázó-inkubátorba (Thermo Scientific™ Digital Heating Shaking Drybath Cat. num: 88880028), 60 C°-ra 10 percre, amely ezen paramétereken a hőkezeléses lizálást idézte elő. Az inkubálás után hozzáadtunk 300 µL izopropanolt, amire a genetikai anyag kicsapása érdekében volt szükség (REF 278475), majd vortexeltük 10 másodpercig.

Az RNS kötő oszlop előkészítéséhez felvittünk 100 µL kötődést elősegítő puffert (BST oldat, KB - 1067) és centrifugáltuk, 13000 ford./percen 30 másodpercig. Ezután a kitben található RNS kötő oszlopra pipettáztuk a mintát tartalmazó oldatot és behelyeztük a centrifugába (Thermo Scientific™ MicroCL 21R Centrifuge Cat. num.: 75002552), 13000 ford./percen 60 másodpercig. Ez a lépés az RNS szelektív megkötésére szolgál, az RNS-t megköti az oszlopon, míg az egyéb szennyező anyagok az oszlopról az átfolyóval távoznak. Az átfolyót eldobtuk, az oszlopra pipettáztunk 500 µL-t az első mosóoldatból (VW1, KB-3042) és 13000 ford./percen 60 másodpercig centrifugáltuk. Az előzőhöz hasonlóan az átfolyót ürítettük, hozzáadtunk 600 µL-t a második mosóoldatból (RWA2, KB-4023) és 13000 ford./percen 60 másodpercig ismét centrifugáltuk. Az átfolyót ismét elöntöttük, és ún. száraz mosással (centrifugálás, 13000 ford./percen 60 másodpercig) eltávolítottuk a maradék alkoholt. Végül az RNS-t tartalmazó oszlopokat áthelyeztük steril, RNáz mentes 1,5 ml-es Eppendorf tubusba és hozzáadtuk az elúciós puffert (ER, KB-6033). Egy perc várakozás után centrifugáltuk, 13000 ford./percen 60 másodpercig. A folyamat végén pedig megkaptuk a tisztított végterméket, amelyet a továbbiakban specifikus virális RNS amplifikálására használtunk

4.2.3. Valós idejű reverz transzkripció polimeráz - láncreakció (RT-qPCR)

A kvantitatív valós idejű reverz transzkripció polimeráz-láncreakcióhoz (RT-qPCR) az Allplex 2019-nCoV kitet alkalmaztuk. Minden mintához szükség van a 2019-nCoV MOM -ból (primer mix) 5 µL-re, az RNáz mentes vízből 5 µL-re, az 5X Valós Idejű, egylépcsős Puffer-ből 5 µL-re valamint a Valós Idejű, egylépcsős enzimből 2 µL-re. Ehhez a 17 µL-hez kellett adni 8 µL-t a tiszta RNS-ből (V. táblázat). A mérés előtt még szükséges az elegyet vortexelni, valamint centrifugálni, az oldat homogenitása miatt.

A folyamat során a szonda egy specifikus célszekvenciához kapcsolódik, amely a két primer között helyezkedik el. Az RT-qPCR-ciklus hosszabbítási fázisa során a Taq-polimeráz 5' nukleáz aktivitása lebontja a szondát, ami a riporter festéknek a kioltófestéktől való elválását okozza, fluoreszcens jelet generálva. Minden egyes ciklussal, további riporter festék-molekulák hasadnak le, a megfelelő szondákról, növelve a fluoreszcencia intenzitását. A fluoreszcencia intenzitását nyomon követi minden egyes RT-qPCR-ciklusnál a CFX96TM, CFX96 érinthetős valós idejű RT-qPCR detektáló rendszer. Az amplifikáció eredményét a "Seegene viewer" elemzése mutatja be, elősegítve a felhasználó számára az adatok könnyű és gyors feldolgozását. Az RT-qPCR reakcióhoz a BIO-RAD, CFX96 érinthetős valós idejű PCR detektáló rendszer készülékét használtuk, a hozzá tartozó programmal. A program első részében történik 50 C°-on a reverz transzkripció, vagyis az izolált RNS átíródik, az enzim elegy, a mixben lévő nukleotidok és a hőmérséklet hatására cDNS-é, majd 95 C°-on a denaturáció következik (a kettősszalú DNS szálainak a szétválása), végül pedig a primerek bekapcsolódása és elongáció, a szál meghosszabbítása).

1. táblázat. A fluorofórral jelölt próbák tulajdonságai

Fluorofórral jelölt próbák	Kód	Szín	Kibocsátási hullámhossz (MAX)	Elnyelési hullámhossz (MAX)
FAM	{.FAM}	Zöld/sárga (Emmax 492-585 nm)	521 nm	495 nm
Cal Red 610	{Cal 610}	Narancssárga (Emmax 585-647 nm)	610 nm	590 nm
Quasar 670	{Qua 670}	Piros (Emmax 670-700 nm)	670 nm	644 nm
HEX	{HexCE}	Zöld/sárga (Emmax 492-585nm)	556 nm	535 nm

4.3. Statisztikai elemzés

Az adatok feldolgozása Microsoft Office Excel 2016 és past.exe programok segítségével történt. A Microsoft Office Excel 2016 segítségével készítettük el a diagrammokat, míg a past.exe segítségével először F próbát végeztük, majd két mintás T próbát.

