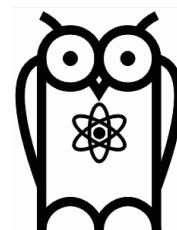




Miskolci Egyetem
Műszaki Anyagtudományi Kar
Tudományos Diákköri Konferencia



**Vastartalmú mágneses nanorészecskékkel izolált DNS
koncentrációjának meghatározása spektrálanalitikai
módszerekkel**

Determination of DNA concentration isolated with iron
containing magnetic nanoparticles using spectral analytical
methods

Szerzők: Alberti Orsolya

Szilágyi Gergely

Témavezető: Dr. Szőri-Dorogházi Emma
tudományos munkatárs

Kémiai Intézet

2022

Tartalom

1	Bevezetés	3
2	Irodalmi áttekintés	4
2.1	Dezoxiribonukleinsav (DNS) molekuláris biológiai jelentősége	4
2.1.1	Plazmid DNS tulajdonságai, jelentősége	4
2.2	Mágneses nanorészecskék alkalmazása plazmidok nagy mennyiségű és tisztaságú előállítására	6
2.3	Spektrofotometria	7
2.3.1	Spektrofotometrikus módszerek alkalmazása DNS koncentráció meghatározására 7	
2.4	Fluoreszcens spektroszkópia	8
2.4.1	A fluoreszcens spektroszkópia alkalmazása DNS koncentráció meghatározására 9	
3	Célkitűzések	10
4	Anyagok és módszerek	11
4.1	DNS tartalmú frakciók izolálásában alkalmazott mágneses nanorészecskék	11
4.2	A vizsgálatok során használt reagensek, oldószerek, oldatok	11
4.3	Felhasznált modellorganizmus	11
4.4	A mágneses nanorészecskével történő pDNS extrakció folyamata.....	12
4.5	A DNS tartalmú frakciók gélelektroforetikus vizsgálatának folyamata.....	13
4.6	Gélképek elkészítése.....	13
4.7	DNS tartalom spektrofotometrikus vizsgálata.....	14
4.8	DNS koncentráció fluorimetriás vizsgálata	15
4.8.1	Alkalmazott eszközök	15
4.8.2	A kidolgozott mérési protokoll	16
5	Eredmények	21
5.1	Spektrofotometrikus módszerrel való DNS koncentráció meghatározás	22
5.2	Fluoreszcens spektrálanalitikai módszerrel mért minták mérési eredményei	23

5.3	Spektrofotometrikus és fluoreszcens meghatározási módok eredményeinek összehasonlítása.....	25
6	Összefoglalás, konklúzió	28
7	Köszönetnyilvánítás	29
8	Mellékletek	0
9	Irodalomjegyzék	3

1 Bevezetés

Az elmúlt évek világjárványai (pl. koronavírus járvány 2003-ban, H5N1 influenza 2005-2006, MERS járvány 2012-ben, COVID-19 járvány 2020.) óta nagy mértékben megnövekedett az igény a nukleinsav (DNS, RNS) izolációs folyamatok fejlesztésére, melyek célja a gyorsabb és hatékonyabb diagnosztikai eljárások kidolgozása. A nanotechnológia tudományterülete ezen fejlesztésekhez többek között úgy járul hozzá, hogy olyan mágneses nanorészecskék (MNP) kialakításán dolgozik, melyek alkalmasak nukleinsav molekulák reverzibilis megkötésére. Ezáltal olyan DNS és RNS extrakciós folyamatok dolgozhatók ki, amelyek a hagyományos izolálási módszereknél gyorsabbak és mellőzik a mérgező oldószerek használatát, illetve a kereskedelmi forgalomban elérhető izoláló készleteknél költséghatékonyabbak. A különböző extrakciós folyamatok hatékonyságát a végeredményként kapott nukleinsav tartalmú oldat DNS, vagy RNS koncentrációjának mérésével lehet meghatározni. Az az extrakciós módszer lesz a legjobb, amellyel egységnyi kiindulási mintából a legtöbb nukleinsav lesz izolálható. Korábbi munkáink során a MNP-alapú bakteriális plazmid DNS izolálások hatékonyságának összehasonlítására elsősorban az agaróz gélelektroforézis módszerét alkalmaztuk, viszont ez a módszer inkább kvalitatív, iránymutató a DNS mennyiségére nézve, konkrét számbeli adatot nem ad. Ahhoz, hogy számszerűsített adatokat kapjunk és összehasonlítsuk a különböző összetételű MNP-kel történő izolálások hatékonyságát, más eljárásokat is alkalmaznunk kell. Ehhez, jelen tudományos munkánk során a spektrofotometria és fluorimetria eljárásait alkalmaztuk. Munkánk célja a vizsgálati módszerekhez tartozó protokollok kidolgozása, mintáinkhoz való adaptálása és a vizsgálati módszerek pontosságának összevetése volt. Feladatunk volt továbbá különböző összetételű és előállítási módú MNP-kel izolált frakciók DNS koncentrációjának minél pontosabb meghatározása.

