

36.OTDK Biológia Szekció

Ipari léptékben hasznosítható enzimek termelésének korszerűsítése autoindukciós eljárást alkalmazva

Hallgató:

László Dalma-Sapientia EMTE-Csíkszeredai kar, Génomészet szak, 4. évfolyam

Témavezető(k):

dr. Albert Beáta- Sapientia EMTE- Csíkszeredai kar, Biomérnöki tanszék

drd. ing. Salamon- Sapientia EMTE- Csíkszeredai kar, Biomérnöki tanszék

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	3
1. Bevezető	4
1.1. A téma bemutatása	4
1.2. A téma elméleti vetületei.....	4
1.3. Az autoindukciós eljárás bemutatása	7
1.4. A fehérje expressziós szint növelésére tett kísérletek.....	9
1.5. Fluoreszcens fehérjék.....	12
2. Célkitűzés.....	14
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. Alkalmazott sejvonalak, táplevesek.....	15
3.2. Kémiai kompetens sejtek készítése	15
3.3. Transzformálás kémiai kompetens sejtekbe.....	16
3.4. Plazmid izolálás	17
3.5. A heterológ gént tartalmazó kultúrák előnevelése	18
3.6. Fermentáció körülmények.....	18
3.7. A minták előkészítése	19
3.7.1. Minták begyűjtése	19
3.7.2. Minták feltárása	19
3.8. A rekombináns fehérjekoncentráció meghatározása fluorimetriás módszerrel.....	20
4. Eredmények és értékelésük	21
4.1. Transzformálás kémiai kompetens sejtekbe.....	21
4.2. Plazmidizolálás eredménye.....	21
4.3. Mikrotitráló lemezes fermentáció monitorizálása	22
4.4. Alkalmazott táplevesek összehasonlítása a GFP és az AURKA fehérje expressziójára	24
4.5. Rekombináns fehérje mennyiségének meghatározása fluoriméteres méréssel	27
5. Összefoglalás	33
6. Irodalom	35

Kivonat

A biotechnológia területein alkalmazott módszerek közül kiemelkedően fontos szereppel bír a rekombináns fehérjetermelés. A módszer optimalizálására legalkalmasabb mikroorganizmus az *Escherichia coli* baktérium, mely gazdaságos tápanyag igényét és könnyen kivitelezhető tenyésztési körülményeit figyelembe véve közkedvelt gazdaszervezet. Az autóindukciós módszert alkalmazva növelhetjük az oldott formában termelődött rekombináns fehérje hozamát és megelőzhetjük az indukálás előtt elkezdődő fehérjetermelést. A módszer optimalizálása elősegítheti az ipari léptékű fehérjetermelés hatékonyságának növelését is.

Kutatómunkánk célkitűzései közé tartozott a különböző autoindukciós táplevesekben (ZYM, ZYP, autoindukciós M9) vizsgálni, a módszer hatékonyságát. A különböző szénforrás/indukálószer arány változtatásának hatását követve meghatározni a leghatékonyabb expresszió paramétereit.

Kutatásaink során *Escherichia coli* baktérium törzsekbe transzformáltuk a rekombináns fehérje génjét tartalmazó plazmidokat, majd mikrotitráló lemezen végeztük a fermentációt különböző körülményeken, a céltermék hozamának optimalizálása érdekében. A termeltetett rekombináns fehérjék a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) illetve az Aurora-kináz A (AURKA) voltak. A termelődött rekombináns fehérjék koncentrációját a GFP fluoreszcens tulajdonságainak köszönhetően, fluorimetriás eljárással mértük. A kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a rekombináns fehérjék oldott formában termelődtek és kivédtük az indukció előtti fehérjetermelést.

1. Bevezető

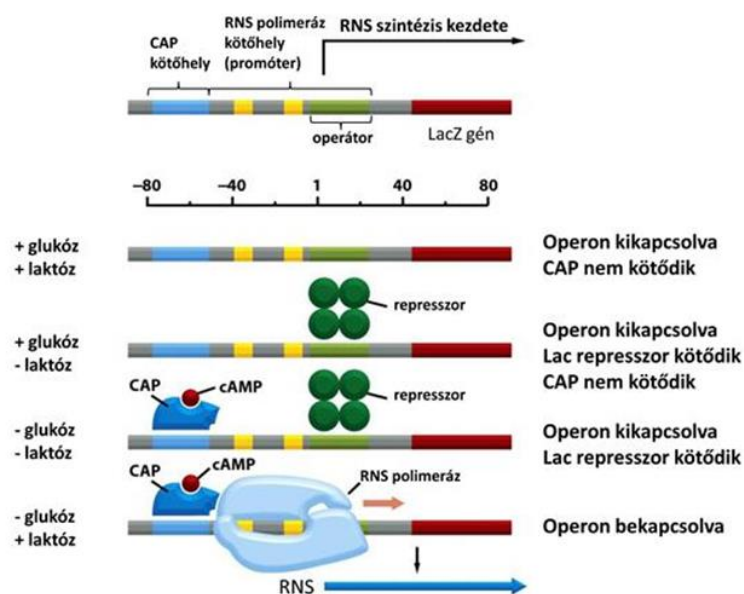
1.1.A téma bemutatása

Napjainkban ismertek olyan fehérje termelési eljárások, melyek a fehérjék termelését segítik költséghatékonyabbá és eredményesebbé tenni. Ezek közé az eljárások közé tartozik a rekombináns fehérje termelés, melynek során idegen szervezetből származó fehérjék génjét génszintetizációs úton bejuttatva baktérium sejtekbe, azok expresszálnak illetve a gének által kódolt fehérjék termeltethetők baktérium sejtekben. Erre a fehérje termelési eljárásra leggyakrabban *Escherichia coli* (*E. coli*) törzseket használnak. Ezek a baktériumtörzsek nem igényelnek komplex táptalajokat, vagy különleges tápanyagokat, az inkubálási paramétereik is költséghatékonyan megvalósíthatóak. A rekombináns fehérjék termelésének hatékonyságát jelentős mértékben befolyásolja, hogy a fehérjék szolubilisen vagy zárványtestekben képződnek. A szolubilisen képződő fehérjék további felhasználásukat tekintve értékesebbnek bizonyulnak, mivel nem kell időt és erőforrást befektetni a zárványtestekből való feltáráshoz, ezzel gazdaságosabbá téve a fehérje termeléssel és tisztítással kapcsolatos folyamatokat. A fehérjetermelés növeléséhez leggyakrabban használt indukáló szer a IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktozid), mely egy nem metabolizáló laktóz analóg és a *lac* operon rendszer alapján indukálja a fehérje termelést. Az autoindukciós fermentációs eljárások növelik a szolubilisen termelődött fehérjék mennyiségét, így bár lassabban, de jobb minőségű fehérje termelésére van lehetőség. A kutatás során ennek az eljárásnak az optimalizálásával tesztünk kísérletet a fehérjetermelés hatékonyságának növelésére, *E. coli* baktérium sejtekben.

1.2.A téma elméleti vetületei

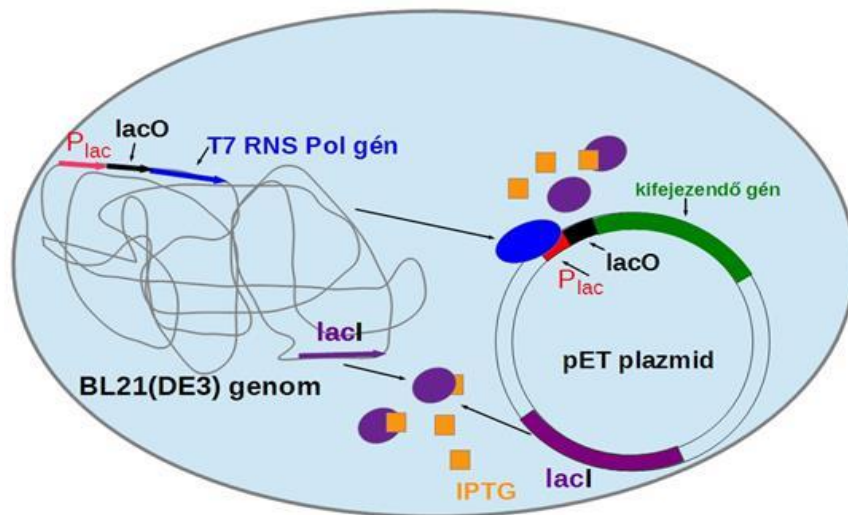
A DNS szerkezetét és szekvenciáinak megismerését követően, a DNS technikák lehetővé tették, hogy a már ismert, fehérjekódoló szekvenciákat, plazmidok által bejuttassuk baktérium sejtekbe, lehetővé téve azt, hogy szervezet-idegen fehérjéket termeltessünk a baktérium törzsekkel. Az egyik legismertebb és leghatékonyabban használt rendszer erre a T7 expressziós rendszer. Ennek alapja, hogy a baktérium törzs melyet használunk tartalmazza a T7 bakteriofágból származó T7 RNS polimeráz génjét, melynek kifejeződése a *lacUV5* promóter szabályozása alatt áll, illetve a cél fehérjét kódoló szekvenciát egy plazmidba építve, a T7 promóter szabályozása alatt. Ezt a baktériumtörzset nevezzük *E. coli* BL21(DE3) -nak. Ebben az esetben ha a *lacUV5* promóter indukálódik, átíródik a T7 RNS polimeráz génje, és ez az RNS polimeráz elkezd átírni a T7 promóter után szereplő gént, így megtörténik a cél fehérje génjének transzkripciója illetve későbbi transzlációja (F. William Studier, 2005).

Jacob és Monod egy olyan tanulmány alapjait fektették le mely által, megismerhetjük a *lac* operon szabályozó rendszer működését. Ez alapján a rendszer indukálhatósága illetve represszálhatósága válik ismertté, mely hozzájárul a génexpresszió mértékének megváltoztatásához (JACOB & MONOD, 1961). Az *E. coli* baktériumsejtek laktóz gazdag környezetben képesek szaporodni. Mikor a laktóz átjut a periplazmából a citoplazmába szükség van arra, hogy felbomoljon glükózra és galaktózra, mivel a glükóz a sejtek fő energiaforrása, következésképpen egy proteáz enzimre van szükség ahhoz, hogy ez a hasítás végbemenjen, jelen esetben ez a β -galaktozidáz enzim. A *lac* operon három strukturális gént foglal magába a *lacZ*, *lacY* és *lacA* géneket, ezek sorban a β -galaktozidáz, laktóz permeáz és tiogalaktozid transzacetiláz enzimeket kódoló gének. A laktóz permeáz egy transzmembrán fehérje mely szerepet játszik a laktóz szállításában, a sejtbe való bejuttatás során. Abban az esetben ha a tápközegben alacsony a laktóz tartalom, a *lac* operon működésében a represszor molekula negatívan befolyásolja a rendszert, mivel az operátor régióhoz kötődve megakadályozza az RNS polimerázt abban, hogy génátírás történjen. Laktóz vagy allolaktóz jelenlétében ezekkel a molekulákkal a represszor olyan komplexet alkot mely konformáció változást idéz elő a represszor molekulában inaktíválva azt. Ebben az esetben az RNS polimeráz képes lesz kötődni és megtörténik a génátírás. Egy másik *lac* operon szabályozási folyamat a glükóz által valósul meg, ez az *E. coli* baktériumsejtek elsődlegesen használt szén- és energiaforrása. Amennyiben a sejten kívüli glükóz koncentráció csökken a sejten belül megnő a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) termelése. A cAMP molekula kötődik az öt felismerő receptor fehérjéhez (CRP) és egy komplex jön létre, melyet katabolit aktiváló fehérjének (CAP) nevezünk. A CAP komplex csak a *lac* promóter elejére kötődik, segítve az RNS polimerázt abban, hogy lemásolja a *lac* operon génjeit, ha megtörténik az átírás, a keletkező mRNS-ről a riboszómában megtörténik a transzláció és létrejönnek a peptid láncok melyek feltekeredése után a β -galaktozidáz és laktóz permeáz eredményezik. A *lac* operon szabályozási folyamatait ábrázolja az 1. ábra (Szarka, 2014). A *lac* operon működése szempontjából a tiogalaktozid transzacetiláznak nincs jelentősége ezért nem említjük (Esmaeili et al., 2015). Ezen szabályozási rendszer ismerete lehetővé teszi a fehérjetermelés hatékonyságának növelését, ugyanakkor más promóterekkel illetve szabályozó szakaszokkal kiegészítve ez még kedvezőbb fehérjetermeléshez vezethet.