A qPCR kit (Allplex 2019-nCoV) 95%-os pontossággal kvantifikálja a mintában jelenlévő SARS-CoV-2 vírus mennyiségét, ezért azon adataink kiértékelése során, amelyek csak egy CT értéket eredményeztek, standard 5%-os szórást alkalmaztunk.

4.4. Normalizáció a VTM -re nézve

Az extrakció mentes sejtfeltárás során a VTM-ben található, a PCR reakció végbemenetelét inhibáló komponensek koncentrációjának csökkentése érdekében szükséges volt hígítani a próbákat. Az eredmények értékelése az (1.) hígítási faktor képletével történt.

$$\log_2 x = y \quad (1.)$$

ahol: x - a hígítási faktor
y - a CT érték eltérés

5. Kutatási eredmények bemutatása és tárgyalása

Eredményeink kiértékelése során három különböző fluoroforral jelölt próbát vizsgáltunk: FAM, Cal Red 610 és Quasar 670. A FAM-al jelölt próba a SARS-CoV-2 E gén jelenlétét, a Cal Red 610-al jelölt próba a SARS-CoV-2 RdRP gén jelenlétét, továbbá a Quasar 670-al jelölt próba a SARS-CoV-2 N gén jelenlétét mutatja ki (Seegene 2021).

5.1. FAM

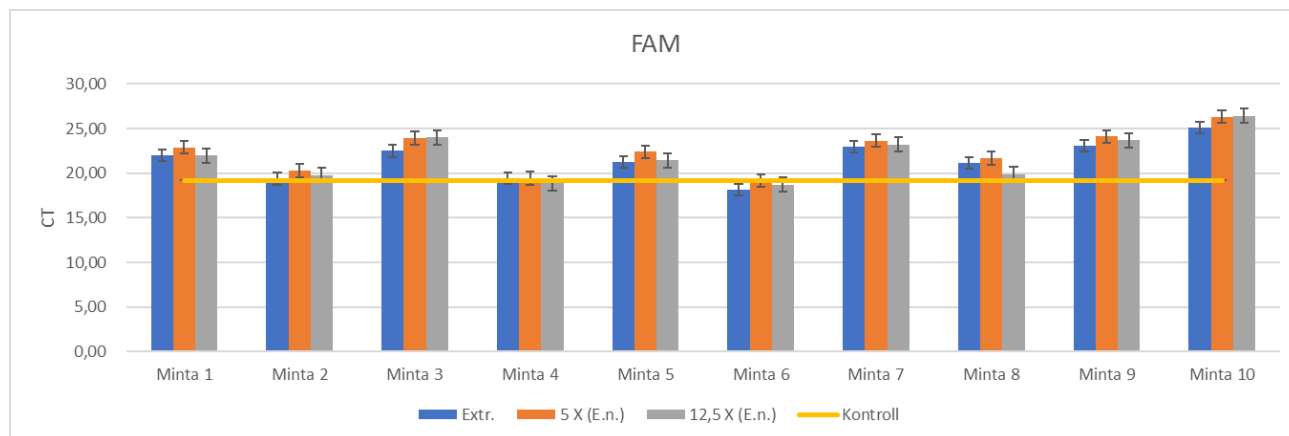
A 2. táblázat tartalmazza a FAM fluorofór próba során az extrakcióval, extrakció nélkül 5X-ös hígítással (5X (E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígítással (12,5X (E.n.)), valamint a qPCR kit pozitív kontroll CT értékeit.

2.táblázat. A FAM fluorofórral jelölt próba során mért CT értékek

	Minta 1	Minta 2	Minta 3	Minta 4	Minta 5	Minta 6	Minta 7	Minta 8	Minta 9	Minta 10	Átlag
Extr.	21,97	19,38	22,49	19,46	21,29	18,13	22,97	21,12	23,06	25,09	21,50
5 X (E.n.)	22,89	20,28	23,93	19,44	22,38	19,19	23,64	21,70	24,10	26,33	22,39
12,5 X (E.n.)	21,95	19,79	24,00	18,88	21,45	18,73	23,23	19,90	23,70	26,42	21,81
Kontroll	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20