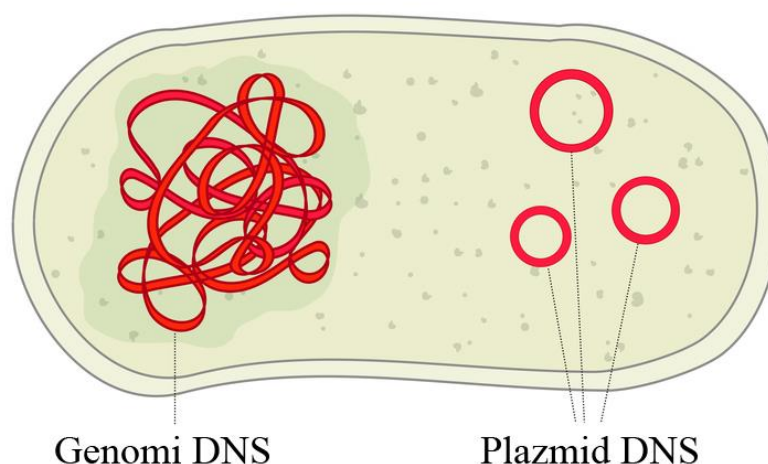
2 Irodalmi áttekintés

2.1 Dezoxiribonukleinsav (DNS) molekuláris biológiai jelentősége

Az emberi sejtekben lévő örökítőanyag a DNS. Ez tartalmazza a szervezetünk működéséhez szükséges fehérjék szabályozásához, előállításához nélkülözhetetlen információkat [1]. DNS-ünk azon szakaszait, melyben ezen létfontosságú információk vannak „raktározva”, géneknek nevezzük. Életünk során részben az öröklött hajlam, részben a környezeti hatások következtében génjeinkben változások, ún. mutációk alakulnak ki, melyeknek következtében egyes fehérjéink nem megfelelően vagy egyáltalán nem működnek, és ez genetikai rendellenességek, betegségek kialakulásához vezethet. A molekuláris biológia eszköztárát felhasználva képesek vagyunk mesterségesen is létrehozni géneket vagy gén szakaszokat, melyeket bejuttatva az emberi szervezetbe, az ún. génterápia részeként a gyógyításban fel lehet használni. Génterápiával kijavíthatjuk, vagy akár „kikapcsolhatjuk” a rendellenességet okozó, rosszul működő géneket.

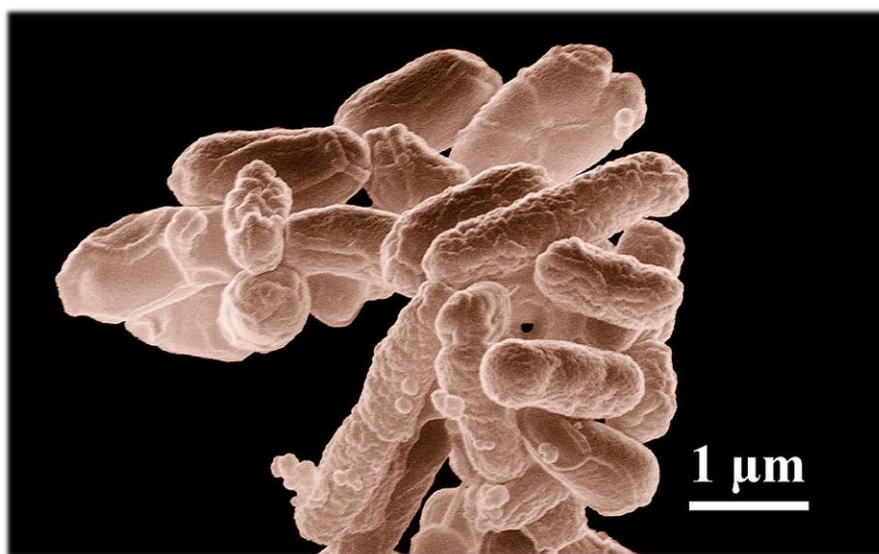
2.1.1 Plazmid DNS tulajdonságai, jelentősége