1. ábra: A lac operon működése, (Szarka, 2014)

A T7 RNS polimeráz nagyfokú szelektivitást mutat a saját promótereire, melyek normál esetben nem találhatók meg az *E. coli* baktériumsejtekben. A T7 RNS polimeráz, mely egy T7 1 gén másolatáról termelődött, viszonylag kis mennyiségben is elegendő, hogy a T7 promóterrel ellátott génekről nagy fokú génátírás történjen, akár több kópia számban jelen levő plazmidokról is. Ennek következtében a transzkripció hosszabb ideig is megvalósulhat ciklikusan egy plazmidon, anélkül, hogy leállna, ennek következtében sokkal aktívabb a T7 RNS polimeráz mint az *E. coli* sejtek saját RNS polimeráza. Ha egy RN-áz III hasítóhely szerepel a szekvenciában, az egyedi RNS-ek összegyűlnek a plazmid mentén, illetve a T7 DNS transzkripciós terminációs jelei is hatékonyan működnek a plazmidban. Ennek köszönhetően a szintézis és az akkumuláció együttesen olyan mértékű transzkripciós szintet biztosít mint a riboszómális RNS egy normál sejtben (F W Studier & Moffatt, 1986). A T7 szabályozási rendszer működése látható a 2. ábrán (Nyitray, 2013).



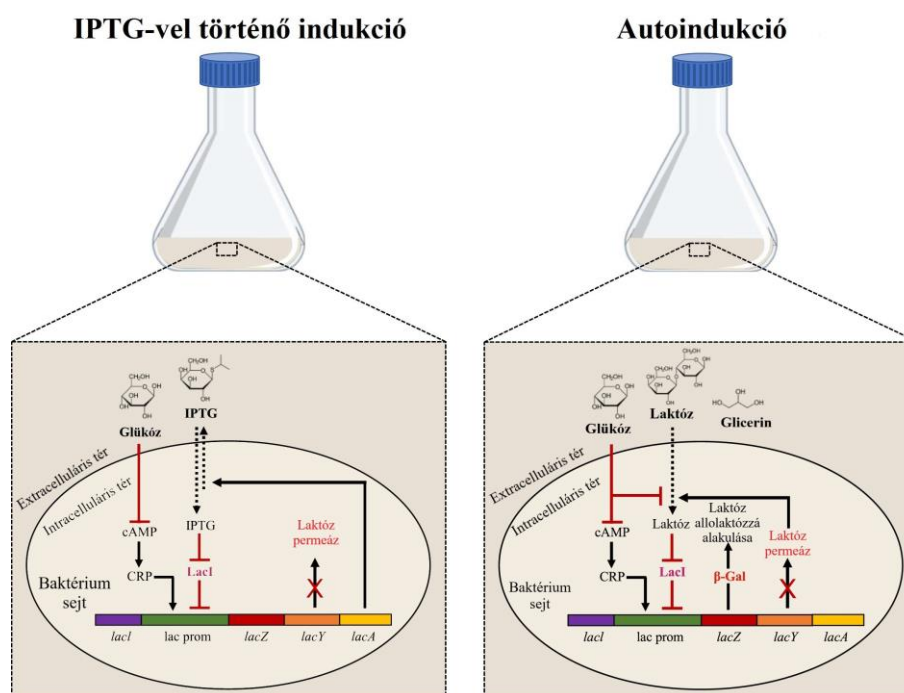
2. ábra: A T7 RNS rendszer működése, (Nyitray, 2013)

1.3. Az auto-indukciós eljárás bemutatása

Az auto-indukciós eljárás bevezetése lehetővé tette a célfehérje termelését a baktérium kultúra növekedésének folyamatos monitorizálása és indukálószer hozzáadásával történő indukció nélkül. Ezt az eljárást különböző szén-forrásokot tartalmazó táplevelessel valósították meg, mely glükózt, glicerolt, és laktózt tartalmaz. Ebben az esetben a glükóz az elsődleges hasznosítani kívánt szénforrás a baktériumok számára, majd ezt követően a laktóz indukálószerként funkcionál a *lac* operon által szabályozott fehérjetermelés kivitelezéséhez (Li et al., 2011). Ezt az eljárást alkalmazva, a baktériumok növekedése gyorsabb, a célfehérje termelése hatékony, indukálószer hozzáadása nélkül és anélkül, hogy a kultúra növekedésének folyamatos monitorizálása szükséges legyen, így akár számos baktérium kultúra nevelése és indukálása megvalósítható párhuzamosan, mikrotitráló lemez használatával is (F. William Studier, 2005).

Az eljárás alapja a indukáló szer hozzáadásával elért fehérjetermeléshez hasonlóan, az indukálható *lac* promóter. A legtöbb esetben a génátírás elkezdését indukálószer hozzáadásával, általában izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG), valósítják meg. Ennek az a hátránya, hogy a baktériumkultúra növekedését folyamatos monitorizálással kell követni, majd ha elérte a kívánt sejtsűrűséget, hozzá kell adni az indukálószer. Ezen hátrány kiküszöbölése érdekében fejlesztették ki az auto-indukciós fermentációs technológiákat. A folyamat során a

baktériumkultúra nevelésére használt tápoldathoz glükózt, laktózt és glicerint adunk. A glükóz jelenti a baktériumok növekedése során az elsődleges szénforrást, ezért a sejtek ezt használják a növekedéshez és az életfolyamataik fenntartásához. Követve a *lac* rendszer működését, ha a glükóz jelen van a tápoldatban, akkor a sejtek azt használják fel és nem kezdik a laktózt hasznosítani. Glükóz hiányában a sejtek éhezni kezdenek és a laktóz jelenlétében elkezdődik a *lac operon*-on található gének átírása a laktóz hasznosítás érdekében, ezáltal a célfehérje expressziója is elkezdődik. A kutatások során bizonyították, hogy a sejtsűrűség, illetve a fehérje termelés hatékonysága jóval nagyobb abban az esetben, ha a laktózzal párhuzamosan egy másik szén- és energiaforrást is használunk. Erre a célra alkalmas a glicerint amely nem idézi elő a laktóz katabolit represszióját és ezentúl egy standard ellátó szén-és energia forrást biztosító komponens (Ukkonen et al., 2013). Az autoindukciós eljárás és az indukálószer hozzáadásával történő expresszió közti különbség látható a 3. ábrán (Crowley & Rafferty, 2019).



3. ábra: Az IPTG-vel történő indukció és az autoindukciós eljárás folyamata, (Crowley & Rafferty, 2019).

Jianlin Xu és mtsai szerint (2012) a kísérleteik során autoindukciós eljárást alkalmazva vizsgálták az egyes terápiás fehérjék (TP1, TP2) expressziós szintjét, különböző tápleveseket felhasználva. A kísérleteket elvégezték IPTG felhasználásával is. Az autoindukció folyamatának ismeretében, illetve ezen eljárás optimalizálásának érdekében különböző komplex illetve vegyileg meghatározott M9 tápleveseket használtak. Annak ismeretében, hogy

a különböző komplex táplevesek olyan metabolitok keverékét tartalmazzák melyek közül egyesek képesek indukálni a fehérjetermelést, vizsgálható ezek autoindukciós hatása. Az *E.coli* indukálószer kizárásos illetve katabolit repressziós mechanizmusainak köszönhetően az olyan indukáló komponens mint a laktóz nem vesz részt a baktériumok növekedésében. Ezek a mechanizmusok akadályozzák meg a *lac operon* által szabályozott gének átírását abban az esetben ha a táplevesben rendelkezésre áll a baktérium kultúra által előnyben részesített metabolit, a glükóz vagy aminosavak (bizonyos esetekben mindkettő), melyek részei a komplex tápleveseknek. A rekombináns fehérje expressziójának automatikus megkezdése a laktóz jelenlétének tudható be, mely komponens ugyancsak része a komplex tápleveseknek. A folyamat alapja, hogy a komplex tápleves mindkét komponenst tartalmazza a művelet kezdetétől, így ha a baktériumok által hasznosított glükóz koncentrációja csökken a táplevesben, a laktóz által indukálódik a *lac operon* és elkezdődik a génátírás. Az említett kísérlet során egy vegyileg meghatározott összetételű komplex táplevest alkalmaztak a kultúrák előnevelése során mely glükózt illetve 16 különböző sót tartalmazott. A rekombináns fehérjetermelés során az M9 táplevest, módosított Luria Bertani (mLB), illetve módosított Terrific Broth (mTB) tápleveseket alkalmaztak, melyek közül az utóbbi kettő szója peptont tartalmaz. A kísérletek eredményeként megállapították, hogy az mLB táplevesben, autoindukciós folyamat során magasabb a TP1 terápiás fehérje expressziós szintje. Az mTB tápleves esetében a fehérje expressziós szintje nem mutatott különbséget az IPTG által indukált illetve az auto-indukciós folyamat során, valamint az M9 táplevest alkalmazva a fehérjetermelés csak IPTG indukálószer hozzáadásával valósult meg (Xu et al., 2012).

1.4. A fehérje expressziós szint növelésére tett kísérletek

A fehérjetermelés, illetve a használható fehérje mennyiségének növelése érdekében a kutatók számos kísérlet során változtatták a fehérjetermelés körülményeit ezen cél eléréséhez. Ilyen kísérlet például a *Mycobacteria tuberculosis* (Mtb) antigénjének kifejeztetése *E. coli* expressziós rendszerben. Ennek az antigénnek az expressziója az *E. coli* sejtekben gyors és költséghatékony megoldást jelent ezeknek az antigéneknek a nagyobb mennyiségben való bioszintézisére. Ebben az esetben a stabil fehérjék mennyiségének növelése érdekében a kutatók különböző adalékanyagok hatását vizsgálták a fehérjék stabilitásának növeléséhez. A használt adalékanyagok a D(+)- trehalóz-dihidrát, a glicin, a szacharóz, a D- mannitol, a D- szorbitol és a polietilén-glikol (PEG). A kifejeztetni kívánt gének a CFP-10, Rv3872, TB7.7,

TB9.7. Az expressziót *E. coli* BL21- es törzsben végezték, 2YT táplevesben. A kutatás eredménye alapján az adalékok hatása a fehérjék stabilitására jelentős mértékű volt mivel, a cukrok megakadályozták a fehérjék degradációját, a szacharóz például a szelektív kizárás járul hozzá a stabilitás növeléséhez, valamint a trehalóz is jelentős hatással van a stabilitásra, olyan mechanizmusok által mint például a hidrogén-hidak kialakítása, a vitrifikáció vagy szintén a szelektív kizárás. A szorbitol és a mannitol, melyek cukor-alkoholok, szintén megakadályozzák a fehérje degradációját illetve denaturációját, a PEG a fehérje felszínével lépve kapcsolatba megakadályozza annak letekeredését, valamint a glicin a fehérje hőmérséklettel szembeni stabilitását növeli (Kang et al., 2019).

Chhetri és mtsai (2015) szerint kísérletet tettek arra, hogy a fehérjetermelés szintjét etanol hozzáadásával növeljék. Bár ez nem nagyon alkalmazott módszer, de az etanol azon tulajdonságát figyelembe véve, hogy egy amfipatikus molekula, képes változásokat előidézni a sejten belüli környezetben, megváltoztatva például a membrán fluiditását, a membrán transzportot, vagy a membrán lipid összetételét. Ezek a változások hatással lehetnek a membránhoz kötődő folyamatokra, mint például a DNS replikációjára, befolyásolva a DNS szintézist. Az említett kutatás során feltételezték, hogy a DNS szintézis növelése hozzájárul a fehérjetermelés növeléséhez is, ezért etanollal kezelték a felhasznált *E. coli* baktérium sejteket. Ezen kísérlet hasznossága abban áll, hogy a rekombináns fehérjék esetében széleskörűen alkalmazható, illetve költséghatékony eljárás. A kutatás során az etanolt 1%, 2% illetve 3% térfogatszázalékban alkalmazták az LB tápleveshez adagolva. Eredményképpen azt állapították meg, hogy 3% etanolt alkalmazva érték el a legnagyobb mértékű fehérje expressziót. 5%- nál nagyobb mennyiségben alkalmazva az etanol gátolta a sejtek növekedését (Chhetri et al., 2015).

Mc Cormick és mtsai (2014) szerint a kutatásaik során fúziós címke felhasználásával érték el az idegsejt növekedési faktor (NGF) illetve a semaphorin3A (sema3A) funkciós régiójának, *E. coli* BL21 sejtekben való, fehérje expressziójának növelését. A fúziós címke használata hozzájárul a későbbi fehérjetisztítás sikerességének növeléséhez, ezáltal lehetővé téve a későbbi felhasználást. A fúziós címke beépítésének céljából a kutatás során pBR322 plazmid vektort alkalmaztak. Az említett esetben a célszekvenciához egy hisztidin (His) címke volt tervezve a későbbi tisztítás miatt, illetve egy 15 aminosav hosszúságú biotinilálható szakasz a biotiniláció miatt. A rendszer a T7 lac promóter szabályozása alatt állt. A biotin kötődését a biotinilálható szakaszhoz az *E. coli* baktériumsejtekben megtalálható biotin ligáz enzim végzi. A biotiniláció

egy hasznos módszer a megjelölt fehérje meghatározására, immobilizációjára és izolálására, a jól ismert biotin-szterptavidin interakció miatt (McCormick et al., 2014).