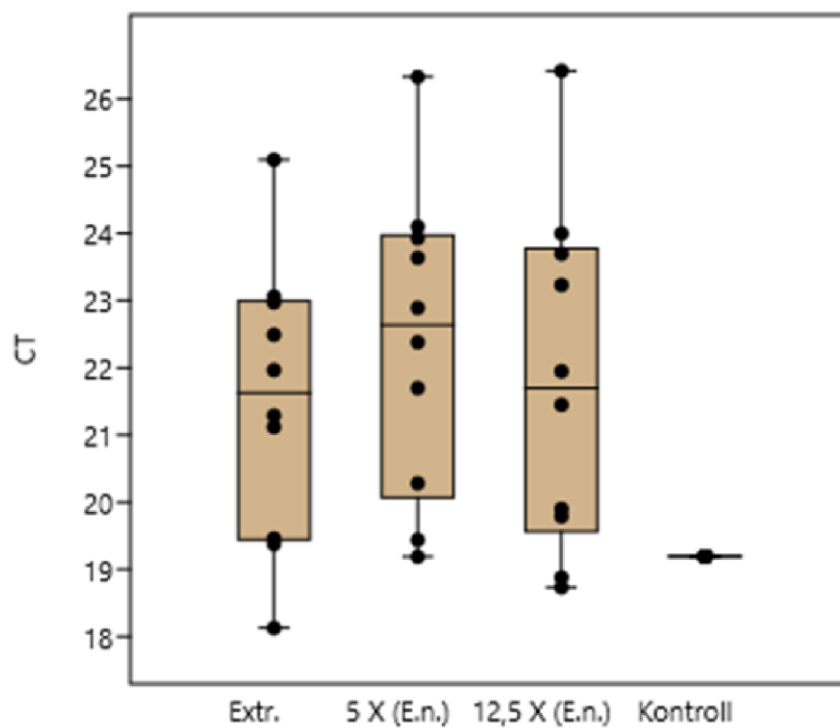
Az 1. ábra tartalmazza a Fam fluorofór próba esetén mért CT értékeket a feldolgozott minták esetében, extrakcióval (Extr.), extrakció nélkül 5X-ös hígításban (5X(E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígításban (12,5 (E.n.)), továbbá feltüntettük a qPCR pozitív kontroll-t. Figyelembe véve a qPCR kit pontosságát, standard 5%-os szórást alkalmaztunk. Minden minta esetében megfigyelhető (kivétel: minta 8), hogy a FAM fluorofór próbát tekintve a 12,5 X hígítással kapott minták eredményei kisebb eltérést eredményeztek a CT értékek között, az extrakció mentes protokollal izolált mintákhoz viszonyítva, mint az 5x-es hígítással kapott minták eredményei. A 8-as minta esetében nagyobb vírusr mennyiséget tudtunk kimutatni, az extrakcióval történő sejtfeltáráshoz képest. Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy az

extrakcióhoz hasonlóan, azokban a mintákban is, ahol nem történt RNS izolálás, csupán sejtfeltárás és hígítás, az RT-qPCR reakció végbement és a SARS-CoV-2 vírusra jellemző E gén kimutatása sikeres volt.



1. ábra. A feldolgozott minták FAM fluorofór próba CT értékeinek összehasonlítása

A standard PCR protokoll egy futtatás során egy pozitív kontroll alkalmazását írja elő, melyet figyelembe véve a 2. ábrán látható ezen érték feltüntetve (CT=19,20). Az extrakcióval történő protokoll szerinti sejtfeltárással kapott minták vizsgálata esetében az megfigyelhető, hogy az átlag CT érték 21,50. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=18,13. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=25,09. Az 5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 22,38. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=19,19. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=26,33. Az 12,5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 21,80. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=18,73. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=26,42.



2.ábra. Box-Plot diagram extrakció és extrakció mentes Sars-CoV-2 E gén (FAM) kimutatása esetében

5.2. Cal Red 610

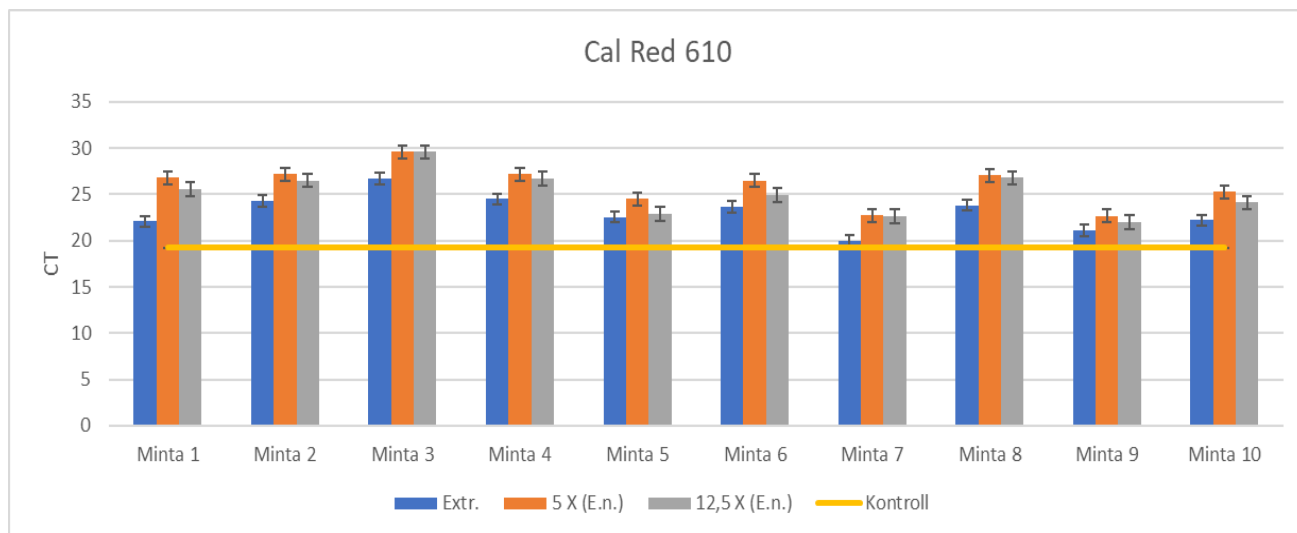
A 3. táblázat tartalmazza a Cal Red 610 fluorofór próba során az extrakcióval, extrakció nélkül 5X-ös hígítással (5X (E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígítással (12,5X (E.n.)), valamint a qPCR kit pozitív kontroll CT értékeit.

