



**36. Országos
Tudományos Diákköri
Konferencia
2023**



**Antitest-antigén kölcsönhatás kimutatására
alkalmas fúziós fehérje előállítása**

Készítette: Kozma Bence Tamás

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar,

Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

A pályamunka lezárásának dátuma: 2022.11.05.

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Irodalmi áttekintés.....	4
1.1. Antitestek.....	4
1.2. Egydoménos antitestek	4
1.3. Enzimcsatolt immunoszorbens próba (ELISA).....	5
1.5. Torma-peroxidáz	6
1.4. Protein A és a Z-domén.....	7
2. Célkitűzés	8
3. Anyagok és módszerek.....	9
3.1. Szükséges anyagok és eszközök.....	9
3.2. Bakteriális expressziós rendszerek.....	9
3.2.1. pET vektorok	10
3.2.2. SHuffle <i>E. coli</i> gazdasejt	10
3.3. Polimeráz láncreakció (PCR)	11
3.4. Transzformálás	11
3.5. Ni-affinitás kromatográfia	12
3.6. Gélelektroforézis	13
3.6.1. Agaróz gélelektroforézis.....	13
3.6.2. Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)	14
4. Eredmények és értékelésük	14
4.1. Anti-PCV2-HRP-6HIS fehérje előállítása.....	14
4.1.1. A SHuffle kompetens sejt transzformálása pET-23b-anti-PCV2-HRP-6HIS plazmida.....	14
4.1.2. Indukciós kísérletek az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérje termelésének optimalizálására.....	15
4.1.2.1 Bakteriális termeltetés, feltárás és tisztítás	16
4.1.2.2 Az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérjék tisztítása Ni^{2+} -affinitás kromatográfiás módszerrel	17
4.1.3. Új indukciós paraméterek tesztelése az anti-PCV2-HRP-6HIS expressziójára	19
4.2. A Z-domén-HRP-6HIS fehérjét kódoló génkonstrukciók létrehozása.....	21
4.2.1. A Z-domén génjének felszorzosítása PCR reakcióval.....	22
4.2.2 A vektor és az insert emésztése	23
4.2.3 Az emésztett DNS fragmentumok ligálása és transzformálása.....	24
4.2.4 Ellenőrző emésztés és DNS szekvenálás.....	24

4.3. Kísérletek a Z-domén-HRP-6HIS fehérje előállítására.....	25
4.3.1. SHuffle <i>E. coli</i> sejt transzformálása pET23b-Z-domén-HRP-6HIS plazmiddal...	25
4.3.2 Z-domén-HRP-6HIS fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával.....	27
5. Összefoglalás.....	30
Hivatkozások.....	31
A. Függelék.....	33
A.1. LB (Luria-Bertani) tápoldat.....	33
A.2. LB agar táptalaj.....	33
A.3. SOC oldat.....	33
A.4. FPLC 'A' puffer.....	33
A.5. FPLC 'B' puffer.....	33
A.6. SDS-gél.....	34
B. Függelék.....	35
B.1. Az anti-PCV2-HRP-6His génszekvenciája és az expresszáldó fehérje aminosav szekvenciája.....	35
B.1.1. Az anti-PCV2-HRP-6His génszekvenciája.....	35
B.1.2. Az anti-PCV2-HRP-6His aminosav szekvenciája.....	35
B.2. Az anti-PCV2-HRP-6His fehérje tulajdonságai.....	36
B.3. A Z-domén-HRP-6HIS génszekvenciája.....	36
B.4. A Z-domén-HRP-6HIS szekvenálásának eredménye.....	37
B.5. A pET-23b-Z-domén-HRP-6HIS génről expresszáldó fehérje szekvenciája.....	37
B.6. A Z-domén-HRP-6HIS fehérje tulajdonságai.....	38
Köszönetnyilvánítás.....	39

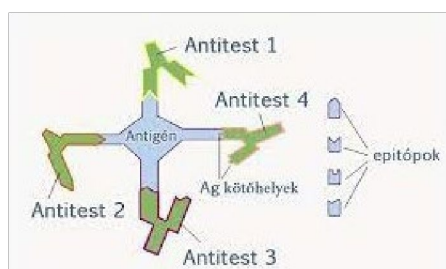
Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol név	Magyar név
Anti-PCV-2	Porcine circovirus type 2 antibody	2-es típusú sertés cirkovírus antitest
CDR	Complementarity- determining regions	Komplementaritást meghatározó régiók
CH	Constant heavy chain	Konstans nehéz lánc
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzimcsatolt immunoszorbens próba
FR	Framework	Vázrendszer
HRP	Horseradish peroxidase	Torma-peroxidáz
IPTG	Isopropyl- β -d-1- thiogalactopyranoside	Izopropil- β -d-1- tiogalaktopiranozid
PAGE	Polyacrylamide gel electrop- horesis	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PCV-2	Porcine circovirus type 2	2-es típusú sertés cirkovírus
pET	plasmid for expression by T7 RNA polymerase	plazmid a T7 RNS polimerázzal történő expresszióhoz
SdAb	Single domain antibody	Egydoménes antitest
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Nátrium-dodecil-szulfát
SOC	Super optimal broth with catabolite repression	Szuper optimális tápleves katabolit represszióval
VHH	Variable domain of heavy-chain antibodies	A nehézláncú antitestek változó doménje

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Antitestek

Az antitestek, vagy immunglobulinok nagyméretű glikoproteinek, amelyek az immunrendszer alapját képezik, és az élő szervezetek egy adott idegen anyag, az ún. antigén jelenlétére adott válaszul termelik. Az antitestek a specifikus molekulafelismerési tulajdonságuk alapján képesek az antigénekhez tapadni, és eltávolítani azt a szervezetből. A szervezet sokféle anyagot tekinthet antigénnek, például mérgező anyagokat, vagy a betegségeket okozó organizmusokat. Amikor egy idegen anyag a szervezetbe jut, akkor azt az immunrendszer képes felismerni, ugyanis ezeknek a felületén több jól felismerhető felületi régió, ún. epitóp található. Egy antigénhez több antitest is csatlakozhat, de lehet, hogy más epitópot ismer meg, vagy ugyanahhoz az epitóphoz kötődik, csak más erősséggel (1. ábra) [3],[4].



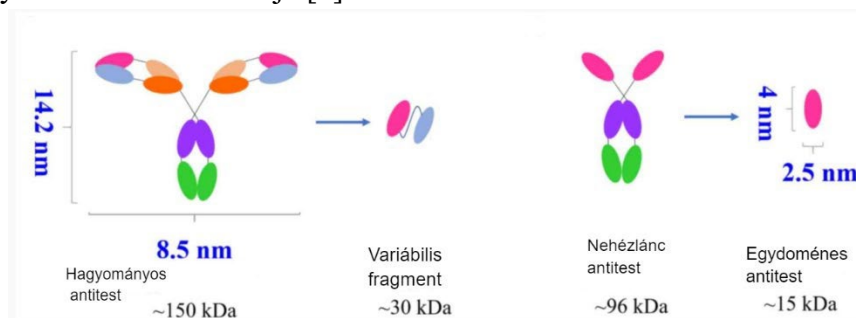
1. ábra. Antitestek epitópokkal való kötődésének sematikus ábrázolása ([5])

A különböző nyiroksejtek által termelt különféle antitesteket poliklonális antitesteknek nevezzük. Azaz a poliklonális antitestek gyakorlatilag az ellenanyagok heterogén keverékei. Az antitesteknek csak egy kis részlete a kötőhely, a többi része pedig az ún. komplementrendszer része [5]. Ez a komplementrendszer annak a közelítőleg 20 fehérjének az együttese, amelyek a vérplazmában keringenek inaktív formában, de egy megfelelő inger, pl. az antitesthez kötődő antigén hatására gyorsan aktiválódnak. Ezeknek a jelenléte aztán elősegíti a fagocitáló sejtek és az antigének találkozását, és ilyen módon az immunválasz létrejöttét.

1.2. Egydoménes antitestek

A tevéfélék (például a tevék, a dromedárok és lámák) és a cápák szervezetében találhatunk olyan antitesteket, amelyekből hiányoznak a könnyűlánc domének és a nehézlánc első konstans doménje is (CH1). Ezeknek a csak nehézláncot tartalmazó antitesteknek az epitópkötő egysége (VHH) egyetlen változó doménből áll, ezeket egydoménes antitestnek (single domain antibody, SdAb) nevezzük (2. ábra). Kis méretük ellenére (Mw ~15 kDa) ezek az egydoménes kötőegységek rendkívül jó affinitással és antigénkötő specifitással rendelkeznek. Hasonlóan a hagyományos antitestek variábilis doménjéhez, az egydoménes antitesteknek is négy állandó vázrégiójuk (FR1-4) van,

amelyeket három hurokrégió (CDR1-3) választ el egymástól. Az SdAb FR2 megkülönböztető jellemzője egy hidrofil felületi exponált „folt” jelenléte, ami nagy valószínűséggel a könnyűlánc-kötés elvesztésének kompenzálására szolgál, valamint a CDR3 hurok esetében gyakori, hogy visszahajlik arra a helyre, ami alapesetben kölcsönhatásba lépne a változó könnyű láncsal. Ezen kívül az egydoménes antitestek CDR3 régiójának hosszúsága változékonnyabb, és jellemzően valamivel hosszabb is, mint a hagyományos antitestek CDR3-ja [6].



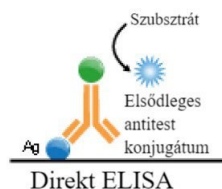
2. ábra. Egydoménes antitestek [7]

Mivel az egydoménes antitestek kis mérettel, illetve egyetlen doménnel rendelkeznek, illetve hidrofil aminosavakat tartalmaznak az FR2-ben, nagy oldhatósággal és fizikai stabilitással rendelkeznek. Ezen tulajdonságok alapján az SdAb-k alacsony költséggel állíthatók elő mikroorganizmusokban. Ezeknek a vonzó tulajdonságoknak az ismeretében már számos vírus ellen sikerült irányított antitesteket izolálni VHH könyvtárakból [6]. Az immunkönyvtárakat létre lehet hozni olyan, vérből izolált limfociták segítségével, amelyeket egy teljes vírussal vagy a megfelelő vírusantigénnel immunizált tevéféléből izoláltak. Emellett a megfelelő SdAb-k olyan natív könyvtárakból is kiválaszthatóak, amiket nem immunizált tevéfélékből nyertek ki. A szintetikus VHH-könyvtárak létrehozásához nincs szükség kísérleti állatkezelésre. Az ilyen könyvtárakat egyetlen egydoménes antitest alapján építik fel, amelynek a konzervált FR-jei megmaradnak, a CDR-ekben lévő aminosavakat pedig helyspecifikus mutációkkal módosítják [3].

Az egydoménes antitestek közvetlen vírusellenes aktivitása mellett ezek úgy is átalakíthatók, hogy célzott hatóanyagként szolgáljanak egy effektor funkciót (például toxint, vírusellenes gyógyszert vagy antitestből származó Fc-domént juttassanak a vírusfertőzés helyére). Az SdAb a fertőző betegségek új diagnosztikai eszközeinek kifejlesztésére is felhasználható [1],[6].

1.3. Enzimcsatolt immunoszorbens próba (ELISA)

Az enzimcsatolt immunoszorbens próba egy nagyon érzékeny immunanalitikai eljárás, ami nagyon specifikusan képes kimutatni egy-egy antigént. Ez a módszer valójában két antitesten alapul. Az ELISA során az antigént egy szilárd felületre immobilizálják, és hozzáadják az elsődleges antitest-enzim konjugátumot, ami az antigénnel komplexet képez. A módszer legfontosabb eleme a rendkívül specifikus antitest-antigén kölcsönhatás. Az ELISA-t jellemzően polisztirol lemezekon végzik, amelyek passzívan képesek kötni az antitesteket és a fehérjéket. Mivel a reaktánsok immobilizálva vannak a mikrolemez felületén, a vizsgálat során mosási lépések alkalmazásával könnyen elkülöníthető a kötött és a nem kötött komponens. Az ELISA-nak négy főbb típusát lehet megkülönböztetni: direkt ELISA, indirekt ELISA, szendvics ELISA, kompetitív ELISA, amelyből a direkt módszer elvének szemléltetése a 3. ábrán látható.



3. ábra. ELISA módszer elvének sematikus ábrája [8]

Az eljárás egy bevonási lépéssel kezdődik, amelynek során a célantigénből, vagy antitestből álló első réteget adszorbeálják a polisztirol lemezre. Ezután az összes nem kötött helyet blokkolószerrel vonják be. Majd ezt a lépést mosási lépések sorozata követi. A lemezt ezután enzimkonjugált antitesttel inkubálják. Újabb mosássorozat eltávolítja az összes nem kötött antitestet. Ezután egy szubsztrátot kell hozzáadni, ami valamilyen színreakciót fog eredményezni [8].