Az előzőekben említett kutatásokon kívül a fehérjetermelés növelése érdekében olyan eljárásra is tettek kísérletet melynek során foszfát kimerülés hatására indukálódó promótert alkalmaztak. A folyamat során a fehérjetermelés a stacionárius szakasz elején indukálódik. Az eljárás előnye, hogy a stacionárius fázis során a sejtek jelentősen fenntartják a metabolikus aktivitásukat és így magas a fehérjetermelési arány. Ezek a foszfát függő promóterek genetikailag módosított *E. coli* törzsekben használhatóak melyekben minimális az ecetsav termelés, emellett optimális a növekedési arány és a hozam is, biztosítva egy szigorúan kontrollált fehérjetermelést. Az említett baktériumsejtek és plazmidok használhatóak autoindukciós táplevesben és a fermentációt széleskörben végezhetjük különböző térfogatokon a mikrotitráló lemezeztől a bioreaktorokig (Menacho-Melgar et al., 2020).

Egy másik kutatócsoport arra tett kísérletet, hogy emberi konszenzus alfa-interferonokat termeltessen az autoindukciós eljárást alkalmazva. A konszenzus interferon egy mesterségesen megtervezett interferon melynek aminosav szekvenciája átlagosan egyezik az összes természetes humán alfa-interferon altípusának szekvenciájával és nagyobb hatékonyságú mint más interferonok, beleértve a pegilált formában levőket is. A kísérletek során a konszenzus alfa- interferon (cINF- α) génjét pET101/D-TOPO expressziós vektorban fejeztették ki, mely génexpresszió a T7 promóter transzkripció szabályozása alatt történt. Az autoindukció optimalizálásához változtatták az inkubáció időtartamát illetve a hőmérsékletet. A közölt eredmények alapján az autoindukciós fermentáció sikeres volt mivel a cINF- α fehérje leginkább oldott formában termelődött és 70%-os hozamot értek el a teljes sejtlizátumra vonatkoztatva azt követően, hogy az inkubálási hőmérsékletet 25° C-ra illetve 30° C-ra csökkentették, ezzel együtt 24 órás inkubációs időtartammal az említett hőmérsékleti paraméterek mellett érték el a maximális fehérje hozamot. A kísérlet fontos szerepet játszik a cINF- α fehérje expressziós szintjének növelésében, melynek fontossága abban mutatkozik meg, hogy az említett konszenzus interferonok magasabb antivirális illetve sejtburjánzást gátló hatást mutatnak mint a standard interferonok (EL-Baky et al., 2015).

Georg Faust és mtsai (2015) a kutatásuk során arra kerestek választ, hogy az autoindukciós fermentáció során milyen koncentrációban alkalmazható az IPTG a laktóz szerepének betöltésére a fermentáció során. A kísérlet során a célfehérje a zöld fluoreszcens fehérje volt (eGFP), melynek génjét a génjét a pET28 plazmidra építették be. A fermentációs folyamatot

szakaszos módon, 37°C inkubációs hőmérsékleten végezték, a sejtsűrűséget 600 nm-en illetve a termelődött eGFP koncentrációját a mikrotitráló lemezen az erre alkalmas leolvasó műszer segítségével folyamatosan ellenőrizték. Eredményképpen megállapították, hogy az eGFP expressziója hozzáadott IPTG-vel is működik de függ az IPTG koncentrációjától. Abban az esetben ha az autoindukció során a laktóz helyett IPTG-t használtak hasonló illetve magasabb expressziós szint volt megfigyelhető. A legmagasabb fehérjetemelési szintet 40 µM IPTG koncentráció mellett érték el, mely során a végső eGFP koncentráció 2,7 g/L volt, amely magasabbnak bizonyult mint a laktóz alapú autoindukció során elért 1,8 g/L eGFP koncentráció (Faust et al., 2015).

Leila Rezaei és mtsai (2020) kutatásaik során antitest fragmensek termeltetésével foglalkoztak *E. coli* baktériumsejtekben. Az antitest fragmensek kiválasztása a táplevesbe növeli a termék tisztaságát és csökkenti a tisztítási folyamatok költségeit. Kutatómunkájuk során *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonalat és autoindukciós fermentációs eljárást alkalmaztak, melynek optimalizálása által vizsgálták a fehérje termelés hatékonyságát. Az anti-MUC1 nanotest előállításának növelése érdekében a kutatók az autoindukciós fermentáció során, autoindukciós táplevest felhasználva, a hőmérséklet, az indukció időtartamának illetve a szénforrás és a glicin koncentrációjának optimalizálásával érték el a legnagyobb mennyiségű nanotestet. Eredményeikben megállapították, hogy a hőmérséklet és az indukálás időtartama esetében a legmagasabb fehérjehozamot 33°C-nál érték el 21 óra alatt (Rezaei et al., 2020).

1.5.Fluoreszcens fehérjék

A fluoreszcens fehérjéket széleskörben alkalmazzák a biológiai tudományok és az orvostudományok legtöbb területén. Az első zöld fluoreszcens fehérje (GFP) felfedezését és klónozását (1992) követően, az *Aequorea victoria* medúzából, sokféle GFP változatot fejlesztettek ki és számos új fluoreszcens fehérjét fedeztek fel és klónoztak különböző tengeri organizmusokból. A fluoreszcens fehérjék fénykibocsátási spektruma megoszlik a teljes látható tartományon, valamint néhány infra-vörös melletti tartományban megjelenő hullámhosszúságú fényt emittáló fehérjét is fejlesztettek ki. Ilyen változatok, a mikroszkópikus technológiák fejlődésével együtt, alkalmazhatóak összetettebb események leképezésére és számszerűsítésére az élő sejtekben. Ezeket a tulajdonságokat figyelembe véve fontos szerepet töltenek be a biomolekuláris folyamatok felderítésében és a sejtfunkciók tanulmányozásában, az élő sejteken belül, amely áttörést jelentett a mikro- illetve molekuláris biológia világában.

Az elmúlt években a fehérjemérnökség és szerves szintézis által a kutatók újratervezték illetve újra felépítették a fluoreszcens fehérjéket genetikai illetve kémiai eljárásokat alkalmazva. (Deng et al., 2020).

A fluoreszcens fehérjék változatos, a molekuláris folyamatok során követhető jelmolekulák és sikeresen alkalmazzák őket majdnem minden biológiai tudományterületen a mikrobiológiától a fiziológiai rendszerek tanulmányozásáig. Ezek a fehérjék hasznosnak bizonyultak mint jelző molekulák a génexpresszió tanulmányozásában sejt kultúrák esetében, gerjesztett sejtek esetében, illetve az állatokban. Az élő sejtekben a fluoreszcens fehérjéket gyakran használják a fehérjék, sejtorganellek, és más sejtrészek helyének és mozgásának nyomonkövetésére illetve fehérje-fehérje kölcsönhatások megállapítására a fluoreszcens rezonancia energia átadást (FRET) felhasználva (Remington, 2011). Egy célfehérje nyomonkövetésére a komplementer DNS (cDNS) génjét fúzionáltatják a kiválasztott fluoreszcens fehérje génjével, követve az így eredményezett rekombináns vektor bejutását egy gazdasejtbe vagy egy organizmusba (Rizzo et al., 2009).

A fluoreszcens fehérjékkel való genetikai megjelölése a molekuláknak és a sejteknek a fluoreszcens mikroszkópia forradalmasítását jelentette. A genetikai módosítások segítségével magas fényemissziót eredményező és stabil fluoreszcens fehérjéket hoztak létre melyek spektruma kéktől vörösig terjed. Az autofluoreszcens fehérjék közös tulajdonságai közé tartozik a szilárd β -lemzes szerkezet, mely biztosítja a merevséget és a kémiai környezetet, amely szükséges az eredményes fénykibocsátáshoz, ugyanakkor a hasonló szerkezet mellett minden fluoreszcens fehérjének sajátos jellemzői vannak. A GFP *Aequorea victoria* medúzából való klónozását és annak kifejeztetését követően más rendszerekben, lehetővé vált a fluoreszcens mikroszkópia alkalmazása a sejtbiológia és a fiziológia területén. A technológia alkalmazásának területén jelentős áttörést jelentett az azonos fluoreszcens fehérjék felfedezése korallokból és más virágállatokból (Cranfill et al., 2016).

A GFP génjének felhasználása mint marker gén, megkönnyítette a sejtekben történő génexpresszió ellenőrzését, a rekombináns fehérje génjének megjelölésével. Ez a módszer hatékonyabb és gyorsabb eljárás, mint az antibiotikum rezisztencia génnel történő jelölés vagy a β -galaktozidáz enzim génjével jelölt rekombináns fehérje kimutatása a sejtben. A marker génnel történő jelölés segíti a rekombináns fehérje expressziójának ellenőrzését, azáltal, hogy a két gén fúziója, az együttes génkifejeződés ellenőrizhető a marker gén által kódolt fehérje tulajdonságainak kifejeződése által. A GFP génjének markerként való alkalmazásának előnye,

hogy a génexpresszió során termelődött zöld fluoreszcens fehérje fénykibocsátási tulajdonságainak köszönhetően könnyen detektálható és meghatározható a jelölt fehérje expressziójának mértéke (Wahlfors et al., 2001).

2. Célkitűzés

A kutatás célja *E. coli* baktérium sejtvonalakban különböző autoindukciós tápleveseket (ZYM, ZYP, autoindukciós M9) felhasználva, a szubsztrát/indukálószer arány változtatásával, az autoindukciós fermentáció optimalizálása. A sejtnövekedés és a fehérjetermelés mértékének összehasonlítása által meghatározni azokat a fermentációs körülményeket melyek a leghatékonyabb fehérje expressziót eredményezik. A GFP (zöld fluoreszcens fehérje) rekombináns fehérje termelésével vizsgálni a különböző körülmények hatását az expresszióra és AURKA (Aurora-kináz A) termeléssel ellenőrizni a módszer hatékonyságát egy problémásan termelődő fehérje esetében. A kutatás legfőbb céljai közé tartozik az autoindukciós eljárás segítségével a szolubilisen termelődő fehérjék mennyiségének növelése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Alkalmazott sejtvonalak, táplevesek

Az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala alkalmas a kis kópiaszámban jelenlévő plazmidok esetében is nagy hatékonyságú expresszióra. Magas mRNS stabilitással és fehérjehozammal rendelkezik. A T7 promóter alapú plazmidok használatára optimalizálták a sejtvonalat¹.

Az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala egy olyan genetikailag módosított sejtvonala, melyben módosított lipopoliszacharid van jelen, amely nem akadályozza meg az endotoxin választ. Alkalmas membránhoz és lipidekhez kötődő fehérjék expressziójára².

Az *E. coli* BL21 (DE3) Top10 sejtvonalat alkalmaztuk a plazmidok felszaporítására. A sejtvonala előnyei közé tartozik, hogy képes stabilan, nagy kópiaszámban lemásolni a bejutott plazmidot, mivel fokozott a genomiális DNS klónozási kapacitása³.

A kutatás során alkalmazott sejtvonalatokat az egyetem Biomérnöki tanszéke biztosította.

A fermentációk során LB, ZYM, ZYP (W. Studier, 2005), M9 és autoindukciós M9 tápleveseket használtunk. A táplevesek összetétele az 1. függelékben látható:

A táplevesek elkészítéséhez szükségünk volt egyes törzsoldatok előzetes elkészítésére. Az elkészített törzsoldatok összetevőit a 2., 3., 4., 5., 6. és 7. függelékben tüntettük fel.

3.2. Kémiai kompetens sejtek készítése

A kutatásunk során kifejezteni kívánt célfehérjék (GFP, AURKA) génjét tartalmazó plazmidokat kémiai transzformálás során juttatuk be előzőleg előkészített kémiai kompetens

E. coli ClearColi BL21(DE3) és *E. coli* Star BL21 (DE3) sejtekbe. A kémiai kompetens sejtek létrehozásához és a transzformáláshoz két pufferoldat készítettünk el az 1. táblázat illetve a 2. táblázat alapján.

¹ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C601003#/C601003>, letöltés dátuma: 2021.04.10.

² <https://www.lucigen.com/ClearColi-BL21-DE3-Electrocompetent-Cells/>, letöltés dátuma: 2021.04.10.

³ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010#/C404010>, letöltés dátuma: 2021.04.10.