3. táblázat. A Cal Red 610 fluorofórral jelölt próba során mért CT értékek

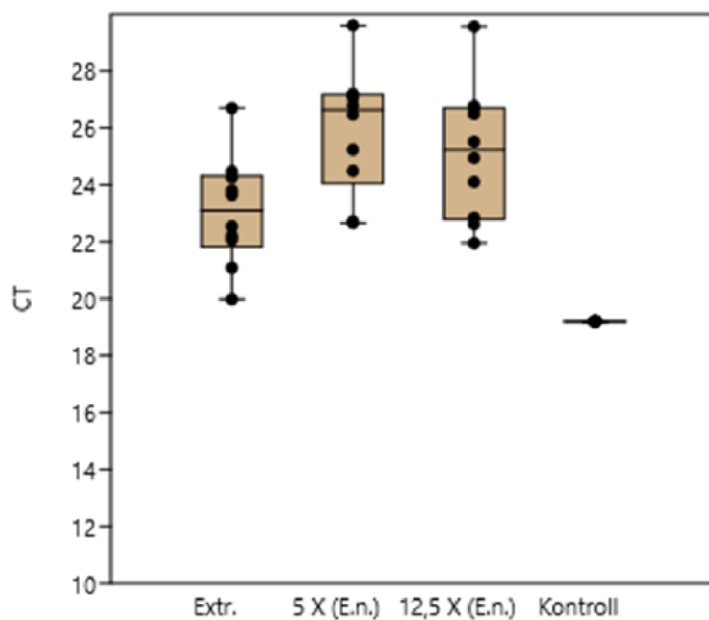
	Minta 1	Minta 2	Minta 3	Minta 4	Minta 5	Minta 6	Minta 7	Minta 8	Minta 9	Minta 10	Átlag
Extr.	22,06	24,26	26,70	24,47	22,54	23,65	19,98	23,81	21,09	22,21	23,08
5 X (E.n.)	26,79	27,19	29,60	27,17	24,49	26,47	22,72	27,06	22,66	25,24	25,94
12,5 X (E.n.)	25,52	26,49	29,56	26,67	22,85	24,94	22,62	26,78	21,95	24,10	25,15
Kontroll	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20

Az 3. ábra tartalmazza a Cal Red 610 fluorofór próba esetén mért CT értékeket a feldolgozott minták esetében, extrakcióval (Extr.), extrakció nélkül 5X-ös hígításban (5X(E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígításban (12,5 (E.n.)), továbbá feltüntettük a qPCR pozitív kontrollt. Figyelembe véve a qPCR kit pontosságát, standard 5%-os szórást alkalmaztunk. Minden minta esetében megfigyelhető, hogy a Cal Red fluorofór próbát tekintve a 12,5 X hígítással kapott minták eredményei kisebb eltérést eredményeztek a CT értékek között, az extrakció mentes protokollal izolált mintákhoz viszonyítva, mint az 5X-es hígítással kapott minták eredményei. Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy az extrakcióhoz hasonlóan, azokban a mintákban is, ahol nem történt RNS izolálás, csupán sejtfeltárás és hígítás, az RT-qPCR reakció végbement és a SARS-CoV-2 vírusra jellemző RdRp gén kimutatása sikeres volt.

Megfigyelhető, hogy a Cal Red 610 fluorofór esetében a nagyobb (12,5X) hígítás kedvezőbb a vizsgálandó minták SARS-CoV-2 mennyiségi kimutatására, a transzport médiumban található inhibáló komponensek koncentrációjának megfelelő hígítása révén.



3. ábra. A feldolgozott minták Cal Red 610 fluorofór próba CT értékeinek összehasonlítása



4. ábra. Box-Plot diagram extrakció és extrakció mentes Sars-CoV-2 RdRp gén (Cal Red 610) kimutatása esetében

A standard PCR protokoll egy futtatás során egy pozitív kontroll alkalmazását írja elő, melyet figyelembe véve a 4. ábrán látható ezen érték feltüntetve (CT=19,20). Az extrakcióval történő protokoll szerinti sejtfeltárással kapott minták vizsgálata esetében az megfigyelhető, hogy az átlag CT érték 23,07. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=19,97. A legkisebb

kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=26,69. Az 5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 25,93. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=22,66. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=27,19. Az 12,5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 25,14. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=21,95. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=39,56.

5.3. Quasar 670

Az 4. táblázat tartalmazza a Quasar 670 fluorofór próba során az extrakcióval, extrakció nélkül 5X-ös hígítással (5X (E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígítással (12,5X (E.n.)), valamint a qPCR kit pozitív kontroll CT értékeit.