1.5. Torma-peroxidáz

A torma-peroxidáz (horseradish peroxidase, HRP) enzimet először a torma növény gyökeréből sikerült izolálni. Ahogy a neve is mutatja, a peroxidázok közé tartozó enzim, amely a hidrogén-peroxid redukcióját katalizálja vízzé, miközben a szubsztrát (pl. a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) oxidálódik. A szubsztrát oxidációja során fluoreszcens, vagy színes termék képződik, amelyet spektrofotometriás módszerrel mérhetünk. A HRP-t leggyakrabban a másodlagos antitestekhez szokás kapcsolni, és így biztosítják, hogy az adott célfehérjét kemilumineszcens módon ki lehessen mutatni [9].

A torma-peroxidáz egy glikoprotein, amely natív állapotban egy hem proszterikus csoportot tartalmaz [10]. Kimutatták, hogy aktivitását a hozzá kötött glikánok hiányában is megőrzi. A glikánoknak szerepe feltehetőleg a fehérje térszerkezetének fenntartásában van, és növelik a fehérje vízben való oldhatóságát [2]. Ugyanakkor a hem proszterikus csoport jelenléte elengedhetetlen az enzimaktivitás megőrzése szempontjából.

A torma-peroxidáz enzim natív állapotában is jelzi számos specifikus enzim (pl. a glutation peroxidáz) jelenlétét illetve működését kompetitív módon. Valamint a HRP enzim szerepet játszik a növények védelmi funkcióiban és a visszaalakítási folyamatokban is. A torma-peroxidáz enzimet használják számos molekuláris biológiai eljárásnál, mint például: vér glükóz- és koleszterinszint mérésében, vagy immunpróba vizsgálatoknál (ELISA módszer) [11].

A funkcionálisan aktív HRP-t már ezelőtt is termeltettek *E. coli*-ban. A kénhidakban gazdag torma-peroxidázt a sejt oxidatívabb periplazmájában próbálták termeltetni, azonban ezzel a módszerrel csak nagyon kis hozam és aktivitás érhető el [12]. A 4 darab diszulfidhíd jelenléte megnehezítette az enzim *E. coli* citoplazmájában történő expressziót, amit úgy hidalnak át, hogy foszfoglicerát-kináz (PGK) enzimet fuzionáltattak a torma-peroxidáz N-terminálisához, amivel sikerült funkcionálisan is aktív HRP-t előállítani. Az aktív HRP tartalmaz egy központi hem csoportot is. Az *E. coli* képes a genomjáról expresszálni a fehérjék közreműködésével a hem szintézisére, viszont a rekombináns HRP egyidejű túltermelődése esetén holoprotein csak kis mennyiségben képződik. Ezt a problémát meg lehet oldani úgy, hogy a hem transzportrendszer *E. coli*-ba ültetik, és a közeget egy ún. exogén (külső eredetű) hemmel is kiegészítik. A

PGKHRP-t már kis mennyiségű heminnel is aktiválni tudták, azonban ez nem gazdaságos megoldás [14]. Egy másik megoldás, hogy δ -amino-levulinsavat adagolunk exogén módon, ami a hemszintézis útvonal egyik köztes terméke, ami *E. coli*-ban nagyon hatékony, főként akkor, ha a ferrokelatázt a célfehérjével együtt termeltetjük [12].

Összekapcsolt SdAb-HRP rendszert már ezelőtt is sikeresen termeltettek mikroorganizmusokban [13]. Az általam is használt rendszer a [13] alapján lett megtervezve, ahol egy PCV2-CAP (katabolit aktivátor fehérje) ellen termelődött egydoménos antitestet építettek be egy plazmid vektorba a HRP génje mellé. Az expresszálandó fehérjét aztán emlőssejtekben termeltették.

1.4. Protein A és a Z-domén

Az A-protein egy sejtfelszíni fehérje, amelyet a *Staphylococcus aureus* nevű baktériumtörzsben fedeztek fel. Ez a fehérje azért különleges, mert képes több különböző fajból származó IgG molekulát is megkötni. Emiatt a tulajdonsága miatt előszeretettel használják a molekuláris biológiában, elsősorban immunpróba vizsgálatoknál (ELISA) [14].

Napjainkra a gyakorlatban elterjedtek olyan módosított kötőfehérjék is, amelyek az A proteinből származó Z-domén háromhélixes kötőmotívumát használják fel az IgG molekulák kötésére. A Z-domén stabil vázszerkezete lehetővé teszi azt is, hogy egyszerre több aminosavat módosítva más molekulákra specifikus kötőfehérjéket fejlesszünk ki belőlük.

A Z-doménnek nagy előnye még a jó affinitáson kívül az, hogy nem tartalmaz ciszteint, könnyen feltekeredik, így baktériumokban könnyen és olcsón termeltethető. A Z-domén egy viszonylag kisméretű, 6683 Da méretű fehérje [15].

2. Célkitűzés

A munkám célja, hogy kidolgozzak egy olyan eljárást, amivel a fúziós SdAb-HRP fehérje hatékonyan állítható elő funkcionális formában *E. coli*-ban. Ehhez génsebészeti módszerekkel elő kell állítanom egy olyan plazmidot, amely egybeépítve tartalmazza a specifikus kötőfehérjét és a HRP-t kódoló gént. Ezt aztán már lehet termeltetni *E. coli* sejtekben is. SdAb-HRP fúziós fehérjéket korábban emlőssejtekben termeltettek, viszont ennek az expressziós rendszernek a fenntartása eléggé költséges és viszonylag kis kihozatal érhető el így. Mivel a felületi glikánok nem befolyásolják a HRP aktivitását, így bakteriális rendszerekben is lehetséges a funkcionális formában való előállításuk. Ugyanakkor ezekben a fúziós fehérje (és különösen a HRP) nagy cisztein tartalma miatt a diszulfidhidak megfelelő kialakítása komoly kihívás. Ez bizonyos mértékig egyszerűsíthető, ha az SdAb-t egy ciszteinmentes antigénre, a Z-doménre cserélem, amely specifikusan képes IgG-t kötni.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Szükséges anyagok és eszközök

A Z-domén-HRP-6HIS gént a restrikciós vágóhelyekkel a SnapGene viewer (GSL Biotech) programmal terveztem meg, majd a Novagen által gyártott pET23b alapú vektorba építettem be. A restrikciós emésztéshez a New England Biolabs által gyártott NotI és NdeI enzimeket használtam a hozzájuk tartozó pufferekkel, és a gyártó által megadott protokollt alkalmazva. A munka során használt tápoldatokat és eszközöket Sanyo Labo Autoclave-val steriliztem. A fehérje expresszióhoz használt SHuffle rekombináns *E. coli* sejtek a New England Biolabs-tól származtak. A baktériumok tenyésztéséhez LB/Amp tápoldatokat használtam (Luria Bertani - AppliChem és Ampicillin - Sigma Aldrich). A TOP10 sejtekben termelt DNS-t Monarch Plasmid MiniPrep Kit-tel (New England Biolabs) tisztítottam. A DNS-ek agaróz gélen történő vizsgálatához Cleaver Scientific LTD Power Pro gélelektroforézis készüléket alkalmaztam. Az agarózt a Nippon Genetics Europe GmbH gyártotta. A készített agaróz géleket GelRed DNA gel stain (1000×) (Izinta) festékekkel festettem meg. A DNS méretének azonosítására a Thermo Scientific által gyártott GeneRuler 100 bp DNA Ladder és GeneRuler 1 kb DNA Ladder DNS markereket alkalmaztam. Az agaróz gélekből a DNS fragmenseket Monarch DNA Gel Extraction Kit-tel tisztítottam. A Zdomén felsokszorosítását Biometra T personal PCR készülékkel végeztem. A sejtekkel történő munkát Merck Novagen Calbiochem Biosciences lamináris fülkében csináltam. A sejtek indukálásához a Biosynth AG által gyártott IPTG-t (Izopropil-béta-Dtiogalaktopiranozidot) használtam. A baktériumok szaporításához és indukciójához szükséges hőmérsékletet Edmund Bühler TH15 rázóinkubátorral állítottam be. A baktériumok felszaporodását abszorbanciaváltozás mérésével követtem nyomon, amelyhez Jasco V-630 spektrofotométert alkalmaztam. A sejtek centrifugálását Eppendorf centrifuge 5415R készülékkel végeztem. A kromatográfiás vizsgálatokat ÄKTA Start FPLC készülékkel hajtottam végre, amelyhez a használt HiTrap Chelating oszlopokat a GE Healthcare gyártotta.

3.2. Bakteriális expressziós rendszerek

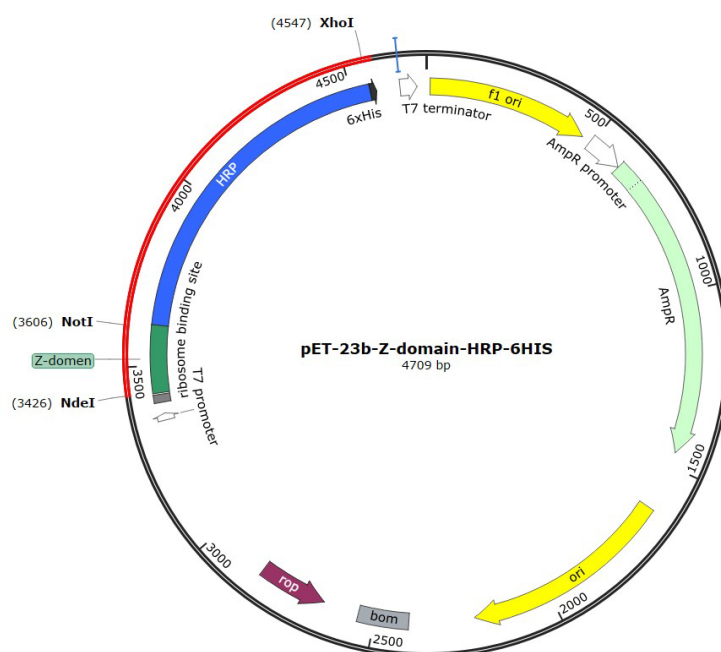
A molekuláris klónozási technikák lehetőséget biztosítanak egy adott DNS szakasz felsokszorosítására, vagy más néven amplifikációjára. Ennek az egyik legalapvetőbb módja az, hogy olyan rekombináns DNS konstrukciókat hoznak létre, melyek lehetővé teszik, hogy a klónozott DNS szakaszokat felsokszorosítsák az adott gazdasejtekben. Ez a folyamat a klónozás, amely során a gazdaszervezet által felvett egyetlen DNS molekulát sokszorosítunk fel a sejtosztódás révén. A rekombináns DNS felszaporításához egy vektorra van szükség [16].

Az expressziós vektorok tartalmaznak olyan DNS szakaszokat is, amelyek elősegítik a beépített idegen DNS szakasz transzkripcióját, illetve transzlációját. Az expressziós vektorok is tartalmaznak valamilyen antibiotikum rezisztenciát kódoló gént. Található bennük egy ún. polilinker régió, ami több restrikciós endonukleáz hasítóhelyét

tartalmazza egy rövid szakaszon belül, és ide az adott gén a megfelelő enzim segítségével beilleszthető. Számos vektorban találhatóak még olyan gének, amelyek olyan fehérjét vagy peptidet kódolnak, amelyek az expresszálandó fehérje tisztítását segítik elő pl. affinitáskromatográfiával. Ilyenek az ún. fúziós jelölések, vagy fúziós „tag”-ek [17].

3.2.1. pET vektorok

A pET vektorcsaládba olyan vektorok tartoznak, amelyekben az expresszálandó fehérjék transzkripcióját a T7 promóter garantálja, a T7 RNS polimeráz által. A rendszer előnye, hogy a T7 RNS polimeráz gyorsabb, mint az *E. coli* saját RNS polimeráza, ezért hatékony szelekció érhető el vele [18].



4. ábra. pET-23b(+) plazmid vektorba illesztett Z-domén-HRP-6HIS gén (a beillesztett gén piros színnel látható) [19] alapján saját szerkesztés

Az általunk használt Z-domén fehérje génje a végein a megfelelő restrikciós vágóhelyekkel együtt a HRP mellé a pET23b vektorba lett beépítve (4. ábra). Ez a gén szekvencia a B.3. függelékben, míg az ebből az expresszálandó fehérje szekvenciája a B.1.2. függelékben látható.