1. táblázat: Az 5x KCM puffer oldat összetevői 10 mL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
KCl	1 M	5,1 mL
CaCl ₂	1 M	1,5 mL
MgCl ₂	1 M	2,5 mL

2. táblázat: A TSB puffer oldat összetevői 50 mL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
PEG (polietilén-glikol)	10%	5 g
DMSO (dimetil-szulfoxid)	5%	2,5mL
MgCl ₂	10 mM	5 mL (1 M törzsoldatból)
MgSO ₄	10 mM	5 mL (1 M törzsoldatból)

A kémiai kompetens sejtek elkészítéséhez LB táplevesben, 37°C-on, over night (O.N.) előnevelt sejt kultúrát használtunk. A kompetens sejteket a következő eljárás alapján készítettük el:

- 200 mL LB tápleveshez 1 mL O.N. baktériumkultúrát adtunk, majd 37°C hőmérsékleten, 250 rpm rázatási sebességen inkubáltuk, OD₆₀₀=0,4 sejtsűrűségig.
- 10 percig jégen tartottuk a tápleves lehűtése érdekében
- 3500 rpm-en, 4°C-on, 5 percig centrifugáltuk (Thermo Scientific SL 40R Centrifuge)
- centrifugálás után, a pellethez hozzáadtunk 2 mL TSB puffert, majd óvatosan felfuszpendáltuk
- steril glicerint adtunk a sejtekhez (végső koncentráció 15 %), amely biztosította a kompetens sejtek -80°C-on való tárolási lehetőségét, majd a további felhasználást
- 1 mL térfogatokra osztottuk fel a sejtsuszpenziót, majd -80°C-on tároltuk (Thermo Scientific FORMA 88000 SERIES)

3.3. Transzformálás kémiai kompetens sejtekbe

A kémiai kompetens sejtek előkészítése után a transzformálást a következő módon végeztük:

- 20 μ L 5x KCM puffer oldathoz 1 μ L plazmidot és 100 μ L kompetens sejtet adtunk hozzá
- 20 percet jégen, majd 10 percet szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket, majd 100 μ L LB táplevest adtunk az elegyhez majd 37°C-on, 250 rpm-en inkubáltuk 30 percig
- a transzformálás után 180 μ L sejtszuszpenziót szélesztettünk a megfelelő antibiotikum tartalmú LB agar táptalajokra a transzformáció sikerességének ellenőrzéséhez. A transzformálás során alkalmazott plazmidokat az egyetem Biomérnöki tanszéke bocsájtotta rendelkezésünkre.

3.4. Plazmid izolálás

A transzformálást követően az *E. coli* BL21 (DE3) Top10 sejtekből plazmid izolálást végeztünk a következő protokoll alapján:

- a sejt kultúrát centrifugáltuk (Thermo Scientific SL 40R Centrifuge) 13000 rpm-en és a felülúszót eltávolítottuk, majd hozzáadtunk 250 μ L reszuszpendáló oldatot és felszuszpendáltuk a pelletet és hozzáadtunk 250 μ L lízis puffert majd elegyítettük a tubus 4-5-szöri átforgatásával
- 350 μ L neutralizáló oldatot adtunk hozzá majd újra átforgattuk a tubust majd az elegyet centrifugáltuk 5 percet 13000 rpm-en, majd a felülúszót membránszűrővel ellátott oszlopra pipettáztuk
- az oszlopot centrifugáltuk 1 percig 13000 rpm-en, majd a felülúszót elöntöttük
- 500 μ L mosó puffert pipettáztunk az oszlopra, centrifugáltuk 1 percig 13000 rpm-en, majd az átfolyót elöntöttük, ezt a mosást 3-szor ismételtük meg
- az utolsó mosás után az oszlopot ismét centrifugáltuk 1 percig 13000 rpm-en, hogy eltávolítsuk az esetleges mosó puffer maradványokat is
- az oszlopot tiszta centrifuga tubusba helyeztük és 50 μ L eluáló puffert pipettáztunk rá
- 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten majd 2 percig centrifugáltuk 13000 rpm-en.
- a plazmid DNS további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A plazmid izolálás sikerességének ellenőrzésére az izolált plazmidokat 1%-os agaróz gélen futtatuk le. 100 mL gél megöntéséhez használtunk 1 g agarózt és 100 mL térfogatra 1x-es TAE pufferrel egészítettük ki. A gél detektálhatósága érdekében még a kiöntés előtt hozzáadtunk 5 μ L EcoSafe festéket. A futtatás során 1:6 arányban festettünk meg 6x LD DNS festékkel 1,5 μ L mintát. A gél futtatást 80 V-on, 30 percig végeztük.

3.5. A heterológ gént tartalmazó kultúrák előnevelése

A fermentációk előkészítése során előnevelt kultúrákat hoztunk létre. Az első előnevelést 10 mL 100 mg/mL koncentrációju ampicilin tartalmú LB táplevesben végeztük, a transzformálás utáni szélesztés eredményeként kinőtt baktériumtelepek leoltásával. A kultúrák előnevelését 37°C-on, 250 rpm-en végeztük addig a pontig amikor a sejtsűrűség elérte az $OD_{600} = 0,1-0,2$ közötti értéket, ez általában 4 óra alatt valósult meg. Ezekhez az előnevelt kultúrákhoz 80 % koncentrációban steril glicerint adtunk hozzá, majd -80°C-on tároltuk őket. A további előnevelt kultúrákat ezekből a tárolt mintákból oltottuk be, hogy a fermentációk során ugyanazon telepből származó sejtekkel dolgozzunk. A továbbiakban az előnevelt kultúra létrehozásához 5 mL 100 mg/mL ampicilin tartalmú LB táplevesbe oltottunk be 1 mL-t a tárolt mintákból és ezeket az előzőekkel azonos körülményeken inkubáltuk.

3.6. Fermentáció körülmények

A kutatásunk során 12 különböző körülményt, 2 sejtvonalat és 2 fajta rekombináns fehérjének az expresszióját vizsgáltuk. A különböző szubsztrát/indukálószer arány hatását vizsgáltuk a sejtnövekedésre és az expresszió mértékére, 37°C-on, 24 órán át. A vizsgált szubsztrát/indukálószer arányok a 3. táblázatban láthatóak.

3. táblázat: *A fermentációk során használt autoindukciós levesekben alkalmazott szubsztrát/indukálószer arányok*

Tápleves	aM9	Körülmények				
		I.	II.	III.	IV.	V.
	glc koncentráció (g/L)	2	27	52	77	102
	lac koncentráció (g/L)	2	2	2	2	2
	glc/ lac arány	1	13,5	26	38,5	51
Tápleves	ZYM					
	glc koncentráció (g/L)	0,5	5,5	30,5		
	lac koncentráció (g/L)	2	2	2		
	glc/ lac arány	0,25	2,75	15,25		
Tápleves	ZYP					
	glc koncentráció (g/L)	0,5	5,5	30,5		
	lac koncentráció (g/L)	2	2	2		
	glc/ lac arány	0,25	2,75	15,25		

12 db. előre összeállított táplevest mértünk ki, majd 96 lyukú mikrotitráló lemezre (TPP TP29097) osztottunk szét 200-200 μ L-t mintánként 8-as ismétléssel.

A mikrolemez olvasó (BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA) programja:

- ciklusok száma és ideje: 72 ciklus, 6 perc
- hőmérséklet: 37°C

A készülék (BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA) a 4. ábrán látható.



4. ábra: BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA fluoriméter

3.7. A minták előkészítése

3.7.1. Minták begyűjtése

Egy méréssorozat 24 órán keresztül zajlott, a fermentációt követően a mintákat összegyűjtöttük, 18 000 RPM-en, 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót tiszta centrifugatubusba pipettáztuk.

3.7.2. Minták feltárása

A GFP és AURKA fehérjék sejtől való kinyerésének érdekében a sejtek feltárását a pelletekből, a következő protokollt követve végeztük el:

- A pelletet 100 μ L lízis pufferben szuszpendáltuk fel (4. táblázat)
- Szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig
- Ezt követően jégre helyezve 2 x 20 impulzusnyit szonikáltuk (Hielscher UP200S).
- 18000 rpm-en centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszót óvatosan egy másik centrifugatubusba pipettáztuk

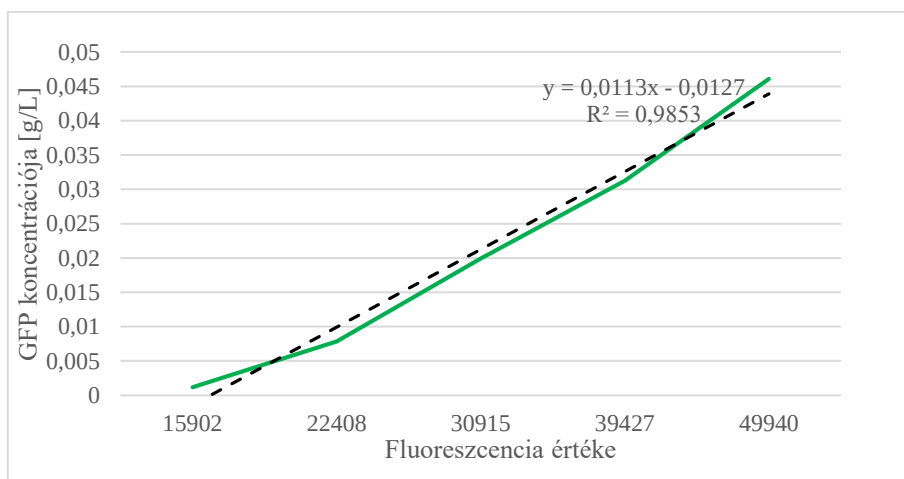
4. táblázat: Lízis puffer összetevői 100 mL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mM	0,89 g
NaCl	300 mM	1,75 g
Imidazol	20 mM	0,135 g
DTT	1 mM	0,0154 g
Triton x 100	1%	1mL
Lizozim	0,1 mg/ mL	0,01 g

3.8. A rekombináns fehérjekoncentráció meghatározása fluorimetriás módszerrel

A minták összegyűjtését és feltárását követően, a rekombináns fehérjék mennyiségének meghatározását fluorimetriás méréssel végeztük. A mintákból 5 µL-t felszuszpentáltunk 100 µL lízis pufferben, majd ebből készítettünk 20x-os hígítást is. Az így kapott minták fluoreszcenciáját mértük a fluoriméter (BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA) segítségével, 520 nm gerjesztési hullámhosszon. Az ismert GFP koncentrációjú oldatokból elkészített kalibrációs egyenes egyenletét felhasználva számoltuk ki a rekombináns fehérje koncentrációját. A kalibrációs görbe látható az 5. ábrán.

A mérés elméleti alapját a GFP fluoreszcens tulajdonsága képezi, melynek köszönhetően a fluoreszcencia intenzitásának mérésével meghatározható a termelődött rekombináns fehérje koncentráció.

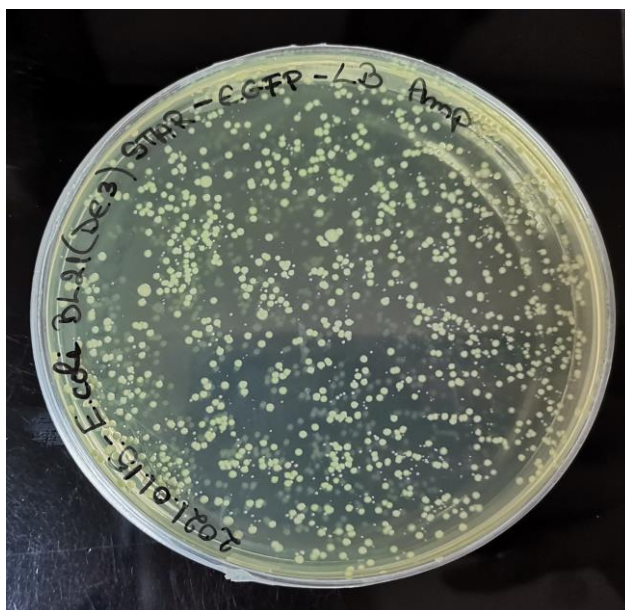


5. ábra: GFP koncentráció meghatározásához alkalmazott kalibrációs egyenes

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Transzformálás kémiai kompetens sejtekbe

A rekombináns fehérjék génjét tartalmazó plazmidok transzformálását követően a sejtekbe, a plazmidon levő antibiotikum rezisztenciának megfelelő antibiotikum tartalmú táptalajokra szélesztettük a sejtuszpenziókat. Az antibiotikum rezisztencia kifejeződésének köszönhetően a táptalajokon csak azok a telepek nőttek ki amelyek tartalmazták a transzformált plazmidokat. Ennek megfelelően a transzformálás sikerességét bizonyítja az 6. ábra, melyen láthatóak a plazmidokat tartalmazó telepek.

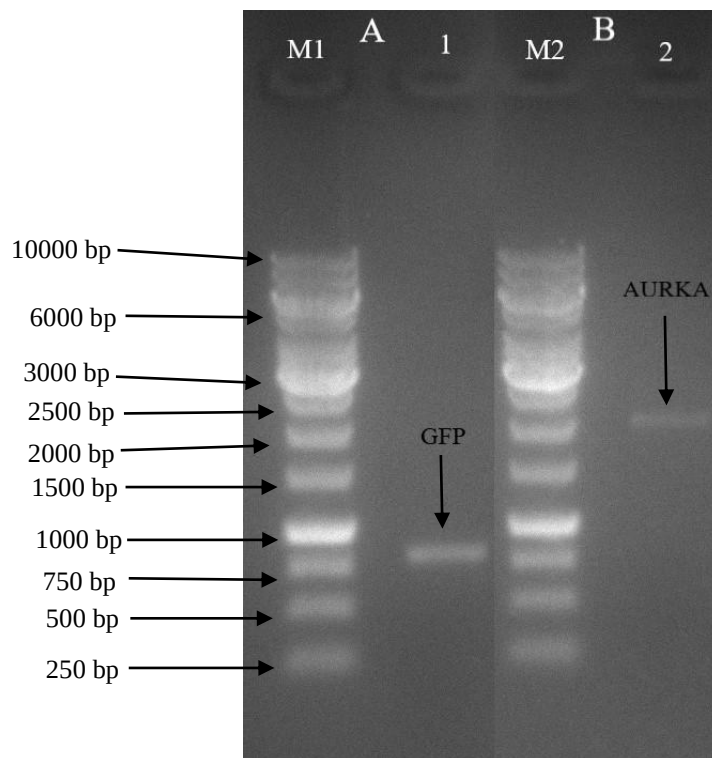


6. ábra: A GFP génjét tartalmazó plazmidok transzformálásának eredményeképpen kinőtt telepek

4.2. Plazmidizolálás eredménye

Az *E. coli* BL21 (DE3) Top10 sejtekben végeztük a plazmidok felszaporítását. A konstrukciók jelenlétét a sejtekben plazmidizolálással és kolónia PCR-el ellenőriztük. A plazmidizolálás sikerességét és a plazmidok jelenlétét ellenőriztük agaróz gélelektroforézissel.