Plazmidoknak nevezzük a baktériumokban, egyes élesztőgombákban, algákban és növényfajokban található, az örökítő információ sejtek közötti átadását a kromoszómától függetlenül lehetővé tevő, gyűrű alakú, kettős szálú DNS molekulákat. A génterápia részeként a mesterségesen előállított gének, génrészletek emberi szervezetbe való bejuttatásának egyik módja, ha a géneket ilyen plazmidokba építjük be.



1. ábra Genomi DNS és plazmid DNS szerkezete és elhelyezkedése bakteriális modellorganizmuson belül

A plazmidokba lehetőség van más forrásból (vagy akár a mesterségesen előállított) gén darabokat beépíteni, majd a plazmidok, mint hordozó molekulák bejuttathatók például a különböző élőlények sejtjeibe. Napjaink egyik legnagyobb kihívását jelentő fertőző megbetegedés a SARS-CoV-2 vírus okozta Covid19 ellen kidolgozott vakcinák egy részénél is alapvetően ezt a technológiát alkalmazzák. Oltóanyagtól függően, a vírus tüskefehérjéjének „összeszerelésére” vonatkozó információt egy hordozó DNS vagy RNS molekulába építették be, és ezen nukleinsav molekulák, mint vektorok juttatják el az immunrendszer aktiválásához szükséges információt a sejtjeinkbe [2].



2. ábra *Escherichia coli* baktériumok [4]

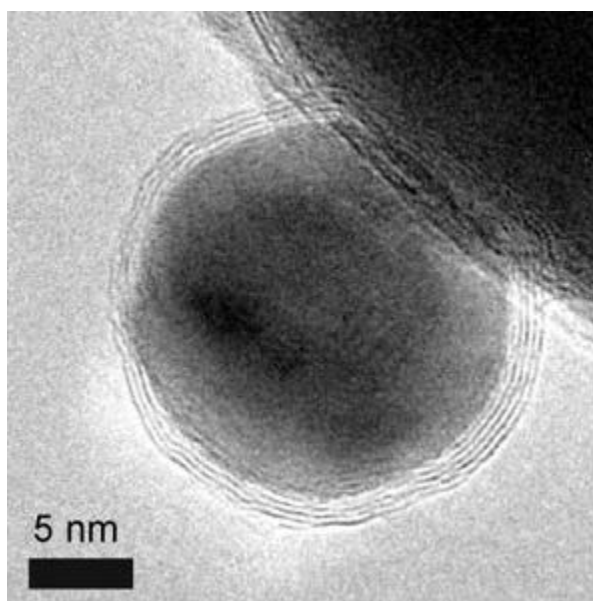
A plazmidok és az általuk hordozott információk nem csak a vakcina gyártásban hasznosíthatók. Például *Escherichia coli* (2. ábra) sejtekben speciális plazmidok segítségével humán inzulin hormon termeltetésére van lehetőség [3]. A baktériumokba bejuttatott plazmidokkal egyéb specifikus feladatokat is képesek vagyunk megoldani. Léteznek olyan, módosított baktériumok, melyek a sejtjükbe juttatott plazmidokat nagy mennyiségben felszaporozzák, és így a plazmidon hordozott génekről átíródó fehérjéket is nagy mennyiségben termelik, mely fehérjéket pl. nehézfémek (higany vagy arzén) eltávolításában és kimutatásában lehet felhasználni. Továbbá genetikailag módosított baktériumokkal véralvadási faktorok, vagy akár növekedési hormonok, különböző enzimek előállítása is lehetséges. [5; 6]

Ahhoz azonban, hogy a genetikailag módosított baktériumokból a gyógyászatban vagy a kutatásban felhasznált fehérjéket, hormonokat, enzimeket megfelelő mennyiségben tudjuk kinyerni, szükség van az ezeket a fehérjéket kódoló plazmidok nagy mennyiségű és nagy tisztaságú előállítására.