3.2.2. SHuffle *E. coli* gazdasejt

A fehérje termeltetését SHuffle sejtek segítségével végeztem. A SHuffle sejtek esetében a baktériumok citoplazmájában lévő redukzív útvonalakat csökkentették, hogy lehetővé tegyék a diszulfidkötések kialakulását a citoplazmában. Továbbá a kromoszómába integráltak még egy szignálszekvencia nélküli diszulfidkötés-izomerázt, amely tovább növeli a diszulfid-hidak kialakulásának hatásfokát. Mivel az *E. coli* kromoszómája tartalmazza T7 RNS polimeráz génjét, így indukálható IPTG segítségével. A SHuffle sejtek optimális inkubálási hőmérséklete 30°C, szemben a hagyományos *E. coli* sejtekkel szemben, amelyeket 37 °C-on inkubálunk [20,21].

3.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR technika segítségével egy vagy néhány DNS molekula adott szakasza exponenciálisan felszaporítható. Ez a módszer mára a molekuláris biológia egyik legfontosabb módszerévé vált. A jelentősége abban áll, hogy hőstabil DNS-polimeráz enzimet használva laboratóriumban, molekuláris klónozás nélkül is képesek vagyunk egy hosszú DNS kívánt darabját sokszorozítani. Ennek a sokszorozásnak három lépése van, a denaturálás, az anellálás és a polimerizáció, melyeket az eljárásban ciklikusan ismétlünk, tipikusan 25-35-ször. A PCR eljárás lépései:

- Denaturálás: a kétszálú DNS-szakaszt egyszálúsítjuk. Az első fázisban a DNS szálaknak el kell válniuk egymástól, hogy templátként szolgálhassanak. A PCR esetében a DNS kettőshélix szétválasztása termodinamikai módon történik: a magas hőmérséklet következtében a hidrogénkötések felszakadnak, amelyek a bázisokat tartják össze. A másodlagos kötések felszakításához szükséges hőmérséklet a DNS szál hosszától függ. Ebben a lépésben 92-98 °C hőmérsékletet alkalmazunk. Ez a hőmérséklet tartomány elegendő ahhoz, hogy a két DNS szál szétváljon, akkor is, ha hosszabb és komplexebb a DNS templát.
- Anellálás: szintetikus, rövid, komplementer DNS oligonukleotidok (ún. primerek) tapadása a templát DNS szálhoz. A primerek a templát szálak 3'-végeihez tapadnak. A denaturáció során használt magas hőmérséklet megakadályozza, hogy a primerek a megfelelő helyre tapadjanak, így ebben a lépésben le kell csökkenteni a hőmérsékletet. Ez a hőmérséklet függ a primerek hosszától és a szekvenciájától, így az anellálási hőmérsékletet ez határozza meg. A tapasztalat azt mutatja, hogy az ideális hőmérséklet az anellálás során 55 és 65 °C között van, ezért a primereket úgy tervezzük meg, hogy az olvadási hőmérsékletük ebbe a tartományba essen. Ezen kívül a két primer olvadási hőmérsékletének minél közelebb kell lennie egymáshoz (lehetőleg 5 °C-on belül), hogy olyan hőmérsékletet tudjunk beállítani, ahol mindkét primer pontosan tapad.
- Polimerizáció (extenzió): az új, templáttal komplementer DNS szál szintetizálása a monomerekből. A DNS polimeráz elsődleges funkciója a DNS szál szintézise. A természetben rengeteg különböző DNS polimeráz található, de mindegyik közös tulajdonsága, hogy a templátra szintetizált primerekből kiindulva a 3' OH-csoportra a négyféle nukleotidot képesek a templát komplementerének megfelelően beépíteni [15],[16]. Ebben a lépésben a használt DNS polimeráz enzim optimális működési hőmérsékletét, tipikusan 68 vagy 72°C-ot állítunk be.

3.4. Transzformálás

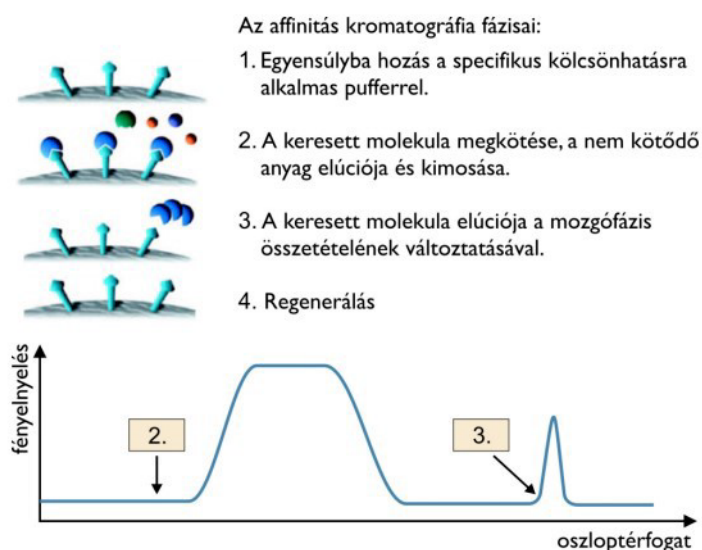
A rekombináns DNS molekulák gazdaszervezetbe juttatásának egyik módja a transzformáció. Ehhez a sejtek membránját átjárhatóvá kell tenni a DNS számára, azaz ún. kompetens sejteket állítunk elő. Ekkor a sejtek képessé válnak felvenni a plazmidot. Általánosságban elmondható, hogy egy sejt csak egyetlen rekombináns DNS-t vesz fel. A transzformációhoz egy szelekciós eljárásra is szükség van, hogy ki tudjuk szelektálni azokat a sejteket, amelyek nem vették fel a plazmidot. Mivel a plazmidok tartalmazzak

antibiotikum rezisztencia gént is, így ez antibiotikumot tartalmazó ún. szelektáló táptalajon szelektív túlélést fog biztosítani a rekombináns DNS-t tartalmazó sejtek számára. Általában azt feltételezzük, hogy a táptalajon kialakuló minden egyes telep egyetlen sejtől keletkezett, azaz genetikailag klónoknak tekinthetők.

A szelekcióhoz leggyakrabban egy penicillin származékot, az ampicillint használják, ami egy β -laktám vegyület, és kötődésével ún. öngyilkos szubsztrátként gátolja a baktérium növekedését úgy, hogy kötődik a transzpeptidáz enzimhez, ami a sejtfal peptidoglikán szintézisében játszik szerepet. Az ampicillin rezisztenciát egy enzim, az ún. β -laktamáz biztosítja, ami elhasítja a β -laktámgyűrűt, és ilyen módon képes a molekula „hatástalanítására” [16].

3.5. Ni-affinitás kromatográfia

Ezzel a módszerrel a különböző biomolekulák nagy hatékonysággal szeparálhatóak specifikus kölcsönhatásaik alapján. Az affinitáskromatográfia azért különleges elválasztástechnika, mert a biomolekula biológiai funkcióján, vagy egyedi kémiai szerkezetén alapul. Az eljárás során a biomolekula kölcsönhatási partnerét rögzítik egy szilárd hordozóra, ami képes reverzibilisen kikötni a keresett biomolekulát az akár sok komponenset tartalmazó mozgófázisból. Ezután a kikötődött biomolekulát a mozgófázis összetételének megváltoztatásával könnyen eluálthatjuk az oszlopról (5. ábra).



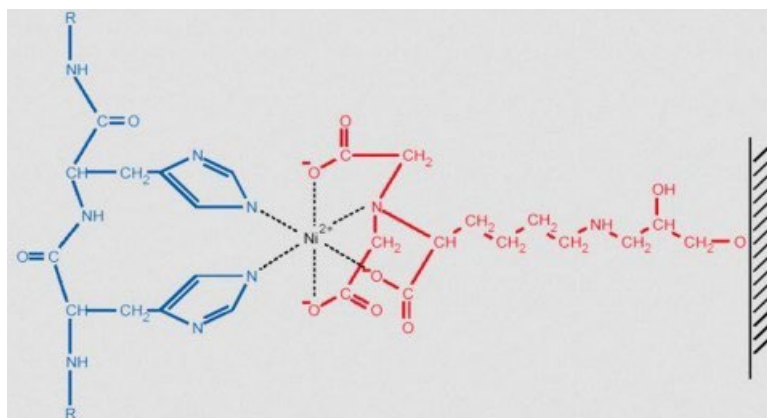
5. ábra. Az affinitáskromatográfia fázisai [22]

Az affinitáskromatográfia nagy felbontóképességű, nagy szelektivitású és kapacitású módszer. A kitermelés nagyon jó, és a tisztulás mértéke több ezerszeres is lehet. Ez a tulajdonság arra is alkalmas, hogy elválasszuk az aktív molekulákat az inaktív formáktól is.

Az affinitáskromatográfiának a rekombináns fehérjék tisztítása során is nagy jelentősége van. Gyakran a termeltetett fehérjét a 3' vagy 5' végen egy ún. fúziós „címkével” látják el géntechnológiai módszerek segítségével, és ennek segítségével ez a fehérje affinitáskromatográfia segítségével könnyedén „kihalászható” [22].

A mi esetünkben a transzlálódó fehérje tartalmaz egy 6×His „tag”-et. Ez a 6×His „címké” egy viszonylag kisméretű peptid, ami csak nagyon minimális mértékben

változtatja meg az expresszáldó fehérje méretét. Minden nikkel-ion 2 hisztidin molekulával képes koordinatív kötés létrehozására (6. ábra). A hordozóra Ni(II)-ionokat kötünk, amelyek szabad koordinációs helyei erős kötést alakítanak ki a hisztidinek imidazol oldalláncaival. Mivel a nikkel-ion 6 koordinatív kötés létrehozására képes, így a többi vegyértékével a gyantára kötött hordozó felületéhez kapcsolódik. A fuzionált fehérje specifikusan képes kötődni a nikkel ionokhoz (és így az oszlophoz) a 6×His „tag” segítségével. Az oszlopról aztán a fehérje először egy kis koncentrációjú (~60 mM) imidazollal történő mosás után magasabb koncentrációjú (300-600 mM) imidazollal eluálható [17],[16].



6. ábra. A hisztidin oldalláncok kötődése a Ni²⁺-kötőoszlophoz [18]

3.6. Gélelektroforézis

Az elektroforézis elvi alapja az, hogy az elektromosan töltött részecskék az ellentétes töltésű elektród irányába vándorolnak. Elektroforézissel a töltéssel rendelkező részecskéket tudjuk elválasztani az alapján, hogy az elektromos erőterben a vándorlási sebességük a méretüktől, alakjuktól és töltésüktől függően eltérő lesz.

3.6.1. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis az egyik legáltalánosabban használt molekuláris biológiai technika a DNS molekulák elválasztására és tisztítására. A módszer nagy előnye, hogy gyors, egyszerűen megvalósítható, és közvetlenül láthatóvá tehető az agaróz gélben lévő DNS. Már nagyon kis mennyiségű DNS is jól látható UV fény alatt pl. etídium-bromid festéket használva. A DNS molekulák vándorlási sebessége az agaróz gélben az elektroforézis során több paramétertől is függ, de ezek közül az alábbiak a legmeghatározóbbak:

- függ a DNS méretétől, ugyanis egy lineáris kettős szálú DNS vándorlási sebessége fordítva arányos a molekulatömeg tízes alapú logaritmusaival
- függ a DNS molekula konformációjától, pl. két azonos molekulatömegű DNS közül a cirkuláris és a lineáris forma eltérő sebességgel vándorol a gélben

- függ az alkalmazott áramtól is, ugyanis kis feszültségek esetén a DNS molekula vándorlási sebessége arányos az alkalmazott feszültség nagyságával
- függ az agaróz gél koncentrációjától is.

Az agaróz gél térhálós szerkezetét a poliszacharid egységek közötti másodlagos kötések alakítják ki. Mivel ebben az esetben nem kovalens kötések alakítják ki a gél, ezért ez magas hőmérsékleten fázisátalakuláson megy keresztül, szol állapotba kerül. Úgy készítjük el az agaróz gél, hogy a futtató pufferrel összekeverjük az agaróz port, majd melegítéssel hozzuk létre a szol állapotot, és a megfelelő formába történő töltés és kihűlés után alakul ki a gél [16],[22],[23].

3.6.2. Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A poliakrilamid gélelektroforézis elsősorban a különböző fehérjék tulajdonságaik szerinti elválasztására alkalmas. Azonban a különböző fehérjék különböző töltéssel rendelkezhetnek az egyes pH értékeken. Így, ha vizes oldatban kényszerítjük őket vándorlásra elektromos erőter segítségével, akkor az egyes fehérjék eltérő sebességgel fognak vándorolni, mivel eltérő mérettel, alakkal és töltéssel rendelkeznek. Így, bár az elválasztás nagy hatékonyságú, mivel egyszerre több elven is zajlik, pusztán ez alapján nem tudjuk megmondani, hogy egy adott fehérje mi miatt vándorol gyorsabban egy másiknál: azért mert kisebb a mérete, vagy mert nagyobb a töltése.