A gélelektroforézis eredménye látható a 7. ábrán amelyen a detektálható sávok megjelenése a plazmidok méretének (GFP: 943 pb, AURKA: 2188 bp) megfelelő helyen látható.



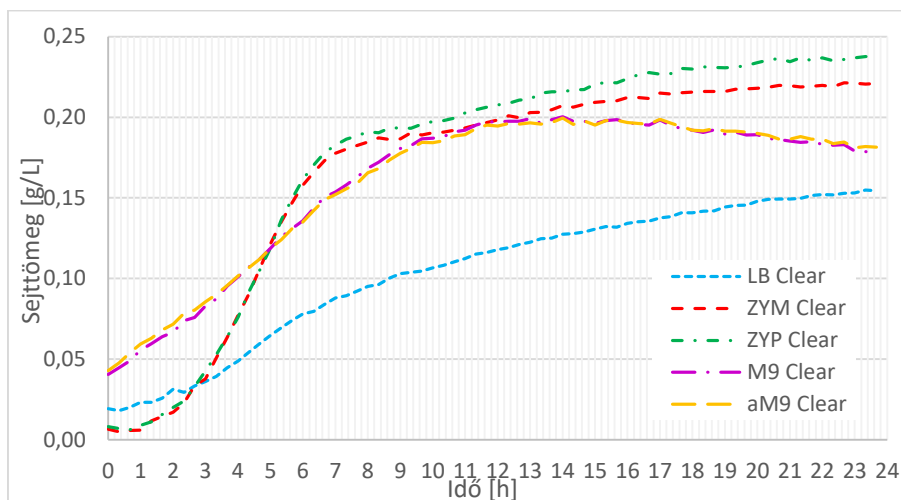
7. ábra: A plazmidizolálás ellenőrzése 1%-os agaróz gélen (M1: DNS molekulásúly marker-Gene Ruler 1 kb(Thermo Scientific) , 1: a GFP génjét tartalmazó plazmid, M2: DNS molekulásúly marker-Gene Ruler 1 kb(Thermo Scientific), 2: AURKA génjét tartalmazó plazmid)

4.3. Mikrotitráló lemezes fermentáció monitorizálása

A fermentációk során a fluoriméter 20 percenként mérte a sejtsűrűséget 600 nm hullámhosszon. Az így kapott értékekből határoztuk meg a sejttömeg időbeni növekedését, a populációdinamikai adatokat.

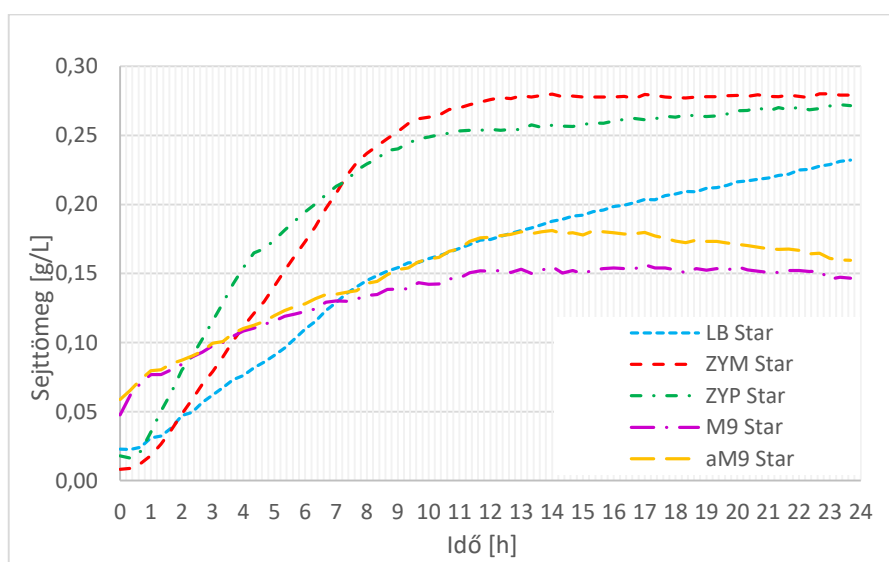
A 8. ábra *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalból származó kultúrák növekedését tartalmazza. Megfigyelhető, hogy a legkisebb sejttömeget az LB táplevesben növekedő sejtek eredményezték, a vizsgált autoindukciós táplevesekben minden esetben nagyobb sejttömeget eredményezett a sejtnövekedés. Az aM9 tápleves esetében egy lassú exponenciális fázis növekedést láthattunk, a ZYM, ZYP táplevesekben egy meredekebb exponenciális fázis volt megfigyelhető. Ezen eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a ZYM, ZYP táplevesek

tápanyagdúsabbak, mint az aM9 leves. A tápanyagdús környezet lehetővé tette a sejtek rövidebb időn belüli adaptációját, míg a szintetikus leves esetében ez hosszabb időt igényelt.



8. ábra: *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalból származó kultúrák növekedése az alkalmazott táplevesekben

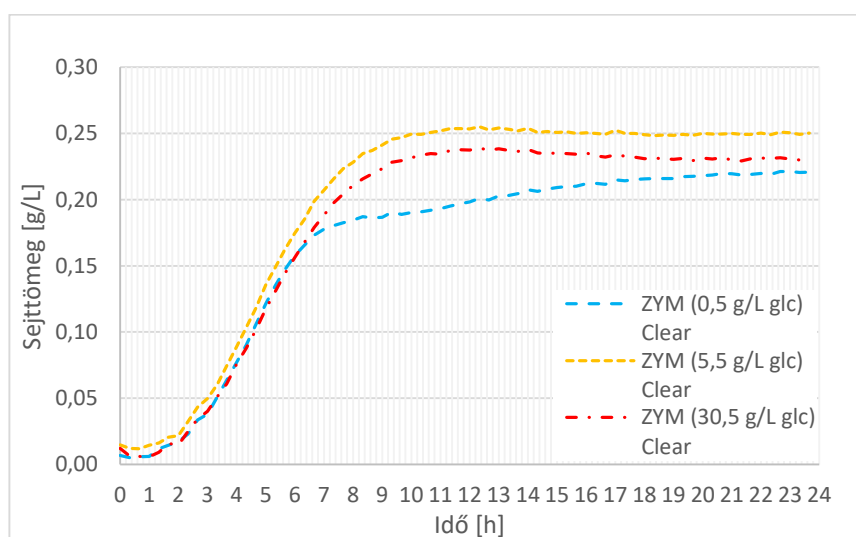
A 9. ábra az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalból származó kultúrák növekedését tartalmazza amely alapján megfigyelhető, hogy a tápanyagban gazdag ZYM és ZYP táplevesekben szintén jelentősen meredekebb exponenciális fázis volt megfigyelhető, mint a szintetikus tápleves esetében, illetve számottevően magasabb az elért sejttömeg mennyisége is hasonlóan az előzőekben észrevételezett eredményekhez.



9. ábra: *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalból származó kultúrák növekedése az alkalmazott táplevesekben

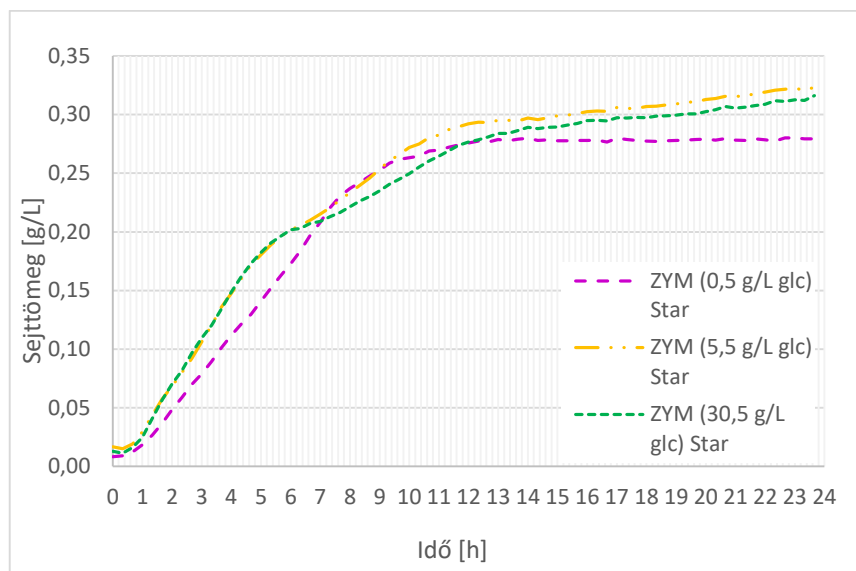
4.4. Alkalmazott táplevesek összehasonlítása a GFP és az AURKA fehérje expressziójára

A három autondukción táplevesben a glükóz koncentráció változásának hatását vizsgáltuk az *E. coli* BL21 (DE3) Star és ClearColi sejtvonalak esetében. A katabolit represszió lévén a glükóz/laktóz arány változtatásával szabályozhatjuk az autoindukciós fermentáció során az indukció kezdetét. Jelen kutatás tárgyát képezte, hogy a hozzáadott glc (jelenléte gátolja az indukciót) milyen hatással van a termelt rekombináns fehérje mennyiségére. A 10. ábra szemlélteti a glükóz koncentráció növelésének hatását a sejtnövekedésre ZYM táplevesekben, *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonal esetében melynek eredménye alapján a glükóz/ laktóz arány a kultúra populációdinamikai fázisaira nézve nem mutatott eltérést.



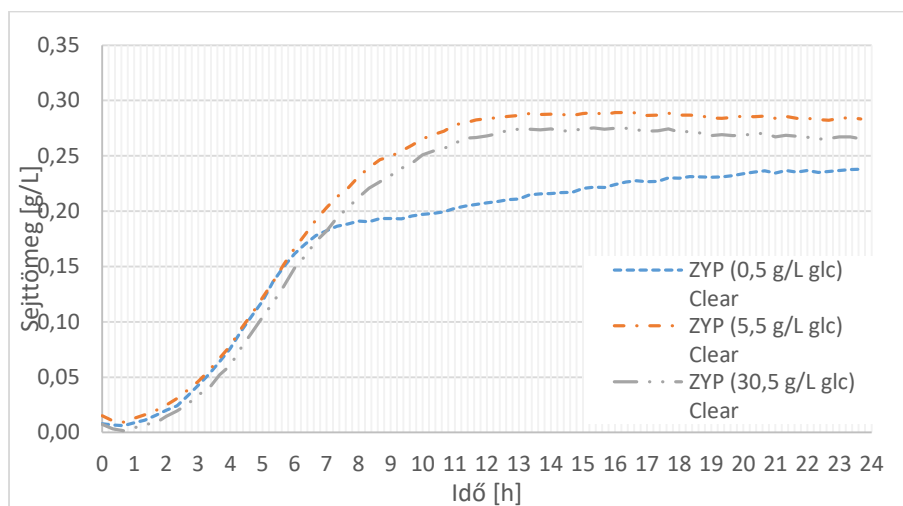
10. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre ZYM táplevesekben, Clear sejtvonal esetében

A 11. ábrán láthatóan az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtek esetében a *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtekkel megegyezően a glükóz koncentráció növelése, ebben az esetben sem mutatott számottevő eltérést a sejtek növekedésének populációdinamikai fázisaira.



11. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre ZYM táplevesekben, Star sejtvonal esetében

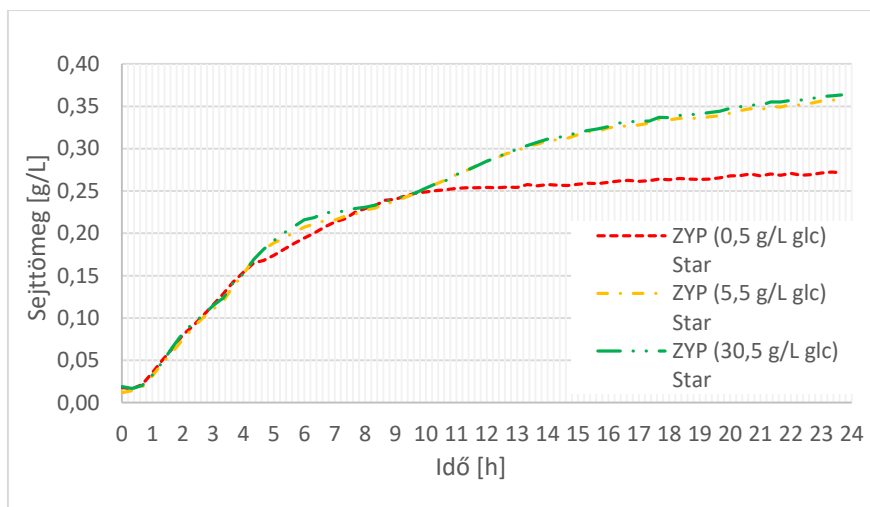
A 12. ábrán látható a glükóz koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre ZYP táplevesekben, az *E.coli* BL21 (DE3) Clear sejtvonal esetében. Az eredmények alapján elmondahtó, hogy a Clear sejtvonal esetében az alap táplevest összehasonlítva a két növelt glc koncentrációjú táplevessel az alap tápleves esetében szignifikáns különbség figyelhető meg az exponenciális fázis meredekségének esetében. A növelt glükóz koncentráció meredekebb exponenciális fázist eredményez.



12. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre ZYP táplevesekben, Clear sejtvonal esetében

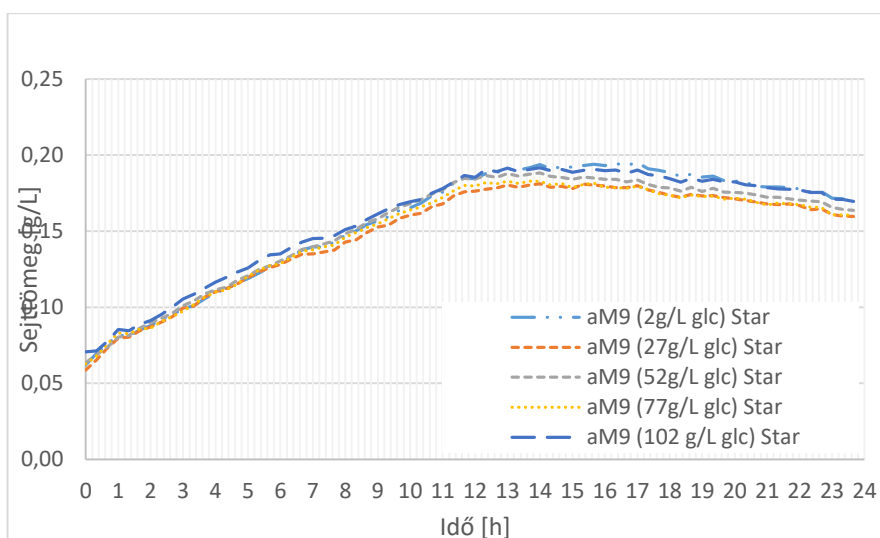
A 13. ábrán látható növekedési görbék esetében megfigyelhető, hogy az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonal esetében a ZYP táplevesben a glükóz koncentráció növelésével számottevően magasabb sejttömeget értünk el mint a Clear sejtvonal esetében, viszont

megfigyelhető, hogy az exponenciális fázis meredeksége nem egyezik meg a két sejtvonal esetében.



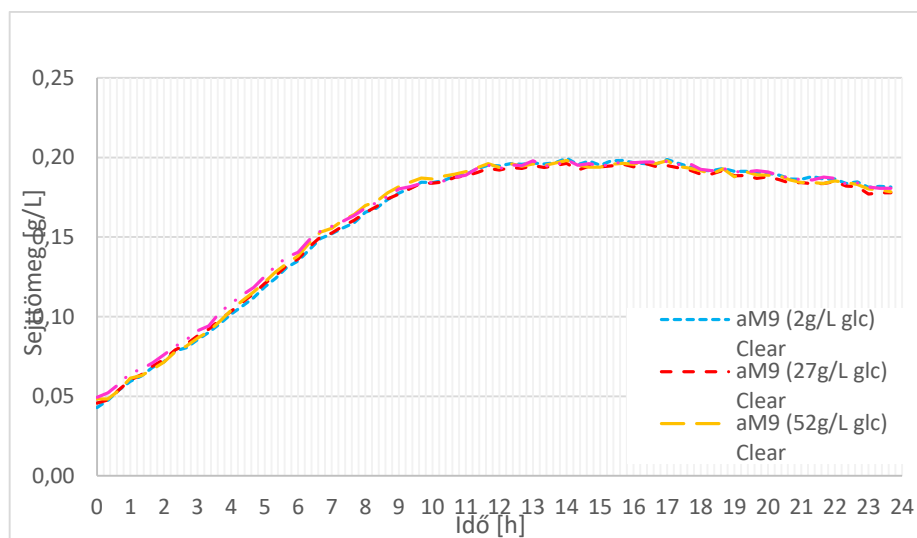
13. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre ZYP táplevesekben, Star sejtvonal esetében

A 14. ábrán látható a glükóz koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre autoindukciós M9 táplevesben, *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonal esetében. Megfigyelhető, hogy a glükóz koncentrációjának változtatása az aM9 táplevesben nincsen hatással a sejtek populációdinamikai fázisaira, a növekedési görbék minden koncentrációnál közel azonos tendenciával növekednek.



14. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre autoindukciós M9 táplevesben, Star sejtvonal esetében

A 15. ábrán látható a glükóz koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre autoindukciós M9 táplevesben, *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala esetében. Az eredmények alapján elmondható, hogy az adott sejtvonala esetében sem volt számottevő a glükóz koncentráció növelésének hatása a sejtek növekedésére. A növekedési görbék ebben az esetben is közel azonos tendenciájú növekedést mutattak minden körülmény esetében.



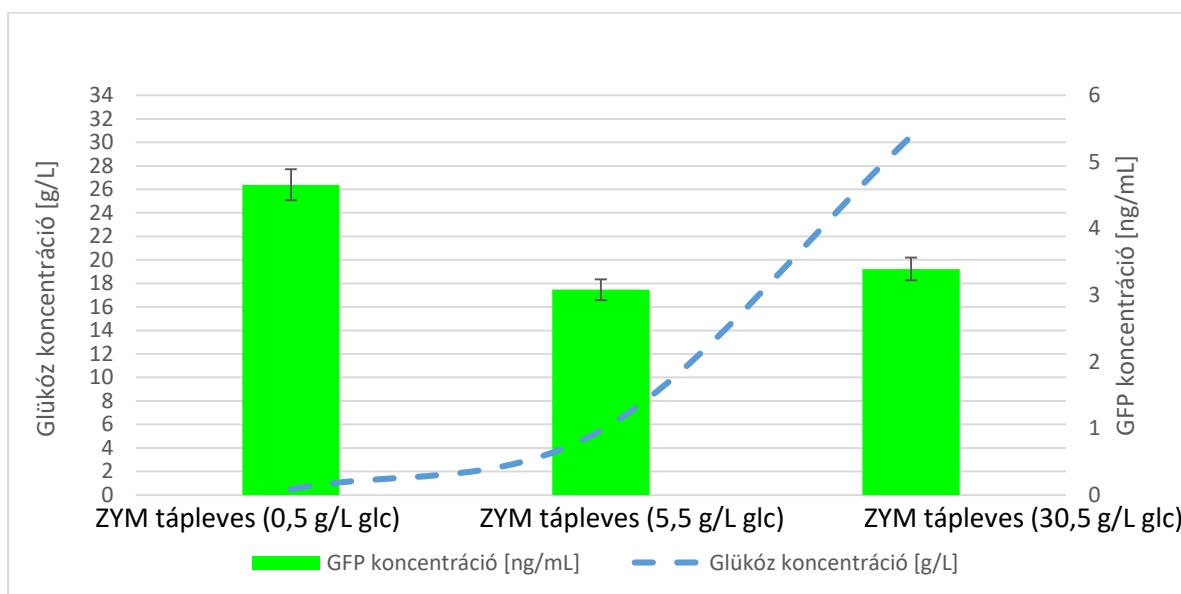
15. ábra: A glc koncentráció növelésének hatása a sejtnövekedésre autoindukciós M9 táplevesben, Clear sejtvonala esetében

A növekedési görbék alapján elmondható, hogy az autoindukciós M9 táplevesben a glükóz koncentráció növelése nem befolyásolta számottevően a sejtnövekedést egyik sejtvonala esetében sem. A ZYM és ZYP táplevesekben viszont látható volt, hogy a glükóz koncentráció növelése pozitívan befolyásolta a sejttömeg növekedését is. Ezek közül is ZYP tápleves esetében a Star sejtvonalnál volt megfigyelhető a legmagasabb glükóz koncentráció esetében a legmagasabb sejttömeg.

4.5. Rekombináns fehérje mennyiségének meghatározása fluoriméteres méréssel

A fluorimetriás mérések alkalmával kapott értékekből meghatározott GFP koncentrációk összehasonlításával határoztuk meg az optimális fehérjetermelési körülményeket. A két legnagyobb fehérjekoncentráció értéket a ZYM táplevesben illetve az 52 g/L glükóz koncentrációjú autoindukciós M9 táplevesben kaptuk.

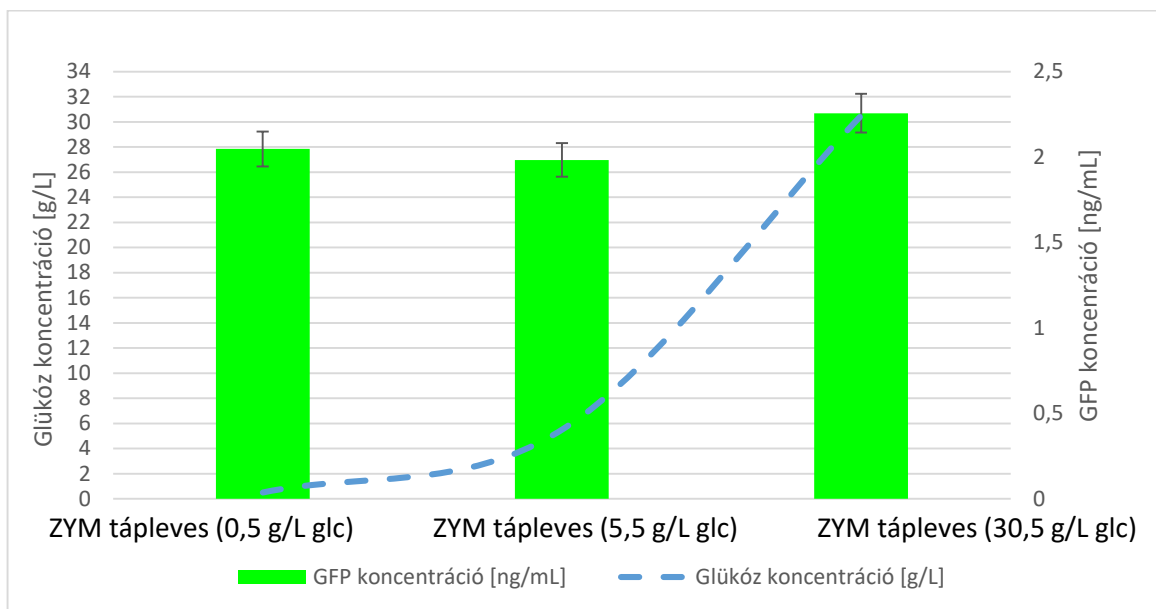
A glükóz koncentrációjának növelésével az autoindukciós fermentáció során időzíthető/programozható az indukció kezdete. A 16. ábrán látható *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápleves esetében. Azon minták esetében amely kezdetben nem tartalmazott nagy mennyiségű glükózt (0,5 g/L glükóz, 2 g/L laktóz, glükóz/laktóz=0,25) végeredményben nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje termelődött.



16. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápleves esetében

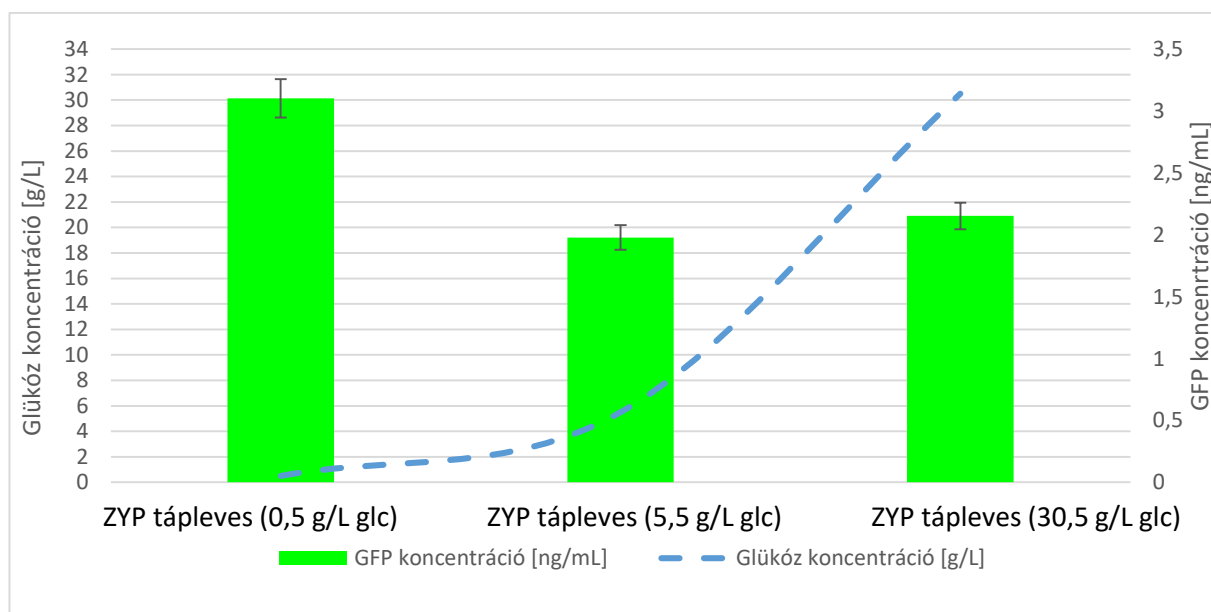
Ezen eredmény értelmében a glükóz/laktóz arány megválasztása egy autoindukciós fermentációs kísérlet során kulcsfontosságú. Amennyiben a termeltetni kívánt rekombináns fehérje toxikus a gazdasejtre nézve, a magas glükóz/laktóz arány használata indokolt, így biztosítható az indukció kezdetének időbeni eltolása, amely által biztosítható, hogy nagyobb sejttömeg mellett valósuljon meg a rekombináns fehérje előállítása.

A 17. ábrán látható *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápleves esetében, melynek eredménye, hogy a glükóz koncentráció növelése látszólag nagyobb rekombináns fehérje termelést eredményezett, a számbeli különbség a másik két körülményhez viszonyítva elenyésző. Elmondható tehát hogy a glükóz koncentráció változtatása nem eredményezett szignifikáns különbséget a fehérjetermelés során.



17. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) Star sejt vonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápleves esetében

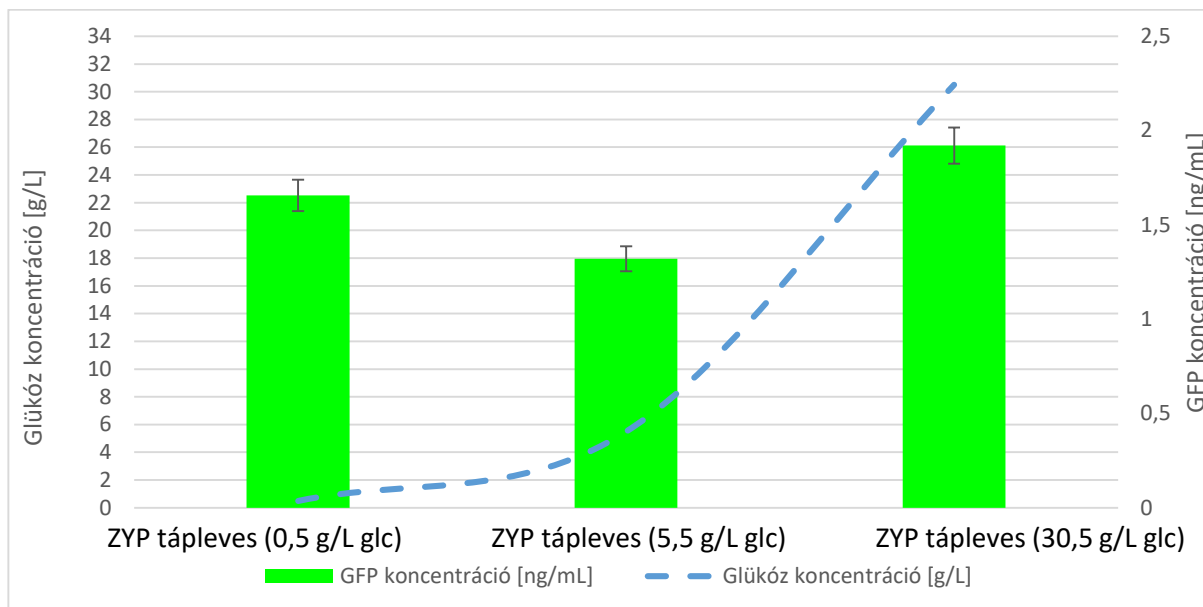
A 18. ábrán látható, hogy a ZYP táplevesben az *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi esetében a glükóz koncentrációjának növelése a rekombináns fehérje expresszió mértékének csökkenését eredményezte. A magas glükóz koncentráció jelenlétében időben eltolódott az expresszió kezdete, és mivel a ClearColi növekedése kisebb volt az előbbieken bemutatott Star sejtek növekedésénél, nem eredményezett ugyanolyan mennyiségű sejt tömeget, kevesebb idő maradt az expresszióra, ez okozza a GFP expresszió mértékének csökkenését.



18. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejt vonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYP tápleves esetében

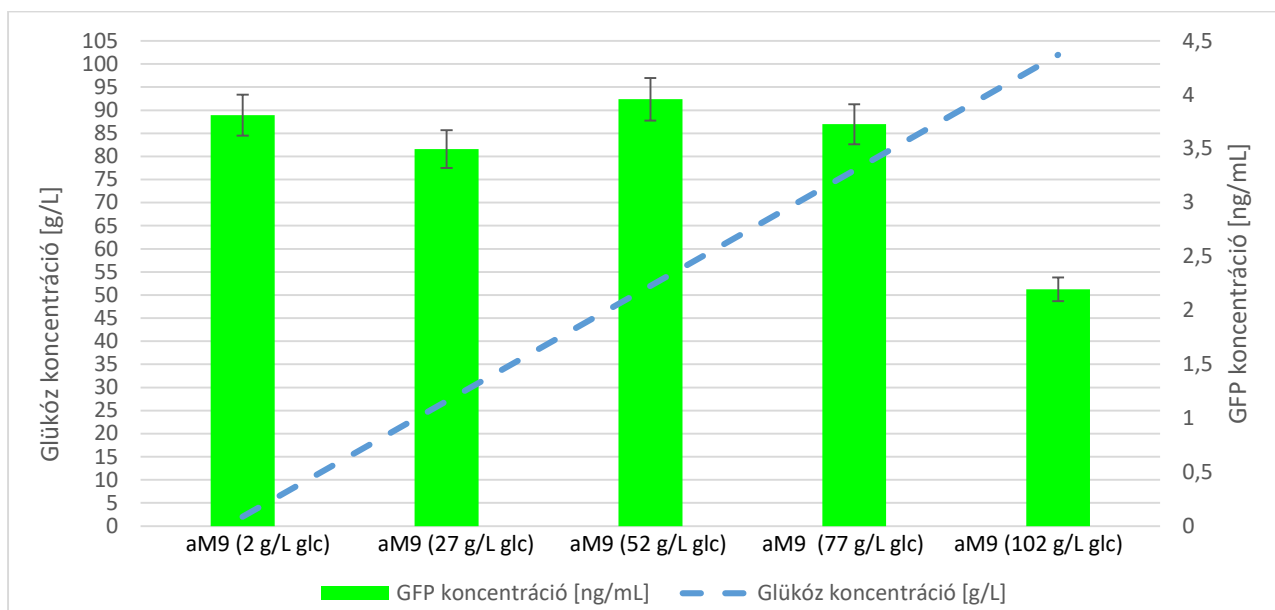
A 19. ábra tartalmazza az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejt vonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggését, ZYP tápleves

esetében. A legmagasabb glükóz koncentráció esetében volt megfigyelhető a legmagasabb rekombináns fehérje koncentráció. Ennek magyarázata, hogy a Star sejtek exponenciális fázisa meredekebb, nagyobb végső sejttömeget eredményezett és a glükóz koncentráció növelése időben eltolta a fehérje expressziót.



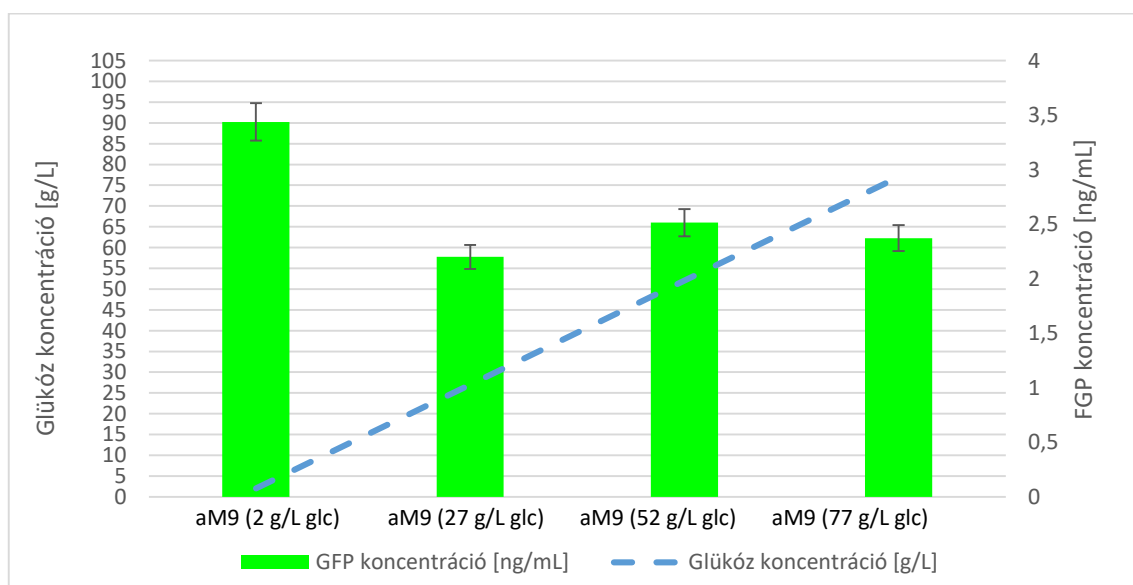
19. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYP tápleves esetében

A 20. ábrán *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése látható autoindukciós M9 táplevesben. Az eredmények azt mutatták, hogy a glükóz koncentráció növelése nem idézte elő a hatékonyabb rekombináns fehérjetermelést. Az előzőekben feltüntetett eredmények alapján itt is elmondható, hogy a fehérje expressziója eltolódott, de az alacsony sejttömeg miatt nem eredményezett magasabb fehérjekoncentrációt. Ezzel egyidőben azonban elmondható, hogy a fermentáció során az aM9 tápleves esetében az 52g/L glükóz koncentráció *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva érték el a legmagasabb rekombináns fehérjekoncentrációt.



20. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkonzentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, autoindukciós M9 táplevesben

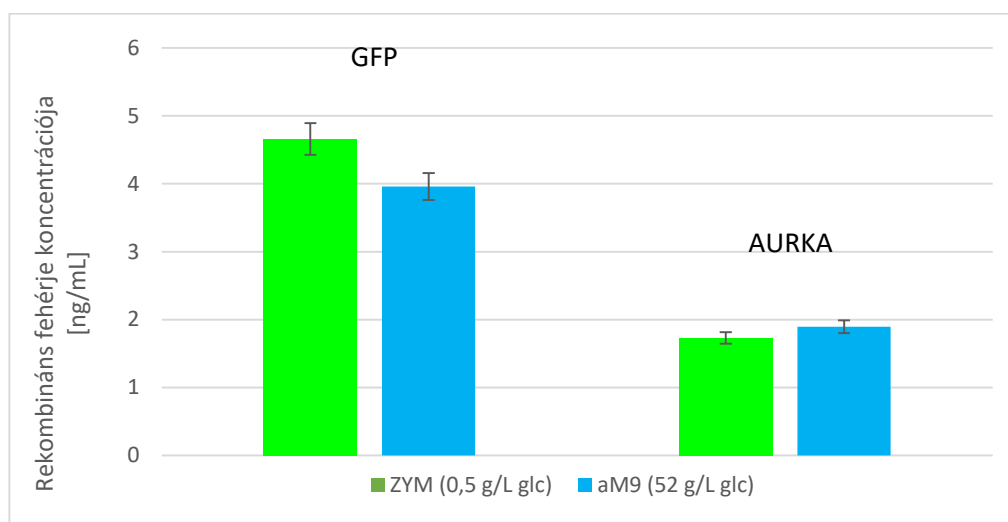
A 21. ábrán látható *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalat alkalmazva a glükózkonzentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, autoindukciós M9 táplevesben. Megállapítható, hogy a glükóz koncentráció növelése nem eredményezett pozitív hatást a fehérjetermelés növelésére.



21. ábra: *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalat alkalmazva a glükózkonzentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, autoindukciós M9 táplevesben

A GFP termeltetésénél kapott eredményeket összehasonlítva egy nehezen termelődő fehérje expressziójánál (AURKA) kapott eredményekkel, megállapítható, hogy a glükóz koncentráció növelése hasonló hatást eredményezett a problémásan termelődő fehérje expressziójának esetében is: nem okozott szignifikáns eltérést a glükóz koncentráció növelése.