2.2 Mágneses nanorészecskék alkalmazása plazmidok nagy mennyiségű és tisztaságú előállítására

A mágneses nanorészecskék a nanorészecskék egy csoportja, amelyeket mágneses mező segítségével lehet manipulálni. Az ilyen részecskék általában két komponensből állnak, egy mágneses magból, gyakran vasból, nikkelből vagy kobaltból (**3. ábra**), egyes esetekben pedig a mágneses nanorészecskék felülete rendelkezhet továbbá egy funkcionizált burokkal is, mely segítségével specifikus tulajdonságok érhetőek el a részecskénél [7] (például huminsavval funkcionizált részecskék alkalmazása nehézfémek vízből való megkötéséhez [8]).

Az utóbbi időben a DNS mágneses nanorészecskékkal történő izolálása fokozott figyelmet kapott az egyszerű kivitelezhetőség és az alacsony költségek miatt. Bár a mágneses elválasztásukra vonatkozó módszereket alaposan tanulmányozták, jelenleg szükség van egy hatékony technikára a DNS izolálására a rendkívül érzékeny diagnosztikai alkalmazásokhoz. Erre jó alternatívát nyújtanak a kifejezetten plazmid DNS izolálásra kifejlesztett funkcionizált burokkal rendelkező mágneses nanorészecskék [9].



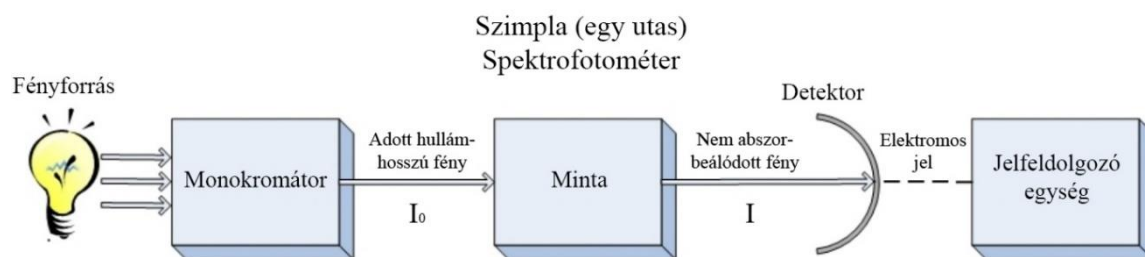
3. ábra Kobalt mágneses nanorészecske grafén funkcionizált burokkal [10]

Azonban ezen funkcionizált burokkal rendelkező mágneses részecskék egy gazdaságosabb változata a funkcionizált burok nélküli, új típusú mágneses nanorészecskék alkalmazása. Ilyen mágneses nanorészecskék fejlesztése folyik a Miskolci Egyetem Kémiai Intézetében is, illetve ezzel párhuzamosan történik a részecskék plazmid DNS izolálásban való alkalmazhatóságának tesztelése is [11].

2.3 Spektrofotometria

A több évtizedes múltra és gyakorlati alkalmazásra visszatekintő spektrofotometria a természettudományok minden területén az egyik legelterjedtebb analitikai mérési technika. A módszer széleskörű elterjedését a műszer viszonylag egyszerű felépítésének, a méréshez szükséges reagensek, vegyszerek könnyű hozzáférhetőségének és nem utolsósorban a spektrofotometriás metodika költséghatékonyságának köszönheti. A módszer további előnye a nagy pontosság, érzékenység, gyorsaság, kis anyagigény, továbbá a nagy mintaszám esetén megvalósítható automatizálhatóság [12].

A spektrofotometria széleskörű alkalmazhatóságának következtében számos kivitelű és felhasználású készülék kapható. Jelen munka során olyan műszert alkalmaztunk, amely szimpla, egy fényutas felépítésű (4. ábra).