Erre a problémára jelent megoldást az SDS-PAGE, ugyanis itt a fehérjéket elválasztásuk során denaturált állapotban vándoroltatjuk. A fehérje oldathoz redukálószer (pl. β -merkaptóetanolt) adagolva a polipeptidláncok közötti diszulfidhidak is felbomlanak, amely szintén a fehérje „kicsomagolását” segíti elő. Ezáltal az SDS-sel kezelt fehérjék a molekulatömegük szerint fognak elválni a poliakrilamid gélen. A vándorlási sebesség fordítottan arányos a molekulatömeg logaritmusával. Ilyen módon pontosan ismert molekulatömegű kalibráló fehérjék (ún. „létra”) segítségével a meghatározni kívánt fehérje molekulatömege megbecsülhető. Mivel a fehérjéhez kötődött SDS mennyisége közel független a polipeptidlánc szekvenciájától, de arányos a láncuk hosszával, azaz a molekulatömegükkel, ezért az SDS kezelés után a fehérjék relatív töltése közelítőleg azonos lesz. Illetve a fehérjék alakja is hasonló lesz a kezelés hatására, mivel a negatív töltésű SDS részecskék taszítják egymást, így az SDS-sel kezelt fehérjék közelítőleg lineárisak lesznek [22],[24].

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Anti-PCV2-HRP-6HIS fehérje előállítás

4.1.1. A SHuffle kompetens sejt transzformálása pET-23b-anti-PCV2-HRP-6HIS plazmiddal

A pET23b-antiPCV2-HRP-6HIS plazmidot korábban létrehozták a laborban. Az első feladatom az volt, hogy erről megpróbáljak fehérjét termeltetni SHuffle *E. coli* sejtekben. Az antitest a PCV2 (sertés cirkovírus 2) vírus elleni anti-PCV2 SdAb volt. Ezzel az volt a célom, hogy egy funkcionálisan aktív, oldható fehérjét kapjak.

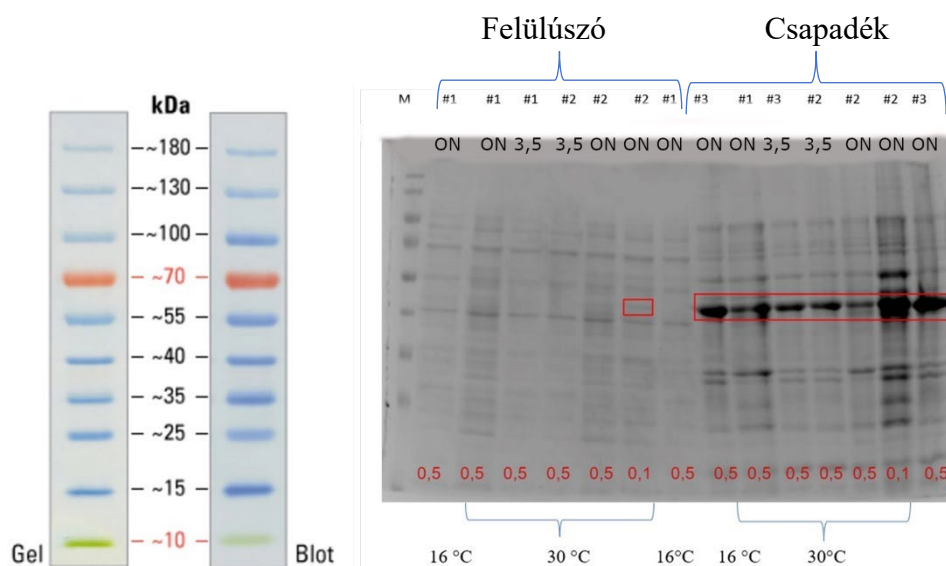
A kész anti-PCV2-HRP-6HIS génnel a SHuffle T7 kompetens *E. coli* sejteket transzformáltam. A transzformálást a [25] alapján végeztem el.

4.1.2. Indukciós kísérletek az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérje termelésének optimalizálására

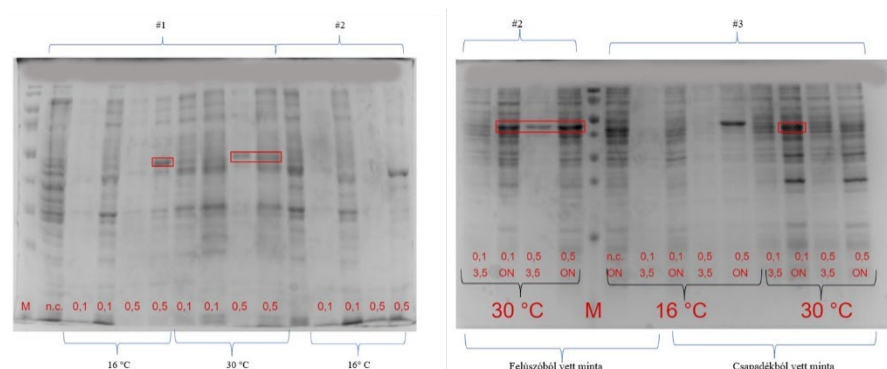
Három kolóniából leoltottam 3 ml LB táptalajba, amelyhez 30 μ l (sterilre szűrt 100 mg/ml-es koncentrációjú) ampicillin antibiotikum oldatot adtam. Ezt a sejtsuszpenziót aztán 16 órán át 30°C-on 275 rpm-en rázatva növesztettem. A 16 órás növesztés után 5 ml LB tápoldatba 2 V/V% sejtsuszpenziót inokuláltam, és hozzáadtam 50 μ l ampicillint is. Az inokulálás után addig növesztettem a mintákat 30°C-on és 260 rpm-en, amíg a 600 nm-en mért abszorbanciája 0,4 és 0,8 közé került. Ezekből aztán 20 μ l mintát vettem, hozzáadtam 20 μ l SDS PAGE mintapuffert (ez SDS-t, merkaptotetanolt, glicerint és brómfenolkéket tartalmaz megfelelően pufferálva), és 10 percig főztem lobogó vízfürdőben.

A felnövesztett kolóniákból hármat kiválasztva azokkal próbaindukciókat végeztem 30°C-on és 16°C-on. Mindkét hőmérsékleten kétféle IPTG koncentrációval indukáltam, ezek 0,1 és 0,5 mM voltak. Mindegyik indukciós mintából vettem mintát az SDS-PAGE történő elemzéshez. Ezeket a mintákat aztán 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltam, majd a felülúszót leöntöttem. A sejteket ezután 20°C-ra helyeztem, majd lizáltam őket. A pelletekhez 250 μ l lízispuffert adtam, majd szuszpendáltam. Ezután kezdtem a sejtfeltárást: behelyeztem őket -80°C-ra 10 percre, majd 37°C-ra, amíg kiolvadt. Ezt háromszor megismételtem. A sejtfeltárást után a mintákat 13000 rpm-en 3 percig centrifugáltam, majd különválasztottam a felülúszót a pellettől, és mindegyikből 20 μ l mintát vettem, hozzáadtam 20 μ l mintapuffert, és 10 percig főztem, majd a mintákat SDS-PAGE-n elválasztottam, hogy lássam mennyi oldható fehérjét sikerült expresszálni. Az oldott fehérje megjelenése a felülúszóban várható, ami pedig a csapadékban marad, az aggregálódott.

Az eredményeket a 7. és 8. ábrákon mutatom be (az expresszálandó fehérje molekulatömege ~49 kDa).



7. ábra. Az indukciós kísérlet eredménye és a marker (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) Ahol M: a marker; # 1, # 2 és # 3 kolóniák; 0,1 és 0,5 az indukálószer (IPTG) koncentrációja mM-ban; 16 és 30° C az indukálási hőmérséklet.



8. ábra. Az 1-es, 2-es és 3-as kolónia indukciós eredményei Ahol M: a marker; # 1, # 2 és # 3 kolóniák; 0,1 és 0,5 az indukálószer (IPTG) koncentrációja mM-ban; 16 és 30° C az indukálási hőmérséklet, n.c. pedig a kolóniából származó negatív kontroll.

Ez alapján az látszik, hogy a 2-es kolóniából, 30 °C-os ON indukció után, 30°Cos és 0,1 mM IPTG koncentráció mellett kaptunk egy kis mennyiségű oldható fehérjét, ezért ezekkel a paraméterekkel kísérleteztem tovább.

4.1.2.1 Bakteriális termeltetés, feltárás és tisztítás

Az előző kísérletben leginkább ígéretesnek tűnő 2-es kolóniáról 6 ml LB-t és 6 μ l ampicillint tartalmazó tápoldatot inokuláltam, majd 30°C-on, 16 órán át 275 rpm-en rázatva növesztettem. Az ON növesztés után a sejtenyészetből 5 ml-rel inokuláltam 500 ml LB tápoldatot és 500 μ l ampicillint adtam hozzá. Ezt a sejtszuszpenziót aztán ~ 3,5 órán át növesztettem, ami alatt a minta 600 nm-en mért optikai denzitása 0,65-re nőtt. Ezután a mintát 0,1 mM IPTG-vel indukáltam és 30°C-on 16 órán át 275 rpm rázatással

inkubáltam. Az indukció után a tenyészetet 30 percig 4500 rpm-en centrifugáltam, és mintát vettem a pelletből és a felülúszóból is. A kiülepedett csapadékot 20 ml FPLC Ni(II)-affinitás 'A' pufferben (A.4. függelék) szuszpendáltam, majd újra centrifugáltam 6500 rpm-en. A centrifugálás után újra szuszpendáltam 20 ml 'A' pufferrel. Hozzáadtam 2 db EDTA-Free Complete tablettát, ami a proteázok inhibeálására szolgál. Ezt követően elvégeztem az ultrahangos sejtfeltárást, majd a mintákat Ni(II)-affinitás kromatográfiával elválasztottam.

4.1.2.2 Az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérjék tisztítása Ni^{2+} -affinitás kromatográfiás módszerrel

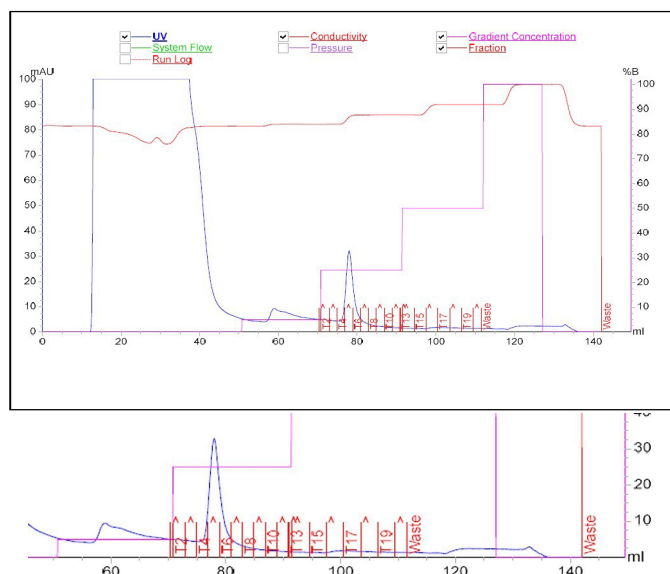
A lecentrifugált sejtszuszpenzió felülúszóját átszűrtem egy $0,22\ \mu\text{m}$ pórusméretű szűrőmembránon. Az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérjék tisztítására kereskedelmi forgalomban is kapható 5 ml-es HiTrap chelating HP Ni(II) -affinitás oszlopot alkalmaztam. Ebben az oszlopban töltésként keresztkötésekkel rögzített agaróz található. A fehérje tisztítása az alábbiakban leírtak szerint zajlott.

Mivel az oszlopot 20%-os etanolban tároltuk, ezért ezt 4 kolonna térfogatnyi desztillált vízzel ki kellett mosni belőle (különben a puffer sója eltömítheti az oszlopot). Ezután, mivel a minta 'A' pufferben volt tárolva, ezért az oszlop egyensúlyba hozása 4 oszloptérfogatnyi 'A' pufferrel történt.

A mintát 2,5 ml/perc áramlási sebességgel vittem az oszlopra, majd addig mostam 'A' pufferrel, amíg az összes nem kötődő komponens távozott a rendszerből. Ez a 280 nm-en mért kromatogram lefutásán volt követhető.

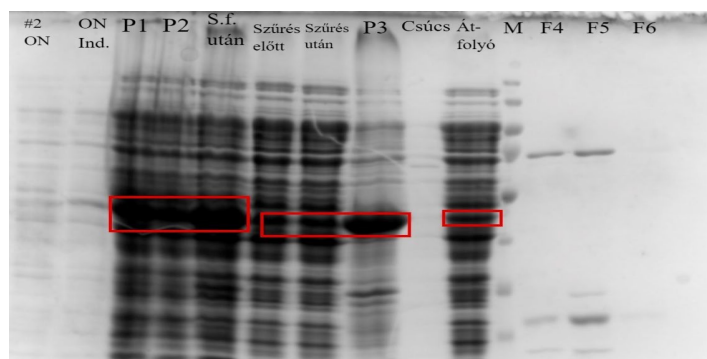
A 6-HIS tag-gel rendelkező anti-PCV2-HRP-6HIS fehérjék leszoríthatóak az oszlopról a magasabb imidazol tartalmú 'B' puffer segítségével. Így az imidazol koncentráció fokozatos növelésével mostam az oszlopot. Az eluálódott fehérjéket frakciókba gyűjtöttem.