4. táblázat. A Quasar 670 fluorofórral jelölt próba során mért CT értékek

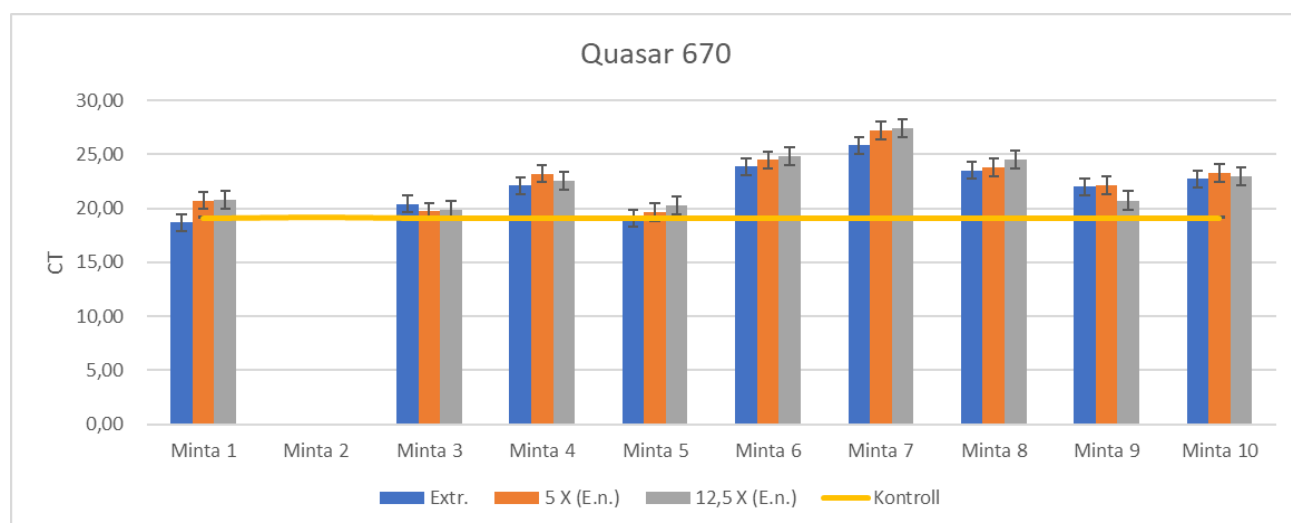
	Minta 1	Minta 2	Minta 3	Minta 4	Minta 5	Minta 6	Minta 7	Minta 8	Minta 9	Minta 10	Átlag
Extr.	18,68	-	20,39	22,10	19,10	23,86	25,87	23,53	22,03	22,72	22,03
5 X (E.n.)	20,74	-	19,72	23,23	19,67	24,49	27,21	23,79	22,17	23,29	22,70
12,5 X (E.n.)	20,78	-	19,83	22,58	20,29	24,87	27,42	24,5	20,73	22,98	22,66
Kontroll	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20

Az 5. ábra tartalmazza a Quasar 670 fluorofór próba esetén mért CT értékeket a feldolgozott minták esetében, extrakcióval (Extr.), extrakció nélkül 5X-ös hígításban (5X(E.n.)), extrakció nélkül 12,5X-ös hígításban (12,5 (E.n.)), továbbá feltüntettük a qPCR pozitív kontrollt. Figyelembe véve a qPCR kit pontosságát, standard 5%-os szórást alkalmaztunk. Minden minta esetében megfigyelhető (kivétel: Minta 9), hogy a Quasar 670 fluorofór próbát tekintve a 12,5 X hígítással kapott minták eredményei kisebb eltérést eredményeztek a CT értékek között, az extrakció mentes protokollal izolált mintákhoz viszonyítva, mint az 5x-es hígítással kapott minták eredményei. A Minta 9 esetében nagyobb vírusrmennyiséget tudtunk kimutatni, az extrakcióval

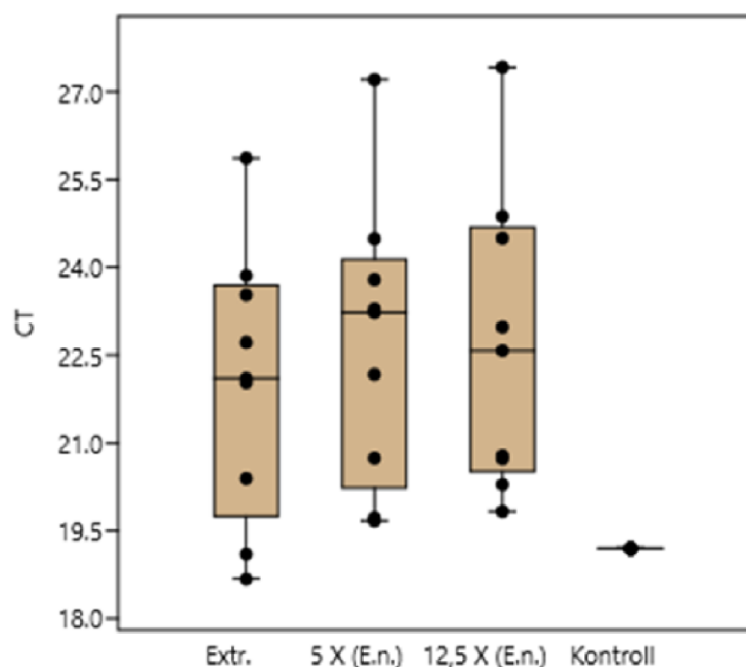
történő sejtfeltáráshoz képest. Megfigyelhető, hogy a Minta 2 esetében nincs feltüntetve CT érték, ez annak tulajdonítható, hogy ezen mintában nem volt detektálható az N gén, sem az extrakcióval, sem az extrakció nélküli mintafeldolgozás nyomán.

Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy az extrakcióhoz hasonlóan, azokban a mintákban is, ahol nem történt RNS izolálás, csupán sejtfeltárás és hígítás, az RT-qPCR reakció végbement és a SARS-CoV-2 vírusra jellemző N gén kimutatása sikeres volt.

Megfigyelhető, hogy a Quasar 670 fluorofór esetében is a nagyobb (12,5X) hígítás kedvezőbb a vizsgálandó minták SARS-CoV-2 mennyiségi kimutatására, a transzport médiumban található inhibáló komponensek koncentrációjának megfelelő hígítása révén.



5.ábra. A feldolgozott minták Quasar 670 fluorofór próba CT értékeinek összehasonlítása



6. ábra Box-Plot diagram extrakció és extrakció mentes Sars-CoV-2 N gén (Quasar 670) kimutatása esetében

A standard PCR protokoll egy futtatás során egy pozitív kontroll alkalmazását írja elő, melyet figyelembe véve a 6. ábrán láthatók ezen érték feltüntetve (CT = 19,20). Az extrakcióval történő protokoll szerinti sejtfeltárással kapott minták vizsgálata esetében az figyelhető meg, hogy az átlag CT érték 22,03. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT = 19,10. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT = 25,87. Az 5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 22,70. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=19,67. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT = 27,21. Az 12,5X-ös hígítás alkalmazása esetében megfigyelhető, hogy az átlag CT érték az 22,66. A legnagyobb kópiaszám (a legkisebb CT érték) a CT=19,83. A legkisebb kópiaszám (a legnagyobb CT érték) a CT=27,42.

5.4. Az eredmények statisztikai kiértékelése

Az eredmények statisztikai kiértékelése során kétmintás T próbát alkalmaztunk. A CT értékek átlagát hasonlítottuk össze. Az átlagot mintánként és eljárásenként a FAM, a Cal Red 610 és a Quasar 670 fluorofórral jelölt próbákon mért CT átlagokból számoltuk ki.

5. táblázat. Összesített és átlag CT értékek

	Extrakcióval	5 X hígítás (E.n.)	12,5 X hígítás (E.n.)	Kontroll
Minta 1	20,90	23,47	22,75	19,20
Minta 2	21,82	23,74	23,14	19,20
Minta 3	23,19	24,42	24,46	19,20
Minta 4	22,01	23,28	22,71	19,20
Minta 5	20,98	22,18	21,53	19,20
Minta 6	21,88	23,38	22,85	19,20
Minta 7	22,94	24,52	24,42	19,20
Minta 8	22,82	24,18	23,73	19,20
Minta 9	22,06	22,98	22,13	19,20
Minta 10	23,34	24,95	24,50	19,20

A kiértékelés során az Extrakcióval és 5 X hígítás (E.n.), valamint Extrakcióval és a 12,5 X hígítás (E.n.) oszlopokat vizsgáltuk, 0,05 szignifikancia szint mellett. Az első esetben a t értéke 4,01 és a t kritikus pedig 2,10. A második esetben a t értéke 2,42 a t kritikus pedig 2,10.

6. Következtetés

Következtetésképp elmondható, hogy az extrakcióhoz hasonlóan, azon mintákban is, ahol nem történt RNS izolálás, mindössze sejtfeltárás és hígítás, az RT-qPCR reakció folyamata végbement és a SARS-CoV-2 vírusra jellemző három vizsgált gén (E, RdRp, N) kimutatása sikeres volt.

Megfigyeltük, hogy a vizsgálandó minták SARS-CoV-2 mennyiségi kimutatására mindhárom fluorofór esetében (FAM, Cal Red 610 és Quasar 670) a nagyobb (12,5X-es) hígítás a kedvezőbb. Ez a transzport médiumban található inhibáló komponensek koncentrációjának megfelelő hígítása révén történhet. Ezen eredményünk egybevág több publikát eredménnyel, melyek alapján egyes vírus transzport médiumok jelentős inhibáló hatást fejtenek ki a PCR reakcióra, ha 20-25%-nál nagyobb mennyiségét teszik ki a reakcióelegynek (Smyrlaki és mtsa. 2020; Bruce és mtsa. 2020).

Esetenként előfordult az is, hogy nagyobb vírusrmennyiséget tudtunk kimutatni az extrakció mentes sejtfeltárás során kapott mintákból, az extrakcióval történő sejtfeltáráshoz képest. Következtetésképp elmondható, hogy az extrakció mentes sejtfeltárás során, 12,5 X-ös hígításban hatékonyan ki lehet mutatni a SARS-CoV-2 vírusra jellemző 3 vizsgált gént (E, RdRp,N), akárcsak az extrakcióval történő RNS izolálással.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk dr. Bálint Emese-Éva és drd. Salamon Pál vezető tanároknak, valamint drd. Antal Emőkének a kísérletek elvégzése, kiértékelése, továbbá a dolgozat elkészítése során nyújtott támogatásért.

Köszönettel tartozunk továbbá a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórháznak a feldolgozott mintákért, továbbá a kórház SARS-CoV-2 vírust diagnosztizáló laboratóriumának, hogy a kísérleteink elvégzéséhez biztosították a megfelelő helyszínt, anyagokat és eszközöket, valamint a Sapientia EMTE Csíkszeredai karának, azon belül is a Biomérnöki Tanszéknek a dolgozat elkészítéséhez kapott támogatásért.