A 22. ábrán látható az optimalizált körülményeken termelődött rekombináns fehérjék összehasonlítása, melynek eredménye alapján elmondható, hogy az aM9 táplevesben 0,7 ng- al kevesebb GFP termelődött (3,95 ng/mL) mint a ZYM táplevesben (4,65 ng/mL). Az AURKA esetében nincs szignifikáns eltérés a két tápleves esetében. Ugyanakkor megfigyelhető, hogy a ZYM táplevesben 2,92 ng- al kevesebb AURKA termelődött mint GFP, valamint az aM9 táplevesben ez a különbség 2,06 ng. Ezen eredmény azzal magyarázható, hogy az AURKA egy nehezen termelődő fehérje, normál körülmények között ezen mennyiség termeltetése nem megvalósítható.



22. ábra: Optimalizált körülmények összehasonlítása a GFP és AURKA esetében

Eredményeink alapján elmondható, hogy jelen fermentációs körülmények között végzett programozott rekombináns fehérje expresszió megvalósítható, a normál expressziós körülmények között problémásan termelődő (zárványtestben) vagy nem termelődő rekombináns fehérjék esetében is.

5. Összefoglalás

A kutatásaink során vizsgált különböző értékes eredmények születtek:

- olyan körülmény meghatározása, amely során nagy mennyiségű rekombináns fehérje állítható elő idő- és költséghatékonyan (kvantitatív optimalizálás)
- azon paraméterek meghatározása, amely lehetővé teszi nehezen előállítható fehérjék, lassú, szabályozott előállítását (kvalitatív optimalizálás)

Az *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalból származó kultúrák növekedési görbéje alapján megfigyelhető, hogy **az aM9 tápleves esetében egy lassú exponenciális fázis növekedést** mutat, a **ZYM, ZYP táplevesekben egy meredekebb exponenciális fázis** figyelhető meg. Ezen eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a ZYM, ZYP táplevesek tápanyagdúsabbak, mint a szintetikus aM9 leves. A tápanyagdús környezet lehetővé teszi a sejtek rövidebb időn belüli adaptációját, míg a szintetikus leves esetében ez hosszabb időt igényel.

Az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalból származó kultúrák növekedésénél a gazdag **ZYM és ZYP táplevesekben** szintén jelentősen **magasabb az elért sejttömeg mennyisége**, hasonlóan az előzőekben észrevételezett eredményekhez.

A katabolit represszió lévén a **glükóz/laktóz arány változtatásával szabályozhatjuk autoindukciós fermentáció során az indukció kezdetét**. A **glükóz koncentráció növelésének** hatása a sejtnövekedésre ZYM táplevesekben, *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonal esetében azt eredményezte, hogy a **glükóz/ laktóz arány a kultúra populációdinamikai fázisaira nézve nem mutat eltérést**. Az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtek esetében a *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtekkel megegyezően a glükóz koncentráció növelése szintén **nem mutat számottevő eltérést** a sejtek növekedésének populációdinamikai fázisaira.

A növekedési görbék alapján elmondható, hogy az **autoindukciós M9 táplevesben a glükóz koncentráció növelése nem befolyásolta számottevően a sejtnövekedést** egyik sejtvonal esetében sem. A **ZYM és ZYP táplevesekben** viszont látható, hogy a glükóz koncentráció növelése pozitívan befolyásolta a **sejttömeg növekedését** is. Ezek közül is ZYP tápleves esetében a Star sejtvonalnál figyelhető meg **legmagasabb glükóz koncentráció** esetében a **legmagasabb sejttömeg**. Ezen eredmény értelmében a glükóz/laktóz arány megválasztása egy autoindukciós fermentációs kísérlet során kulcsfontosságú. Amennyiben a termeltetni kívánt rekombináns fehérje toxikus a gazdasejtre nézve a magas glükóz/laktóz arány

használata indokolt, így biztosított az indukció kezdetének időbeni eltolása, amely által biztosítható, hogy nagyobb sejttömeg mellett valósuljon meg a rekombináns fehérje előállítása.

Az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápleves esetében, elmondható, hogy **a glükóz koncentráció változtatása nem eredményezett szignifikáns különbséget a fehérjetermelés során.**

A ZYP táplevesben az *E.coli* BL21 (DE3) ClearColi esetében a magas glükóz koncentráció jelenlétében időben eltolódik az expresszió kezdete, és mivel a ClearColi sejtek esetében kisebb a végső sejttömeg mint a Star sejteknél, kevesebb idő marad az expresszióra, ez okozza a GFP expresszió mértékének csökkenését. Az *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükózkoncentráció és a termelődött GFP mennyiségének összefüggése, ZYP tápleves esetében **legmagasabb glükóz koncentráció esetében figyelhető meg, itt a legmagasabb rekombináns fehérjekoncentráció.**

Autoindukciós M9 táplevesben a glükóz koncentráció növelése nem idézte elő a hatékonyabb rekombináns fehérjetermelést. A fehérje expressziója eltolódott, de az alacsony sejttömeg miatt nem eredményezett magasabb fehérjekoncentrációt. A fermentáció során az **aM9 tápleves esetében az 52g/L glükóz koncentráció *E.coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva érték el a legmagasabb rekombináns fehérjekoncentrációt.**

A GFP termeltetésénél kapott eredményeket összehasonlítva egy **nehezen termelődő fehérje expressziójánál (AURKA)** kapott eredményekkel, megállapítható, hogy a glükóz koncentráció növelése hasonló hatást eredményezett a problémásan termelődő fehérje expressziójának esetében is: **nem okozott szignifikáns eltérést a glükóz koncentráció növelése.**

Az optimalizált körülményeken termelődött rekombináns fehérjék összehasonlításának eredménye alapján elmondható, hogy **az aM9 táplevesben kevesebb GFP termelődött (3,95 ng/mL) mint a ZYM táplevesben (4,65 ng/mL).** Az AURKA esetében **nincs szignifikáns eltérés a két tápleves esetében.**

Eredményeink alapján elmondható, hogy jelen fermentációs körülmények között végzett **programozott rekombináns fehérje expresszió megvalósítható, a normál expressziós körülmények között problémásan termelődő (zárványtestben) vagy nem termelődő rekombináns fehérjék esetében is.**

6. További célkitűzések

További célkitűzésként szeretnénk megvalósítani a szubsztrát illetve indukálószer fogyasztásának/változásának meghatározását HPLC-n.

A továbbiakban szeretnénk megvalósítani ipari enzimtermelést is, olyan génkiütött törzsekben, melyek metabolikus útvonalainak módosítása lehetővé teszi iparilag hasznos termékek előállítását. Az enzimtermelést autoindukciós eljárással, aerob és anaerob körülményeken valósítjuk meg, melynek alapját jelen dolgozat eredményei képezik. Az enzimtermelés ellenőrzését SDS-PAGE módszerrel végezzük.

7. Irodalom

- Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, 2, 385–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>
- Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., De Gruiter, H. M., Kremers, G. J., Davidson, M. W., Ustione, A., & Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 13(7), 557–562. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3891>
- Crowley, E. L., & Rafferty, S. P. (2019). Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labeled proteins. *Protein Expression and Purification*, 157(January), 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007>
- Deng, H., Yan, S., Huang, Y., Lei, C., & Nie, Z. (2020). Design strategies for fluorescent proteins/mimics and their applications in biosensing and bioimaging. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115757. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115757>
- EL-Baky, N. A., Linjawi, M. H., & Redwan, E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0128-x>
- Esmaeili, A., Davison, T., Wu, A., Alcantara, J., & Jacob, C. (2015). PROKARYO: an illustrative and interactive computational model of the lactose operon in the bacterium *Escherichia coli*. *BMC Bioinformatics*, 16, 311. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0720-z>
- Faust, G., Stand, A., & Weuster-Botz, D. (2015). IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 15(8), 824–829. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500011>

- JACOB, F., & MONOD, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, 318–356. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7)
- Kang, H. Y., Ha, S.-H., Yoo, T., Park, H.-J., Lee, J.-A., & Kim, J.-R. (2019). Enhancement of the stability of Mycobacterium tuberculosis recombinant antigen expressed in Escherichia coli using cell lysis additives. *Protein Expression and Purification*, 164, 105453. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105453>
- Li, Z., Kessler, W., Van Den Heuvel, J., & Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1203–1213. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3407-z>
- McCormick, A. M., Jarmusik, N. A., Endrizzi, E. J., & Leipzig, N. D. (2014). Expression, isolation, and purification of soluble and insoluble biotinylated proteins for nerve tissue regeneration. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 83, e51295. <https://doi.org/10.3791/51295>
- Menacho-Melgar, R., Ye, Z., Moreb, E. A., Yang, T., Efromson, J. P., Decker, J. S., Wang, R., & Lynch, M. D. (2020). Scalable, two-stage, autoinduction of recombinant protein expression in E. coli utilizing phosphate depletion. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(9), 2715–2727. <https://doi.org/10.1002/bit.27440>
- Nyitray, L. (2013). *Géntechnológia és fehérfémernökség*.
- Remington, S. J. (2011). Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science*, 20(9), 1509–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.684>
- Rezaei, L., Shojaosadati, S. A., Farahmand, L., & Moradi-Kalbolandi, S. (2020). Enhancement of extracellular bispecific anti-MUC1 nanobody expression in E. coli BL21 (DE3) by optimization of temperature and carbon sources through an autoinduction condition. *Engineering in Life Sciences*, 20(8), 338–349. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900158>
- Rizzo, M. A., Davidson, M. W., & Piston, D. W. (2009). Fluorescent protein tracking and detection: Applications using fluorescent proteins in living cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.top64>
- Studier, F. William. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2005.01.016>

- Studier, F W, & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Studier, W. (2005). New Studier media for auto-induction and other applications ZYM-5052 medium for auto-induction ZYP-5052 medium for auto-induction ZYM-505 medium for plasmid preparation. *Prot. Exp. Pur*, 41, 207–234.
- Szarka, A. (2014). *Biokémia II.: Biokémiai szabályozás*.
- Ukkonen, K., Mayer, S., Vasala, A., & Neubauer, P. (2013). The use of slow glucose feeding as a supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. *Protein Expression and Purification*, 91(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2013.07.016>
- Wahlfors, J., Loimas, S., Pasanen, T., & Hakkarainen, T. (2001). Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochemistry and Cell Biology*, 115(1), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s004180000219>
- Xu, J., Banerjee, A., Pan, S.-H., & Li, Z. J. (2012). Galactose can be an inducer for the production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 30–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.014>

8. Függelékek

1. függelék: Az alkalmazott táplevesek összetevői 1 L térfogatra

Tápleves	Összetevő törzsoldat	Mennyiség
ZYM		
	ZY	958 mL
	50x M	20 mL
	50x 5052	20 mL
	500x MgSO ₄	2 mL
	1000x nyomelem oldat	0,2 mL
ZYP		
	ZY	928 mL
	20x P	50 mL
	50x 5052	20 mL
	500x MgSO ₄	2 mL
	1000x nyomelem oldat	0,2 mL
	Összetevő	Mennyiség
LB		
	Pepton	10 g
	Élesztő kivonat	5g
	NaCl	5g
aM9		
	Na ₂ HPO ₄	3,54 g
	NaCl	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	3,4 g
	NH ₄ Cl	2 g
	glükóz	2 g
	laktóz	2 g
	glicerín	5 g
	MgSO ₄	2 mM
	CaCl ₂	0,02 mM
	1000x nyomelem oldat	1x

2. függelék: *A ZY törzsoldat összetevői 1 L térfogatra*

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
Tripton	1 %	10 g
Élesztő kivonat	0,5 %	5 g

3. függelék: *Az 50xM törzsoldat összetevői 50 mL térfogatra*

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1,25 M	11,125 g
KH ₂ PO ₄	1,25 M	8,5 g
NH ₄ Cl	2,5 M	6,7 g
Na ₂ SO ₄	0,25 M	1,775 g

4. függelék: *Az 20xP törzsoldat összetevői 100 mL térfogatra*

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1 M	17,8 g
KH ₂ PO ₄	1 M	13,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 M	6,6 g

5. függelék: *Az 50x 5052 törzsoldat összetevői 200 mL térfogatra*

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
Glicerín	25 %	39,68 mL
Glükóz	2,5 %	5 g
α-Laktóz	10 %	20 g

6. függelék: *Az 500x MgSO₄ törzsoldat összetevői 50 mL térfogatra*

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
MgSO ₂	1 M	12,325 g

7. függelék: Az 1000x nyomelemeket tartalmazó törzsoldat (TRACE)
összetevői 50 mL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50 mM	0,675 g
CaCl_2	20 mM	0,11 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mM	0,095 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mM	0,205 g
CoCl_2	2 mM	0,02 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mM	0,015 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mM	0,02 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mM	0,02 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2 mM	0,025 g
$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2 mM	0,015 g
HCl	60 mM	25 mL