Az elúciós puffert lépcsős gradiens szerint alkalmaztam, 5, 25, 50, és 100% B puffert alkalmazva, minden lépcső esetén 4 kolonnátérfogatnyi pufferrel mostam. Az elválasztási kromatogram a 9. ábrán látható:



9. ábra. Az anti-PCV2-HRP-6HIS indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott körülmények között nagyobb térfogatban termeltetett fehérje tisztításának FPLCs kromatogramja

A kromatogramon az eluens puffer adagolásának megkezdése után két abszorbancia csúcs is látható, ami arra utal, hogy fehérje jött le az oszlopról, de ahhoz, hogy megtudjam közte van-e a keresett fehérje megfuttattam a mintákat SDS-PAGE-n:



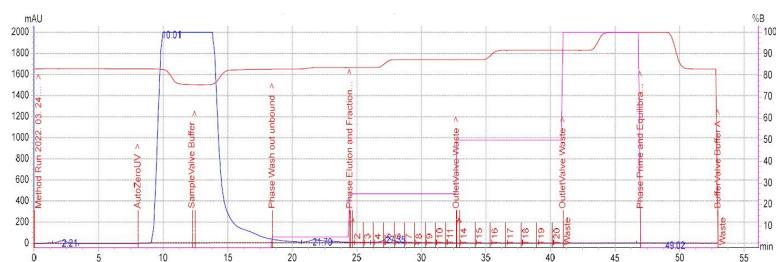
10. ábra. A fehérje expresszió és tisztítás mintái (#2 ON a kolónia ON növesztése után vett minta (negatív kontroll); ON Ind. a sejtek 0,1 mM IPTG-val történő indukciója után vett minta; P1, P2 és P3 a sejtek 4500, 8500 és 40000 RPM-en történő centrifugálása után visszamaradt csapadékból származtak; az S.F. után a sejtfeltárás utáni minta; a csúcs pedig az FPLC-s frakcionálás előtti csúcsból vett minta, M: marker; F4, F5 és F6 a frakciókat jelöli)

Az SDS-PAGE-n történő elemzésnél azt vártuk, hogy mivel körülbelül 50 kDa volt a fehérje molekulatömege, ezért a marker 40 és 55 kDa méretű sávja között fog megjelenni. A gélkép azt mutatja, hogy termelődött fehérje (ez van piros kerettel jelölve), de úgy tűnik, hogy inklúziós testben van, vagyis nem oldható. Bár úgy tűnik, hogy az átfolyó is

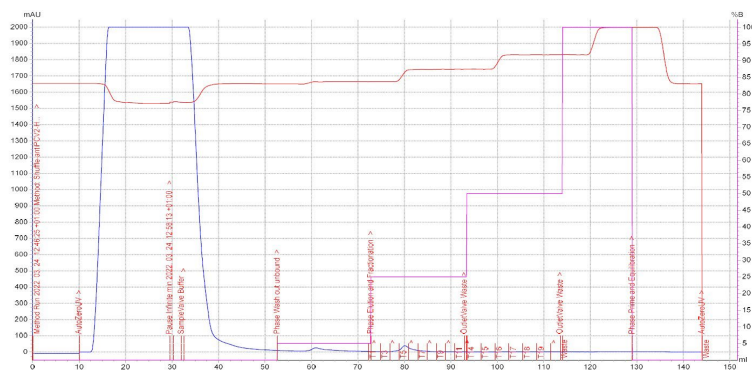
tartalmazhat egy kis mennyiségű ilyen molekulatömegű fehérjét, de az azt jelenti, hogy ez nem kötődött specifikusan az oszlophoz, így ez sem lehet megfelelően feltekeredve.

4.1.3. Új indukciós paraméterek tesztelése az anti-PCV2-HRP-6HIS expressziójára

Mivel 30 °C-on és 0,1 mM IPTG koncentrációnál a nagyobb térfogatú tenyészetből nem sikerült oldható fehérjét előállítani, más paraméterekkel próbálkoztam. Az általam változtatott két paraméter az idő és a hőmérséklet volt. Az egyik esetben a hőmérsékletet csökkentettem le 16°C-ra, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleten lassabbak a sejtfolyamatok, így nagyobb az esélye, hogy a fehérje megfelelően fel tud tekeredni. A másik változtatott paraméter az idő volt, ugyanis 16 óra alatt inklúziós test képződött, de az indukció idő lecsökkentésével a sejteknek kevesebb idejük van inklúziós testet termelni. A 2-es kolóniáról 2×6 ml LB-t és 2×6 µl ampicillint tartalmazó tápoldatot inokuláltam, majd 30°C-on, 16 órán át 275 RPM-en rázatva növesztettem. Az ON növesztés után a sejtenyészetből 5-5 ml-rel inokuláltam 500-500 ml LB/Amp tápoldatba. Ezekhez hozzáadtam az anti-PCV2-6HIS HRP gént tartalmazó inokulumot, majd az egyiket 16 °C-on, ON, 0,1 mM IPTG koncentráció mellett, a másikat pedig 30 °C-on, 3 h-n át, 0,1 mM IPTG koncentráció mellett indukáltam. Majd mindegyik sejt szuszpenziót 4500 RPM-en lecentrifugáltam. A 30 °C-on, 3 h-s indukcióból visszamaradt sejteket 20 ml 'A' pufferben szuszpendáltam, majd hozzáadtunk 2 db EDTA mentes Complete tablettát. A sejtfeltárást jégen, ultrahanggal végeztem. A lizátumot több lépésben, 4500 RPM-en 30 min alatt, 8500 RPM-en 30 min alatt és 40000 RPM-en 30 min alatt lecentrifugáltam. A centrifugálás után a felülúszót 0,22 µm-es szűrőn átszűrtem. Majd ezeket a mintákat is elválasztottam FPLC-vel:



A

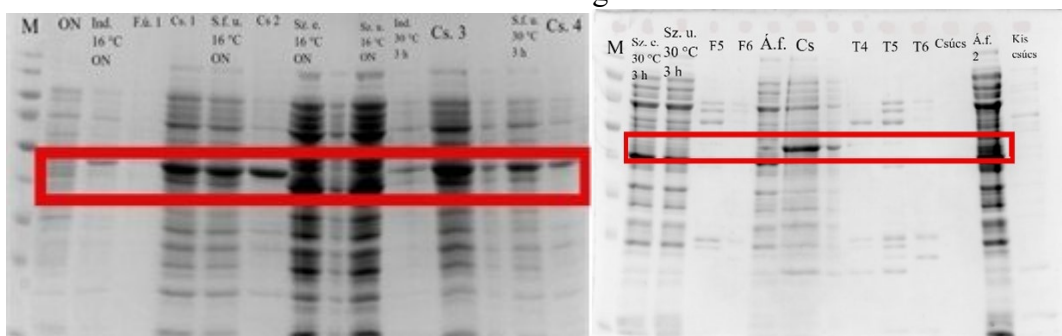


B

11. ábra. Az anti-PCV2-HRP-6HIS 16°C-on (A) és 30 (B) °C-on történő indukciójából nyert sejt felülúszók Ni(II)-affinitás

A kromatográfiás elválasztást a 4.1.2.2 fejezetben leírtak szerint történt.

A frakciókat megfuttattam SDS-PAGE-n, hogy lássam, valahol kaptam-e oldható fehérjét:



12. ábra. Az anti-PCV2-HRP-6HIS indukciójának vizsgálata, ahol: M:marker, ON: az over night növesztés után vett negatív kontroll, Ind 16 °C ON: az indukció után vett minta, F.ú. 1: Felülúszó, 4500 RPM-es centrifugálás utáni (16 °C, ON) minta, Cs 1: Csapadék, 4500 RPM-es centrifugálás utáni (16 °C, ON) minta, S.f. u. 16 °C ON: sejtfeltárás utáni minta, Cs 2: Csapadék, 40000 RPM-es centrifugálás utáni (16 °C, ON) minta, Sz. e. 16 °C ON: szűrés előtti minta, Sz. u. 16 °C ON: szűrés utáni minta, Ind 30 °C 3h- az indukció után vett minta, S.f. u. 30 °C 3 h- sejtfeltárás utáni minta, Cs 3- Csapadék, 4500 RPM-es centrifugálás utáni (30 °C, 3h) minta, Cs 4: Csapadék, 40000 RPM-es centrifugálás utáni (30 °C, 3h) minta, Sz. e. 30 °C 3h: szűrés előtti minta, Sz. u. 30 °C 3h: szűrés utáni minta, F5, F6, T4, T5, T6: a frakciók, Á.f.: átfolyó, Cs: a 40000 RPM-en történő centrifugálás utáni minta, Á.f. 2: a 2. kromatogramon lévő átfolyó

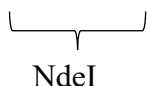
Az eddigi kísérletekből az látszik, hogy a kipróbált körülmények között a fehérje termelődött ugyan, de sehol nem látható a felülúszóban, minden esetben a csapadékban maradt kicsapódva. Mivel eddig semmilyen körülmény mellett nem tudtam oldható fehérjét előállítani, ezért úgy gondoltam, hogy megpróbálok chaperonokat alkalmazni. A művelethez tíz chaperonokat (pTf16) használtam, amelyeket szintén SHuffle sejtekbe transzformáltam. A chaperonok a fehérjék egy funkcionálisan rokon csoportja, amelyek segítik a fehérjék megfelelő feltekeredését olyan módon, hogy felismerik és megkötik a nem natív fehérjéket, így megakadályozzák azok aggregációját. A SHuffle sejtekbe történő transzformálást a [25] szerint végeztem el. Azonban a chaperonokkal történő termeltetés sem volt sikeres.

4.2. A Z-domén-HRP-6HIS fehérjét kódoló génkonstrukciók létrehozása

Mivel az anti-PCV2-HRP-6HIS fehérjét nem sikerült oldható formában előállítani, ezért az anti-PCV2-t a Z-doménre (a protein A Ig-G kötő doménje) cseréltem ki, mert ebben az antigénben nincs cisztein, szemben az anti-PCV2-vel, és így reményeim szerint könnyebben fel tud tekeredni a bakteriális termeltetés során. A Z-domén génjét a HRP mellé a pET-23b NdeI-es és NotI-es vágóhelyei közé építettem be. Ehhez a génkonstrukciót a SnapGene viewer programmal terveztem meg. A Z-doménhez megtervezett primerek a következők voltak:

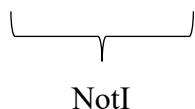
Forward primer:

5'- ACATCATATGGTGGATAACAAATTCAACAAAGAACAAC -3'



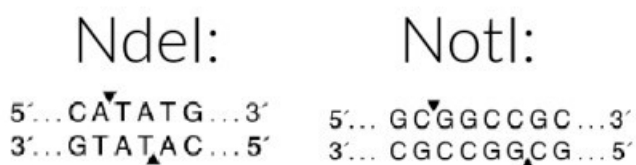
Reverse primer:

5'- ACATGCGGCCGCTTTTGGTGCTTGAGCATCGTTTAG -3'



Ahhoz, hogy a Z-domén így be tudjon épülni a plazmidba, a primereket kellett úgy megterveznem, hogy a végén olyan ragadós véget kapjanak, mint amilyen a vektornak is volt. A tervezés során figyelembe vettem azt is, hogy a primerek olvadáspontja megfelelő legyen. A két primer T_m értéke nagyon közel esett egymáshoz, a forward primeré 67, a reverz primeré pedig 68 °C volt. A GC arányuk pedig: forward primer esetében 32%, reverz primer esetében pedig 53% volt.