8. Irodalomjegyzék

- Ambrosi, Cecilia, Carla Prezioso, Paola Checconi, Daniela Scribano, Meysam Sarshar, Maurizio Capannari, Carlo Tomino, et al. 2021. “SARS-CoV-2: Comparative Analysis of Different RNA Extraction Methods.” *Journal of Virological Methods* 287: 114008. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114008>.
- Arias-Reyes, Christian, Natalia Zubieta-DeUrioste, Liliana Poma-Machicao, Fernanda Aliaga-Raduan, Favio Carvajal-Rodriguez, Mathias Dutschmann, Edith M. Schneider-Gasser, Gustavo Zubieta-Calleja, and Jorge Soliz. 2020. “Does the Pathogenesis of SARS-CoV-2 Virus Decrease at High-Altitude?” *Respiratory Physiology and Neurobiology* 277: 103443. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103443>.
- Baek, Seung Ki, Junghong Min, and Jung Hwan Park. 2010. “Wireless Induction Heating in a Microfluidic Device for Cell Lysis.” *Lab on a Chip* 10 (7): 909–17. <https://doi.org/10.1039/b921112h>.
- Ben-Ami, R., A. Klochendler, M. Seidel, T. Sido, O. Gurel-Gurevich, M. Yassour, E. Meshorer, et al. 2020. “Large-Scale Implementation of Pooled RNA Extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 Detection.” *Clinical Microbiology and Infection* 26 (9): 1248–53. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.009>.
- Brown, Robert B., and Julie Audet. 2008. “Current Techniques for Single-Cell Lysis.” *Journal of the Royal Society Interface* 5 (SUPPL.2). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>.
- Bruce, Emily A., Meei Li Huang, Garrett A. Perchetti, Scott Tighe, Pheobe Laaguiby, Jessica J. Hoffman, Diana L. Gerrard, et al. 2020. “Direct RT-QPCR Detection of SARS-CoV-2 RNA from Patient Nasopharyngeal Swabs without an RNA Extraction Step.” *PLoS Biology* 18 (10): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000896>.
- Byrnes, Samantha A., Ryan Gallagher, Amy Steadman, Crissa Bennett, Rafael Rivera, Corrie Ortega, S. Timothy Motley, Paras Jain, Bernhard H. Weigl, and John T. Connelly. 2021. “Multiplexed and Extraction-Free Amplification for Simplified SARS-CoV-2 RT-PCR Tests.” *Analytical Chemistry* 93 (9): 4160–65. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03918>.
- Carlo, Dino Di, Ki Hun Jeong, and Luke P. Lee. 2003. “Reagentless Mechanical Cell Lysis by Nanoscale Barbs in Microchannels for Sample Preparation.” *Lab on a Chip* 3 (4): 287–91.

<https://doi.org/10.1039/b305162e>.

- ENSIGN, J. C., and R. S. WOLFE. 1965. "Lysis of Bacterial Cell Walls By an Enzyme Isolated From a Myxobacter." *Journal of Bacteriology* 90 (2): 395–402. <https://doi.org/10.1128/jb.90.2.395-402.1965>.
- Filiztekin, Elif, and Korin Gasia Ozkaya. 2021. "Biosensors and Bioelectronics COVID-19 Diagnosis — A Review of Current Methods" 172 (June 2020). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>.
- Genoud, Valeria, Martin Stortz, Ariel Waisman, Bruno G. Berardino, Paula Verner, Virginia Dansey, Melina Salvatori, Federico Remes Lenicov, and Valeria Levi. 2021. "Extraction-Free Protocol Combining Proteinase K and Heat Inactivation for Detection of SARS-CoV-2 by RT-QPCR." *PLoS ONE* 16 (2 February): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247792>.
- Grant, Paul R., Melanie A. Turner, Gee Yen Shin, Eleni Nastouli, and Lisa J. Levett. 2020. "Extraction-Free Covid-19 (Sars-CoV-2) Diagnosis by RT-PCR to Increase Capacity for National Testing Programmes during a Pandemic." *BioRxiv* 19: 6–11.
- Guan, Bin, Karen M. Frank, José O. Maldonado, Margaret Beach, Eileen Pelayo, Blake M. Warner, and Robert B. Hufnagel. 2021. "Sensitive Extraction-Free SARS-CoV-2 RNA Virus Detection Using a Chelating Resin." *IScience* 24 (9). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102960>.
- Joyce, Caroline. 2002. "Quantitative RT-PCR" 193: 83–92.
- Kutyavin, Igor V. 2009. "New Approach to Real-Time Nucleic Acids Detection: Folding Polymerase Chain Reaction Amplicons into a Secondary Structure to Improve Cleavage of Förster Resonance Energy Transfer Probes in 5'-Nuclease Assays." *Nucleic Acids Research* 38 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1138>.
- Lee, Dong Woo, and Young Ho Cho. 2007. "A Continuous Electrical Cell Lysis Device Using a Low Dc Voltage for a Cell Transport and Rupture." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 124 (1): 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.11.054>.
- Lee, Sang Joon, Rudragouda Channappanavar, and Thirumala Devi Kanneganti. 2020. "Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines." *Trends in Immunology* 41 (12): 1083–99. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.005>.