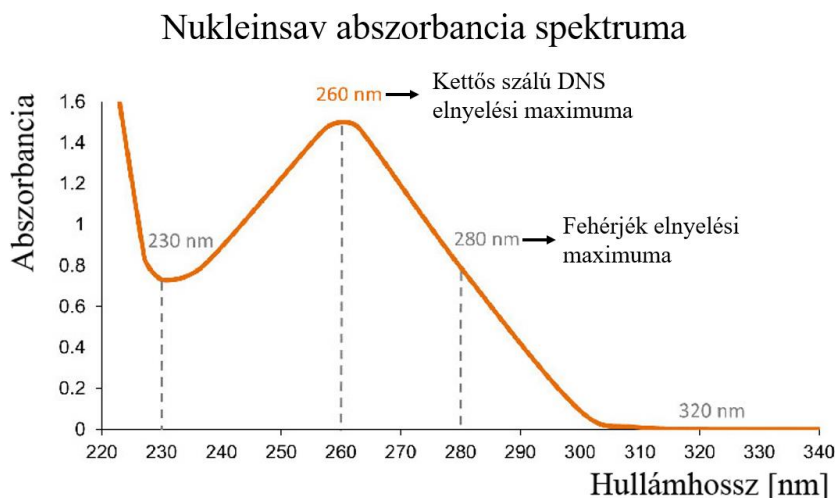
4. ábra Szimpla (egy utas) spektrofotométer működésének bloksémája [13]

A fényforrásból beérkező fény először egy monokromátoron halad át, mely a beérkező fényt elemeire bontja, így igény szerint választható ki a megfelelő monokromatikus fénynyaláb. Ez a fénynyaláb ezután áthalad a mintán, amely általában egy adott geometriájú kuvettában helyezkedik el. A fény egy része abszorbeálódik, míg egy része tovább halad a detektorba. A detektor az észlelt jelet elektromos jellé alakítja, amit továbbít a jelfeldolgozó egységbe, ami az abszorbancia értékét a Lambert-Beer törvény segítségével számítja ki. Az egyenletet az 1.sz.melléklet tartalmazza.

2.3.1 Spektrofotometrikus módszerek alkalmazása DNS koncentráció meghatározására

A spektrofotometria az egyik leggyakoribb módszer a DNS koncentráció meghatározására. A nukleinsavak abszorpciós maximuma 260 nm-es hullámhosszon található (5. ábra). Mivel a fehérjék fényelnyelési maximuma 280 nm-en van, a DNS oldat tisztasága pedig elsősorban a végső szuszpenzióban maradó fehérjementességtől függ, ezért a 260 nm-en történő mérés mellett szükséges 280 nm-es hullámhosszon is mérni a mintákat. A frakció esetleges fehérjével

való szennyezettségére a 260/280 nm-es arány utal [15]. A tisztának tekinthető DNS oldat $A_{260/280}$ hányadosa 1,8 - 2,0 értékek közé esik [11].

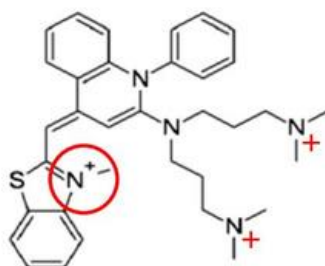


5. ábra Nukleinsavak abszorbanca spektruma [14]

2.4 Fluoreszcens spektroszkópia

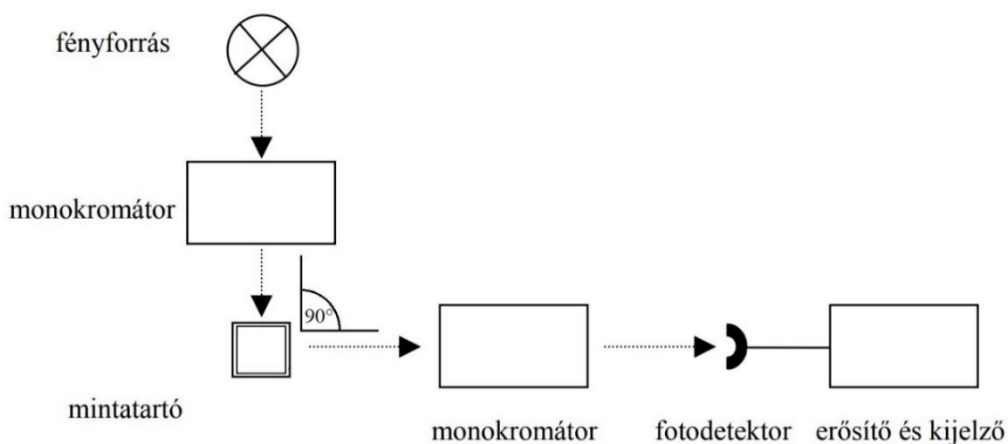
A fluoreszcencia spektroszkópia a fotolumineszcencia egyik leginkább elterjedt válfaja. Fotolumineszcencia alatt azt a jelenséget értjük, amikor az anyag ultraibolya, vagy látható fénysugárzás hatására gerjesztődik, majd az elnyelt energiát fény formájában, általában nagyobb hullámhosszúságú (kisebb energiájú) fényként sugározza ki. Az egyes fluorofor anyagok más és más hullámhosszú fénnel besugározva képesek fluoreszkálásra, és az emittált fénysugárzás spektruma is különböző anyagról anyagra. Ebből adódóan a fluoreszcencia spektroszkópia igen szelektív analitikai módszernek tekinthető. Többnyire azok a molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát, amelyek aromás gyűrűket, vagy többszörösen konjugált kettős kötést tartalmaznak, illetve merev, sík szerkezetűek (pl. 6. ábra által bemutatott PicoGreen elnevezésű festék molekula) [16].