Mivel a templátban a Z-domén génje a pET-19b vektorba volt beépítve, így ebből ki kellett PCR-ezni, hogy megkapjam az insertet, és a pET-23b vektorból pedig az antiPCV2 génjét kellett kivágnom. Azért, hogy a vektor és az insert kompatibilisek legyenek egymással, ahhoz azonos ragadós végekkel kell rendelkezniük. Ahhoz, hogy azonos ragadós végeket kapjak, ugyanazokkal az enzimekkel emésztettem a plazmidot és az insertet is. A NotI és NdeI restrikciós enzimek vágóhelyei és ragadós végei az alábbi ábrán láthatók:



13. ábra. Az NdeI és NotI restrikciós enzimek által felismert palindrom szekvenciák a hasítási helyekkel

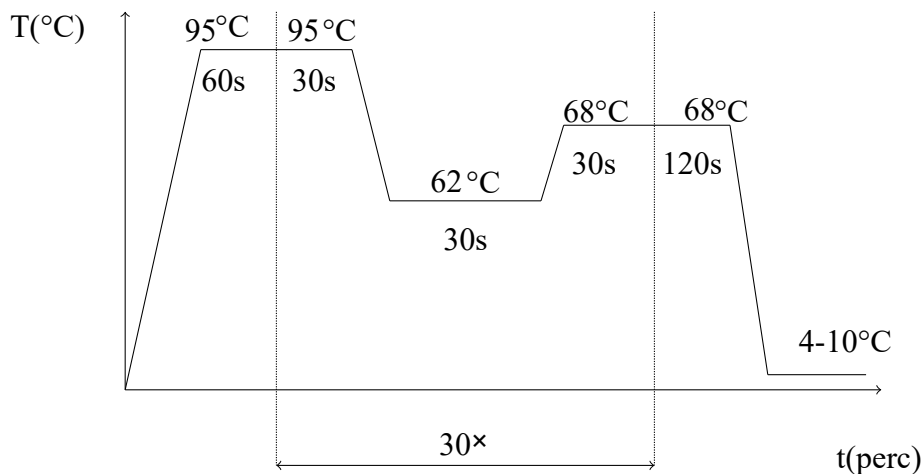
4.2.1. A Z-domén génjének felszorzosítása PCR reakcióval

A kívánt Z-domént kódoló szakaszt a pET-19b vektorból a megtervezett primerekkel PCR készülékben felszorzosítottam. Az 50 µl-es PCR reakcióelegyet a következőképpen állítottam össze:

- 5 µl 10×-es standard Taq puffert
- 5 µl 2 mM-os dNTP-t
- 1 µl 10 µM-os forward primer
- 1 µl 10 µM-os reverse primer

- 1 μ l templát DNS
- 0,25 μ l Taq DNS polimeráz
- 36,75 μ l SDV (steril desztillált víz)

A PCR program hőprofilja:



A PCR terméket elválasztottam 1%-os agaróz gélen:



14. ábra. A PCR termék (markerek: GeneRuler 20 bp DNA Ladder)

A PCR termékek elválasztása során homogén, nagy koncentrációjú termék keletkezett, köszönhetően a jól választott kísérleti paramétereknek. A várt termék mérete ~180 bázispár volt, vagyis a markerek alapján megfelelő méretű terméket kaptam. A PCR terméket ezután a gélből UV fény alatt szikével kivágtam, és Monarch Plasmid MiniPrep Kit-tel kitisztítottam.

4.2.2 A vektor és az insert emésztése

Az anti-PCV2 gént a pET-23b vektorból a NotI és NdeI restrikciós enzimekkel kivágtam, hogy a helyére be tudjam illeszteni a Z-domént. Az emésztési reakcióelegy az alábbiak szerint mértem össze:

- Insert (Z-domén)
 - 7 μ l DNS (Z-domén PCR termék)
 - 1 μ l Cutsmart puffer

- 1 μ l enzim (NdeI és XhoI)
- Plazmid (pET-23b-HRP-6HIS)
 - 5 μ l DNS (pET-23b-HRP-6HIS)
 - 2 μ l SDV
 - 1 μ l Cutsmart puffer
 - 1 μ l enzim (NotI és NdeI)

Az emésztés után gélen elválasztottam a mintákat, majd ezeket gélből izoláltam, ugyanis, ha az emésztési elegyet egyből próbálnánk ligálni, a benne levő restrikciós enzimek mindig elhasítanák, amit a ligáz összekapcsolt.

4.2.3 Az emésztett DNS fragmentumok ligálása és transzformálása

A ligálás során az emésztett pET-23b-6HIS-HRP vektorba beillesztettem a Z-domént kódoló DNS fragmentet. A ragadós végek összeillesztése T4 ligáz enzim segítségével történt. A ligálási reakció összemérése:

- 2 μ l rapid puffer
- 1 μ l ligáz enzim
- 5 μ l vektor
- 2 μ l insert

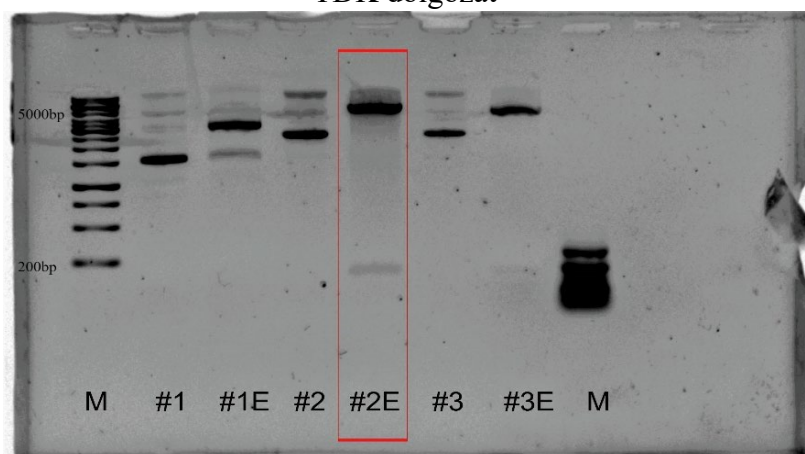
A rapid ligálás Eppendorf csőben, 22 °C-on inkubálva 10 perc alatt történt.

A vektorba beillesztett Z-domén-HRP-6HIS DNS elméleti szekvenciája a B.4. függelékben látható.

A ligátummal TOP10 kompetens sejteket transzformáltam, hogy a plazmidot minél jobban fel tudjam sokszorozítani a ligálás sikerességének ellenőrzéséhez. Ehhez 50 μ l TOP10 *E. coli* sejtet és 5 μ l ligátumot egy Eppendorf csőbe pipettáztam, és 30 percig jégén inkubáltam. Ezután 1,5 percig 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre újra jégre helyeztem a csövet. Majd 500 μ l 42 °C-ra melegített SOC törzsoldatot adtam hozzá. Ezt követően 37 °C-on 45 percig 225 rpm-en rázattam. Az oldatból 50 és 450 μ l-t LB/Amp lemezre szélesztettem ki és 37°C-on ON növesztettem. Másnap a kinőtt kolóniákból véletlenszerűen kiválasztottam 3 darabot, amelyeket LB/Amp tápoldatban felszaporítottam, és ezekből a plazmidot kitisztítottam, majd próbaemésztéssel és szekvenálással ellenőriztem, hogy megfelelő volt-e a Z-domén plazmidba történő beillesztése.

4.2.4 Ellenőrző emésztés és DNS szekvenálás

A tisztított rekombináns DNS-eket az emésztéshez is használt restrikciós endonukleázokkal emésztettem, majd az emésztési elegyeket agaróz gélen elválasztottam, hogy ellenőrizsem sikerült-e a Z-domén génjének beépülése a pET23b-HRP plazmidba. Ennek eredménye a 15. ábrán látható.



15. ábra. Ellenőrző emésztés gélképe (M- GeneRuler 200 bp DNA Ladder és GeneRuler 1 kb DNA Ladder markerek, # 1, 2 és 3 a kolóniák, E pedig az emésztett DNS-t jelöli)

A gélképen látszik, hogy a # 2 minta emésztése után a plazmidból kivált a megfelelő méretű insert (a várt insert mérete ~180 bp, plazmid mérete pedig 4631 bp), így a 2-es kolóniából nyert mintákat elküldtem szekvenáltatni, amelynek az eredménye a B.5. függelékben látható. Az elektroferogram alapján a beépítés sikeres volt, egy helyen található csak a Z-domén szekvenciájában mutáció, ahol egy timin citozinra változott, de ez egy csendes mutáció. Ezután a # 2 kolónia által termelt plazmiddal dolgoztam tovább.

4.3. Kísérletek a Z-domén-HRP-6HIS fehérje előállítására

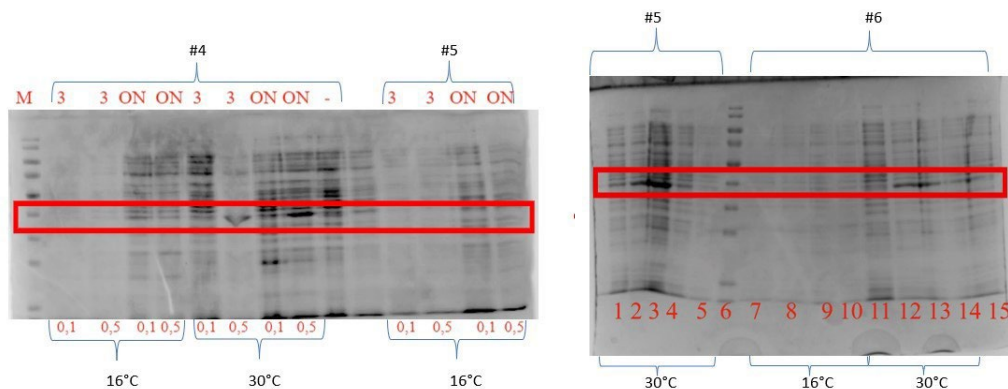
4.3.1. SHuffle *E. coli* sejt transzformálása pET23b-Z-domén-HRP-6HIS plazmiddal

A Z-domén-HRP-6HIS plazmiddal SHuffle T7 kompetens *E. coli* sejteket transzformáltam, hogy az általa kódolt fehérjét expresszáltassam. A transzformálást [21] alapján végeztem el. A transzformált sejteket ON növesztettem LB/Amp táplemezen. A felnőtt sejtekből kiválasztottam 3 kolóniát, és ezeket beoltottam 3 ml LB/Amp tápoldatba, amelyeket aztán ON, 30 °C-on felnövesztettem. Az éjszakai növesztésből 5-5-5 ml LB/Amp tápoldatba oltottam át 1%-nyi inokulumot. Az éjszakai mintákból vettem negatív kontrollt.

Addig növesztettem, amíg az OD₆₀₀ elérte a 0,6-0,8 tartományt (ez ~0,62 volt). Az indukcióhoz különböző körülményeket próbáltam ki:

- Hőmérséklet: 16 °C és 30 °C
- Indukció ideje: 3 h és ON
- IPTG koncentráció: 0,1 és 0,5 mM

Az 5 ml oldatokból szétporcióztam 1-1 ml-t, amit aztán beindukáltam 0,1 és 0,5 mM IPTG-vel. Ezeket a mintákat aztán az indukció végeztével 13000 RPM-en 6 °C-on lecentrifugáltam, és a felülúszót kiöntöttem. A mintákat SDS gélen megfuttattam, amelynek eredménye a 16. ábrán látható.

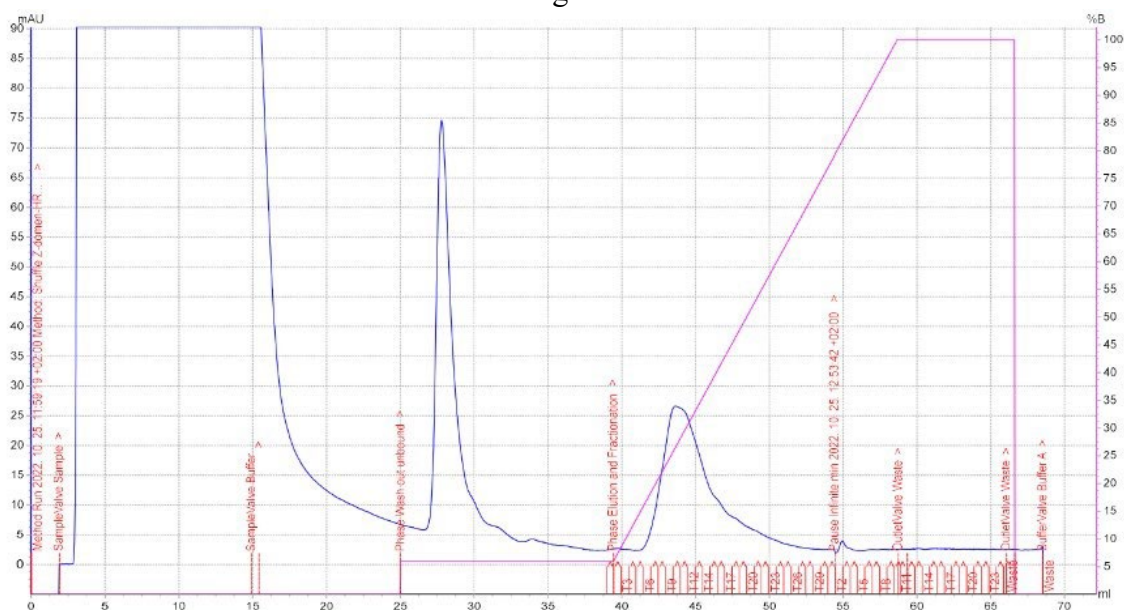


16. ábra. A Z-domén-HRP-6HIS próbaindukciója (# 4, 5 és 6 a kolóniákat jelölik, M: marker, -: negatív kontroll, 3: 3 órás indukció, ON: ON indukció, 0,1 és 0,5 az indukálószer koncentrációja mM-ban