- Lorincz, A. – Neményi, M. 2002. “Az in Vitro Sejtfeltárás Hatékonyságát Befolyásoló Fizikai Tényezők,” no. 2: 36–38.
- Mackay, Ian M, Katherine E Arden, and Andreas Nitsche. 2002. “Real-Time PCR in Virology” 30 (6): 1292–1305.
- Nagappan, Senthil, Saravanan Devendran, Pei Chien Tsai, Selvapriya Dinakaran, Hans Uwe Dahms, and Vinoth Kumar Ponnusamy. 2019. “Passive Cell Disruption Lipid Extraction Methods of Microalgae for Biofuel Production – A Review.” *Fuel* 252 (100): 699–709. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.092>.
- Navarro, E., G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, and J. Solera. 2015. “Real-Time PCR Detection Chemistry.” *Clinica Chimica Acta* 439: 231–50. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>.
- Seegene. 2021. “Instructions for Use Allplex™ 2019-NCoV Assay.”
- Smyrlaki, Ioanna, Martin Ekman, Antonio Lentini, Nuno Rufino de Sousa, Natali Papanicolaou, Martin Vondracek, Johan Aarum, et al. 2020. “Massive and Rapid COVID-19 Testing Is Feasible by Extraction-Free SARS-CoV-2 RT-PCR.” *Nature Communications* 11 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>.
- Szabó, Bálint Gergely, Ilona Bobek, Marienn Réti, László Gopcsa, Dóra Mathiász, Botond Lakatos, Gabriella Bekő, et al. 2020. “Az Új Típusú Koronavírus Okozta Megbetegedés (COVID–19): Összefoglaló Hematológusoknak I. – Virologia, Molekuláris Patogenezis És Klinikum.” *Hematológia–Transzfuziológia* 53 (2): 68–80. <https://doi.org/10.1556/2068.2020.53.2.4>.
- Taylor, Sean, Michael Wakem, Greg Dijkman, Marwan Alsarraj, and Marie Nguyen. 2010. “A Practical Approach to RT-QPCR — Publishing Data That Conform to the MIQE.” *Methods* 50 (4): S1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>.
- Zheng, Min, Rajendra Karki, Evan Peter Williams, Dong Yang, Elizabeth Fitzpatrick, Peter Vogel, Colleen Beth Jonsson, and Thirumala Devi Kanneganti. 2021. “TLR2 Senses the SARS-CoV-2 Envelope Protein to Produce Inflammatory Cytokines.” *Nature Immunology* 22 (7): 829–38. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>.
- Zóka, András, Bálint Tresó, and Gabriella Bekő. 2021. “A SARS-CoV-2-Járvány Kihívásai És Tapasztalatai a Molekuláris Diagnosztikában.” *Orvosi Hetilap* 162 (52): 2071–78. <https://doi.org/10.1556/650.2021.32419>.

9. Mellékletek

1. Melléklet

6. táblázat. Extrakcióval történő történő RNS kivonáshoz és tisztításhoz szükséges anyagok és anyagmennyiségek (lásd: 4.2.1)

(Forrás: Bioneer Corporation, 2020)

Extrakcióval történő RNS kivonáshoz és tisztításhoz szükséges anyagok	Extrakcióval történő RNS kivonáshoz és tisztításhoz szükséges anyagok mennyisége (µL)
Lízispuffer (KB - 2052)	300
Az RT-qPCR kitből származó belső kontroll (IC, RP-VIC)	10
Izopropil – alkohol (REF 278475)	300
Kötődést elősegítő puffer (BST, KB - 1067)	100
Mosó puffer 1 (VW1, KB - 3042)	500
Mosó puffer 2 (RWA2, KB - 4023)	600
Elúciós puffer (ER, KB - 6033)	50

2. Melléklet

7. táblázat. Extrakció mentes mintaelőkészítés (lásd: 4.2.2)

Extrakció nélküli RNS kivonáshoz szükséges anyagok	Extrakció nélküli RNS kivonáshoz szükséges anyagok mennyisége (µL)
Nukleáz mentes víz (REF AM9932, LOT 1207102)	60 µL
Vizsgálandó minta (VTM- REF C67VC1001, LOT 20210623)	20 µL

3. Melléklet

8. táblázat. RT-qPCR – hez szükséges anyagok és anyagmennyiségek (lásd: 4.2.3)

(Forrás: Seegene 2021)

RT-qPCR komponens	Mennyiség (µL)
2019-nCoV MOM (Allplex™ 2019-nCoV)	5
RNáz mentes víz (Allplex™ 2019-nCoV)	5
Valós Idejű, egylépcsős Puffer (Allplex™ 2019-nCoV vizsgálati kit része)	5
Valós Idejű, egylépcsős Enzymből (Allplex™ 2019-nCoV vizsgálati kit része)	2
Extrakció során kinyert, tiszta RNS/ Pozitív kontroll (PCT)/ Negatív kontroll (NTC) (Allplex™ 2019-nCoV vizsgálati kit része)	8

4. Melléklet

9. táblázat. RT-qPCR program beállításai (lásd: 4.2.3)

(Forrás: Seegene 2021)

Lépés	Ciklusok száma	Hőmérséklet	Időtartam
1.	1	50 C°	20 perc
2.	1	95 C°	15 perc
3.	45	94 C°	15 másodperc
4.	45	58 C°	30 másodperc