A fenti eredmények alapján úgy gondoltam, hogy a 30 °C-os mintákat célszerű feltárni, hogy megvizsgáljam termelődött-e aktív fehérje. Ezért a sejteket 13000 RPM-en lecentrifugáltam, és a csapadékot 250 μ l lízis pufferben felfuszpendáltam. Lízis puffer:

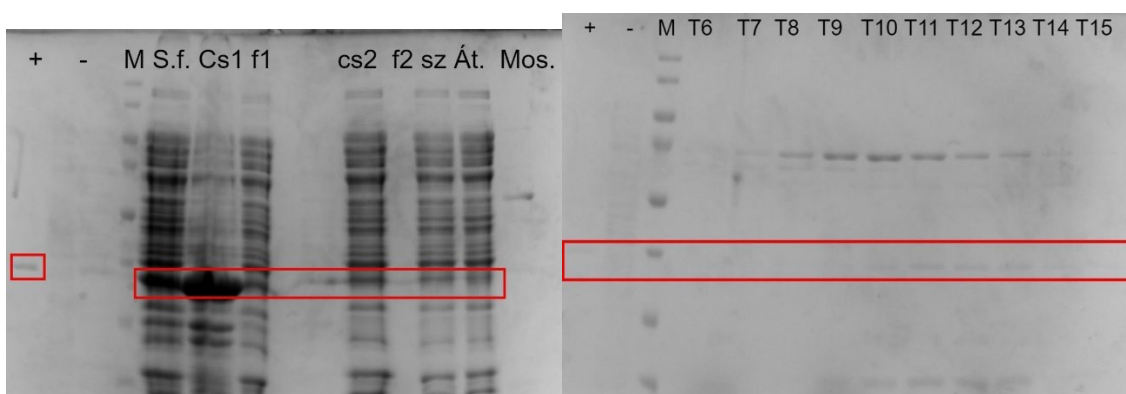
- 50 mM Tris-HCl
- 500 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- 10 % glicerin
- 1 % Triton X-100
- pH=8,5

A sejtek lizálását úgy végeztem, hogy először behelyeztem őket -80 °C-ra 20 percre, majd 45 °C-os vízfürdőben ultrahang mellett 5 percig melegítettem őket, és ezt 3× megismételtem. Lecentrifugáltam a sejtsuszpenziót 13000 RPM-en, 6 °C-on, 5 perc alatt, és lepipettáztam belőle a felülúszót. Ebből mintát vettem, majd a pelletet 250 μ l Tris-pufferben (50 mM Tris, 100 mM NaCl) újra felfuszpendáltam. Ezeket aztán SDS gélen megfuttattam (17. ábra).



18. ábra. A Z-domén-HRP-6HIS indukciós kísérleteinek alapján kiválasztott minták FPLC-s kromatogramja

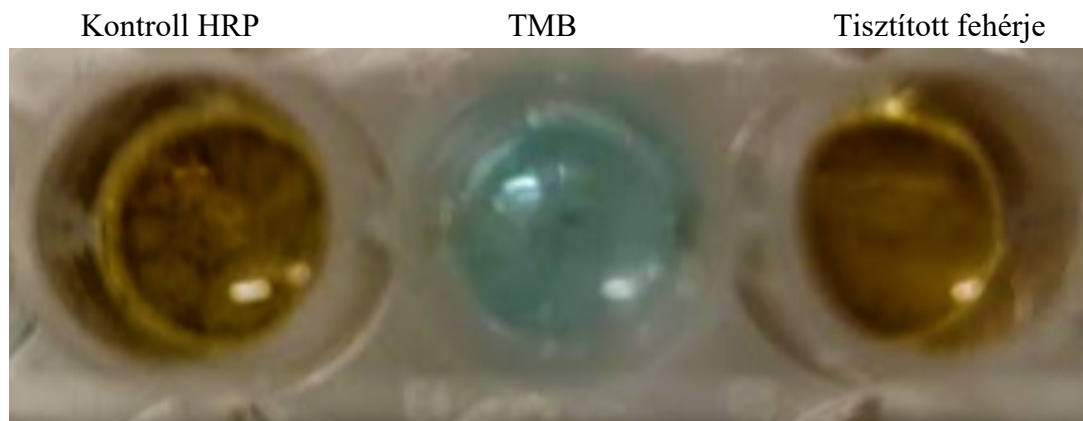
Az elúciós puffert lineáris gradiens szerint alkalmaztam, 5-100% B puffer között, 20 CV-vel. Az eluálódott fehérjéket frakciókba gyűjtöttem. A ~8-35 % B puffer közötti tartományban kaptam egy kromatográfiás csúcsot, és az ehhez tartozó T6-T15 számú frakciókat elválasztottam SDS-PAGE-n:



19. ábra. A fehérje expresszió és tisztítás mintái (+: pozitív kontroll, -: negatív kontroll; M: marker; cs1 és cs2 a sejtek 8500 és 40000 rpm-en történő centrifugálása után a visszamaradt csapadékból vett minták, f1 és f2 a sejtek 8500 és 40000 rpm-en történő centrifugálása után a felülúszóból vett minták, Át: átfolyó, Mos: mosás, T6-T15: frakciók)

A 19. ábra gélképein az látható a piros keretben, hogy a fehérje termelődött, de a nagy része inklúziós testben van, azonban egy kis mennyiségű oldható fehérje látható a T10-T14-es FPLC-s frakciókban. A tisztított fehérjét kipróbáltam ELISA plate-n, hogy TMB-

vel (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) ad-e színreakciót. Ehhez az összemért mintákat 30 percig sötét helyen inkubáltam 25 °C-on. Ennek eredménye a 20. ábrán látható.



20. ábra. HRP vizsgálata ELISA plate-n szubsztrát használatával

A HRP vizsgálatához kontrollként egy szamar-antinyúl Ig-vel összefuzionáltatott gyári HRP enzimet használtam. A TMB alapvetően kék színű, azonban a HRP által katalizált oxidáció hatására sárga színűvé válik. A képen látható, hogy a tisztított fehérje, akárcsak a kontrollként használt enzim megváltoztatta a TMB kék színét sárgára, azaz aktivitást mutat.

5. Összefoglalás

Az ELISA módszer különböző orvosi diagnosztikai és kutatási területen történő alkalmazásához a kulcsot az antitestek jelentik. Azonban a hagyományos antitestek előállítása költséges és bonyolult. Ráadásul ehhez a módszerhez két antitest kell. Ezt ki lehet küszöbölni azzal, ha torna-peroxidáz enzimmel (HRP-vel) egydoménes antitestet fuzionáltatunk, így csak egy antitestre van szükségünk. A HRP-t eddig főként emlőssejtekben termelték, azonban ezek fenntartása drága és csak kis kihozatal érhető el velük. A bakteriális fehérje expresszió sokkal gyorsabban és olcsóbban megvalósítható, viszont a torna-peroxidáz enzim több ciszteint is tartalmaz (szám szerint 8-at), és a diszulfidhidak kialakítása bennük a bakteriális redukzív citoplazmában nehezebb. Ma már létezik olyan rekombináns *E. coli* törzs (SHuffle), amely lehetővé teszi a diszulfidhidak megfelelő kialakítását és így a fehérje megfelelő feltekerését. Az *E. coli* ráadásul képes a HRP hem proszotikus csoportjának szintézisére is.

Munkám során először egy SdAb-HRP fúziós fehérje oldható formában való előállításával próbálkoztam. Ez vélhetőleg a két fehérje komponensben összességében túl sok kénhíd miatt nem sikerült. Az SdAb komponens ezért a stabil szerkezetű, könnyen feltekeredő és cisztein-mentes Z-doménre cseréltem.

Először megterveztem és génszintézeti módszerekkel előállítottam egy fúziós Zdomén-HRP fehérjét expresszálo plazmidot. Ezzel SHuffle *E. coli* sejteket transzformáltam, és az ebből a DNS-ből expresszáló fehérje termeltetéséhez sikerült olyan körülményt találnom, amellyel a Z-domén-HRP-t oldható formában tudtam előállítani. Ezt színreakcióval a HRP aktivitását igazolva közvetve is bebizonyítottam.

A továbbiakban célom a Z-domén-HRP fehérje termeltetési és tisztítási körülményeinek optimalizálása, a színreakción alapuló kimutatási módszer fejlesztése és újonnan szerzett tapasztalataimat felhasználva az SdAb-HRP fehérje megfelelő előállítási körülményeinek további kutatása.

Hivatkozások

- [1] Y. Sheng, K. Wang, Q. Lu, P. Ji, B. Liu, J. Zhu, Q. Liu, Y. Sun, J. Zhang, E. Zhou, Q. Zhao *Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay*, Journal of Nanobiotechnology, 35, 2019
<https://doi.org/10.1186/s12951-019-0468-0>
- [2] S. Škulj, A. Barišić, N. Mutter, O. Spadiut, I. Barišić, and B. Bertoša *Effect of Nglycosylation on horseradish peroxidase structural and dynamical properties*, Computational and Structural Biotechnology Journal, Volume 20, 2022
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.06.008>
- [3] Jurányi R., Vágvolgyi Á. *Általános kórtan, immunitástan, járványtan*, Egészségügyi Szakképző és Továbbképző Intézet, 2006, 108-113.
- [4] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, September 21). antibody. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/antibody>
- [5] Pállinger É., Buzás E., Falus A., Nagy Gy., Holub M. Cs., Tóth S., Kőhidai L., Pál Zs. *Immunológiai szemináriumok*, Semmelweis Egyetem, 2012, 10-12, 24-28
- [6] D. De Vlieger, M. Ballegeer, I. Rossey, B. Schepens and X. Saelens *Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections*, Antibodies, 8, 2019
<https://doi.org/10.3390/antib8010001>, 1-3, 2008
- [7] S. Yu, G. Xiong, S. Zhao, Y. Tang, H. Tang, K. Wang, H. Liu, K. Lan, X. Bi, S. Duan *Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging*, Int J Mol Med., 47(2) 2021
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4817>, 2020
- [8] Boster Biological Technology *ELISA Handbook*
https://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf
- [9] <https://gobertpartners.com/why-horseradish-peroxidase-used-in-elisa>
- [10] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3s1k/protein/1>
- [11] Bertóti R. L. *A torma (Armoracia rusticana) antifungális hatóanyagának vizsgálata in vitro*, Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola, 2019
- [12] S. Chauhan and T. Jin Kang *Soluble expression of horseradish peroxidase in Escherichia coli and its facile activation*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 126(4), 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.004>
- [13] Y. Mu, C. Jia, X. Zheng, H. Zhu, X. Zhang, H. Xu, B. Liu, Q. Zhao and E. Zhou *A nanobody-horseradish peroxidase fusion protein-based competitive ELISA for rapid detection of antibodies against porcine circovirus type 2*, Journal of Nanobiotechnology, 34, 2021

- [14] Hinton-Sheley, Phoebe. (2019, February 26). What is Protein A?. News-Medical. Retrieved on November 04, 2022 from <https://www.news-medical.net/lifesciences/What-is-Protein-A.aspx>.
- [15] Szigeti K. *A Ca^{2+} szerepe a tormaperoxidáz enzim aktív szerkezetében*, Doktori tézisek, Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola, 2008
- [16] Nyitray L., Pál G. *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*, Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013, 176-184, 502-506, 518-520
- [17] Wunderlich L. *Molekuláris biológiai technikák*, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Semmelweis Egyetem, 2014, 38-45, 73-77,
- [18] Novagen *pET System Manual* TB055 8th Edition 02/99,
<https://research.fredhutch.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>
- [19] B. Glick, W. Stokes, J. Smith, J. Broms, R. Ziemiński C. Kaufman, J. Leigh, E. Reid, A. Rickerby, A. Glick, E. Losev, M. Scott *Snapgene viewer*, GSL Biotech LLC, 2004-2022
- [20] <https://international.neb.com/products/c3026-shuffle-t7-competent-ecoli#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>
- [21] J. Lobstein, C. A Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs & M. Berkmen *SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm*, Microb Cell Fact, 11, 753, 2012, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
- [22] Hegyi Gy., Kardos J., Kovács M., Málnási-Czizmadia A., Micsonai A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., és Venekei I. *Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet*, Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013, 74-76, 80-87
- [23] <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/biokemia/dnsklon/laborgyak/gelefo.pdf>
- [24] <https://www.studocu.com/hu/document/budapesti-muszaki-es-gazdasagtudomanyiegyetem/az-elvalasztastechnika-korszeru-modszerei/gelelektroforezis-gepeltjegyzet-reszletes-leirassal-kepekkel/3692326>
- [25] <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformationprotocol-c3029>
- [26] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*

A. Függelék

A.1. LB (Luria-Bertani) tápoldat

- 20 g szilárd LB por
- 1 l desztillált víz
- 121°C-on 30 percig történő sterilizálás autoklávban

A.2. LB agar táptalaj

- 35 g LB agar por
- 1 l desztillált víz
- autoklávban sterilizzük 40 percig

A.3. SOC oldat

- 20 g bacto-tryptone
- 5 g élesztő kivonat
- 0,58 g NaCl
- 0,19 g KCl
- 10 ml 1 M-os MgCl₂
- 10 ml 1 M-os MgSO₄

A bemért elegyet 1 literre kiegészítjük desztillált vízzel, és autoklávban 121°C-on 30 percig sterilizzük. Majd steril fülke alatt a steril oldatból 100 ml-hez 1 ml 2 M-os steril glükóz oldatot adunk.

A.4. FPLC 'A' puffer

- 20 mM NaH₂PO₄
- 500 mM NaCl
- 50 mM imidazol
- pH=7,5

A.5. FPLC 'B' puffer

- 20 mM NaH₂PO₄

- 500 mM NaCl
- 500 mM imidazol
- pH=7,5

A.6. SDS-gél

1 db 12,5%-os SDS gél összetétele:

- Alsó, szeparáló gél összetétele
 - 4 ml „szeparáló gél” oldat, amely összetétele:
 - * 2,8 ml A puffer (182 g Tris-HCl + 4 g SDS / liter, pH=8,8)
 - * 21,75 ml SDV
 - * 15,75 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 3 μ l TEMED (Tetrametil-etilén-diamin)
 - 30 μ l APS (10 m/V%-os ammónium-perszulfát oldat)
- Felső, koncentráló gél összetétele:
 - 1,67 ml „koncentráló gél” oldat, amely tartalmaz:
 - * 6,3 ml B puffer (61 g Tris-HCl+ 4g SDS / liter, pH=8,8)
 - * 15,9 ml SDV
 - * 2,825 ml 40%-os akrilamid oldat
 - 3 μ l TEMED (Tetrametil-etilén-diamin)
 - 30 μ l APS (10 m/V%-os ammónium-perszulfát oldat)

B. Függelék

B.1. Az anti-PCV2-HRP-6His génszekvenciája és az expresszáldó fehérje aminosav szekvenciája

B.1.1. Az anti-PCV2-HRP-6His génszekvenciája

CAT ATG CAG GTT CAG CTG CAA GAA AGC GGT GGT GGT AGC GTT CAG
 GCA GGC GGT AGC CTG CGT CTG AGC TGT GCA GCA AGC GGT TAT GCA
 AGC CGT AGC TAT TGT ATG GGT TGG TTT CGT CAG GCA CCG GGT AAA
 GAA CGT GAA GGT GTT GCA GCA ATT TAT ACC GGT GGT GGC AGC ACC
 AAA TAT GCA GAT AGC GTT AAA GGT CGT TTT ACC ATT AGC CAG GAT
 AAT GCC AAA AAT ACC CTG TAC CTG CAG ATG AAT AGC CTG AAA CCG
 GAA GAT ACC GCA ATC TAT TAT TGT GCA GCA TCA GGT CGT GGT GGT
 ATT TGT GAT CTG AAT TAT AGC ACC GAT TTT CCG TAT TGG GGT CCG
 GGT ACA CAG GTT ACC GTT AGC AGT GCG GCC GCC AGC AGC AGC GGT
 AGC GGT ATG CAG CTG ACC CCG ACC TTT TAT GAT AAT AGC TGT CCG
 AAT GTG AGC AAC ATT GTG CGC GAT ATT ATT GTT AAT GAA CTG CGT
 AGC GAT CCG CGT ATT GCA GCC AGC ATT CTG CGT CTG CAT TTT CAT
 GAT TGT TTT GTG AAT GGT TGT GAT GCA TCC ATT CTG CTG GAT AAT
 ACC ACC TCA TTT CGT ACC GAA AAA GAT GCA TTT GGT AAT GCA AAT
 AGC GCA CGT GGT TTT AGC GTT ATT GAT CGT ATG AAA GCA GCA GTT
 GAA AGC GCA TGT CCG GGA ACC GTT AGC TGC GCT GAT CTG CTG ACC
 ATT GCC GCA CAG CAG AGC GTT ACC CTG GCT GGC GGT CCG AGC TGG
 CGT GTT CCT CTG GGT CGT CGT GAT AGT CTG CAG GCA TTT CTG GAT
 CTG GCA AAT GCA AAT CTG CCT GCA CCG TTT TTC ACC CTG CCG CAG
 CTG AAA GAT AGC TTT CGT AAT GTT GGT CTG AAT CGT AGC AGC GAT
 CTG GTT GCA CTG AGC GGT GGT CAT ACC TTT GGT AAA AGC CAG TGT
 CGC TTT ATT ATG GAT CGC CTG TAT AAC TTT AGC AAT ACC GGT CTG
 CCG GAT CCG ACA CTG AAT ACC ACA TAT CTG CAG ACC CTG CGT GGT
 CTG TGT CCG CTG AAT GGT AAT CTG AGC GCA CTG GTT GAT TTT GAT
 CTG CGT ACC CCG ACA ATT TTC GAC AAC AAA TAT TAC GTG AAC CTG
 GAA GAA CAG AAA GGT CTG ATT CAG AGC GAT CAA GAA CTG TTT AGC
 AGT CCG GAT GCA ACC GAT ACC ATT CCG CTG GTT CGT AGC TTT GCC
 AAT AGT ACC CAG ACC TTT TTC AAT GCA TTT GTG GAA GCA ATG GAT
 CGC ATG GGC AAT ATT ACA CCG CTG ACC GGC ACA CAG GGT CAG ATT
 CGT CGT AAT TGT CGT GTT GTT AAT AGC AAT AGC GAT CTG CTC GAG
 CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA

B.1.2. Az anti-PCV2-HRP-6His aminosav szekvenciája

MQVQ LQES GGGG VQAG GSLR LSCA ASGY ASRS YCMG WFRQ APGK EREG
 VAAI YTGG GSTK YADS VKGR FTIS QDNA KNTL YLQM NSLK PEDT AIYY
 CAAS GRGG ICDL NYST DFPY WPGG TQVT VSSA AASS SGSG MQLT PTFY
 DNSC PNVS NIVR DIIV NELR SDPR IAAS ILRL HFHD CFVN GCDA SILL DNTT
 SFRT EKDA FGNA NSAR GFSV IDRM KAAV ESAC PGTV SCAD LLTI AAQQ

SVTL AGGP SWRV PLGR RDSL QAFL DLAN ANLP APFF TLPQ LKDS FRNV
GLNR SSDL VALS GGHT FGKS QCRF IMDR LYNF SNTG LPDP TLNT TYLQ
TLRG LCPL NGNL SALV DFDL RTPT IFDN KYYV NLEE QKGL IQSD QELF
SSPD ATDT IPLV RSFA NSTQ TFFN AFVE AMDR MGNI TPLT GTQG QIRR
NCRV VNSN SDLL EHHH HHH

B.2. Az anti-PCV2-HRP-6His fehérje tulajdonságai

- Molekulatömeg: 49,4 kDa
- Izoelektromos pont: 6,5
- Extinkciós koefficiens: $38110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Abszorbancia: 0,771 (1 g/l koncentráció esetén, 280 nm-en); feltételezve, hogy minden cisztein oxidált állapotban van

- Extinkciós koefficiens: $37360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Abszorbancia: 0,756 (1 g/l koncentráció esetén, 280 nm-en); feltételezve, hogy minden cisztein redukált állapotban van [26]

B.3. A Z-domén-HRP-6HIS génszekvenciája

ATG GTG GAT AAC AAA TTC AAC AAA GAA CAA CAA AAT GCT TTC TAT
GAA ATC TTA CAT TTA CCT AAC TTA AAC GAA GAA CAA CGT AAC GCC TTC
ATC CAA AGC CTT AAA GAC GAT CCT TCA GTG AGC AAA GAA ATT TTA GCA
GAA GCT AAA AAG CTA AAC GAT GCT CAA GCA CCA AAA GCG GCC GCA
ATG CAG CTG ACC CCG ACC TTT TAT GAT AAT AGC TGT CCG AAT GTG AGC
AAC ATT GTG CGC GAT ATT ATT GTT AAT GAA CTG CGT AGC GAT CCG CGT
ATT GCA GCC AGC ATT CTG CGT CTG CAT TTT CAT GAT TGT TTT GTG AAT
GGT TGT GAT GCA TCC ATT CTG CTG GAT AAT ACC ACC TCA TTT CGT ACC
GAA AAA GAT GCA TTT GGT AAT GCA AAT AGC GCA CGT GGT TTT AGC GTT
ATT GAT CGT ATG AAA GCA GCA GTT GAA AGC GCA TGT CCG GGA ACC GTT
AGC TGC GCT GAT CTG CTG ACC ATT GCC GCA CAG CAG AGC GTT ACC CTG
GCT GGC GGT CCG AGC TGG CGT GTT CCT CTG GGT CGT CGT GAT AGT CTG
CAG GCA TTT CTG GAT CTG GCA AAT GCA AAT CTG CCT GCA CCG TTT TTC
ACC CTG CCG CAG CTG AAA GAT AGC TTT CGT AAT GTT GGT CTG AAT CGT
AGC AGC GAT CTG GTT GCA CTG AGC GGT GGT CAT ACC TTT GGT AAA AGC
CAG TGT CGC TTT ATT ATG GAT CGC CTG TAT AAC TTT AGC AAT ACC GGT
CTG CCG GAT CCG ACA CTG AAT ACC ACA TAT CTG CAG ACC CTG CGT GGT
CTG TGT CCG CTG AAT GGT AAT CTG AGC GCA CTG GTT GAT TTT GAT CTG
CGT ACC CCG ACA ATT TTC GAC AAC AAA TAT TAC GTG AAC CTG GAA GAA
CAG AAA GGT CTG ATT CAG AGC GAT CAA GAA CTG TTT AGC AGT CCG GAT
GCA ACC GAT ACC ATT CCG CTG GTT CGT AGC TTT GCC AAT AGT ACC CAG
ACC TTT TTC AAT GCA TTT GTG GAA GCA ATG GAT CGC ATG GGC AAT ATT
ACA CCG CTG ACC GGC ACA CAG GGT CAG ATT CGT CGT AAT TGT CGT GTT
GTT AAT AGC AAT AGC GAT CTG CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA



MVD NKFN KEQQ NAFY EILH LPNL NEEQ RNAF IQSL KDDP SVSK EILA
EAKK LNDA QAPK AAAM QLTP TFYD NSCP NVSN IVRD IIVN ELRS DPRI AA
SI LRLH FHDC FVNGC DASI LLDN TTSF RTEK DAFG NANS ARGF SVID RM
KA AVES ACPG TVSC ADLL TIAA QQSV TLAG GPSW RVPL GRRD SLQA
FLDL ANAN LPAP FFTL PQLK DSFR NVGL NRSS DLVA LSGG HTFG KSQC
RFIM DRLY NFSN TGLP DPTL NTTY LQTL RGLC PLNG NLSA LVDF DLRT
PTIF DNKY YVNL EEQK GLIQ SDQE LFSS PDAT DTIP LVRS FANS TQTF
FNAF VEAM DRMG NITP LTGT OGOI RRNC RVVN SNSD LLEH HHHH H

B.6. A Z-domén-HRP-6HIS fehérje tulajdonságai

- Molekulatömeg: 42,1 kDa
- Izoelektromos pont: 5,5
- Extinkciós koefficiens: $14940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Abszorbancia: 0,359 (1 g/l koncentráció esetén, 280 nm-en); feltételezve, hogy minden cisztein oxidált állapotban van
- Extinkciós koefficiens: $14440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Abszorbancia: 0,347 (1 g/l koncentráció esetén, 280nm-en); feltételezve, hogy minden cisztein redukált állapotban van [26]

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom a témavezetőmnek Dr. Jankovics Hajnalkának szakmai irányításáért, hasznos tanácsaiért, támogatásáért és, hogy türelmével és alapos szakmai hozzáértésével segítette a munkámat.

Őszinte hálával tartozom Tóth Évának és Kovács Noéminek mérhetetlenül nagy segítségükért és támogatásukért a kísérleti munkám során, és a molekuláris biológiai munkához elengedhetetlen jártasságok átadásában.

Illetve szeretném megköszönni Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium minden jelenlegi és volt dolgozójának akik segítségemre voltak ennek a dolgozatnak a megírásában.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom még családomnak és barátaimnak, a támogatásukért.