PicoGreen (PG)



6. ábra PicoGreen fluoreszcens festék szerkezeti képlete [17]

A fluoriméter felépítése jelentősen különbözik a szimpla (egy utas) spektrofotométer felépítésétől. A fluoriméterek esetében két monokromátort alkalmazunk, mivel a vizsgálatoknál nem csak a besugárzó fény hullámhosszát kell irányítani, hanem a kibocsátott fényből is szelektíven ki kell szűrni a kívánt anyagra jellemző hullámhosszúságot. A másik jelentős különbség, hogy a megvilágítást és a detektálást végző egységek nem egy vonalban vannak elhelyezve, hanem általában egymással derékszöget zárnak be. Így biztosítva azt, hogy a besugárzó fény ne zavarja a kibocsátott fénysugárzást.



7. ábra fluoreszcencia spektrofotométer sematikus felépítése [16]

2.4.1 A fluoreszcens spektroszkópia alkalmazása DNS koncentráció meghatározására

Az abszorbancia-mérésen alapuló koncentráció meghatározási módszerek egyszerűek és pontosak mindaddig, amíg a szennyeződések és a pufferkomponensek abszorbens hozzájárulását figyelembe vesszük. A fluoreszcencia vizsgálatok sokkal kevésbé hajlamosak az interferenciára, mint a 260 nm-en történő abszorbancia mérések. A fluorofor gerjesztés és az azt követő emisszió nagyobb érzékenységet eredményez, és sok fluorofor specifikusságát az adja, hogy szelektíven kötődnek a mérés szempontjából lényeges komponenshez (pl. a kettős szálú DNS-hez). A kettősszalú DNS (dsDNS) koncentráció meghatározásra használt festékeket három csoportba oszthatjuk: interkaláló festékek (pl. etídium-bromid), fluoroforok, amelyek a dsDNS kisebb barázdájához kötődnek (pl. Hoechst festék) és más speciális fluoreszcens festékek, például cianin festékek (pl. PicoGreen (**6. ábra**)). Ugyan a fluoreszcens vizsgálatok több lépést igényelnek, mint az abszorbancia alapú vizsgálatok még így sem tekinthetők bonyolultnak és extrém módon időigényesnek.

3 Célkitűzések

A MNP-kel kapott izolációs frakciók koncentrációját eddigi vizsgálataink során legtöbbször csak kvalitatívan, agaróz gélelektroforetikus vizsgálattal határoztuk meg. Munkánk célja volt olyan koncentráció meghatározási módok adaptálása, melyekkel a mágneses nanorészecskékkel izolált nukleinsav tartalmú frakciók koncentrációja a lehető legpontosabban meghatározható, ezzel hosszútávon elősegítve a MNP-kék összehasonlításának egyszerűsítését. A kidolgozott módszerek és a kapott adatok függvényében a jövőben ezen új koncentráció meghatározási módokat rendszeresen alkalmazni lehet majd a MNP-kék vizsgálata során. Emellett célunk volt két rendelkezésünkre bocsájtott mágneses nanorészecske plazmid DNS kötődés szempontjából történő analízise. Ezen analízis során célunk az új koncentráció meghatározási módszereket, protokollokat is tesztelni.

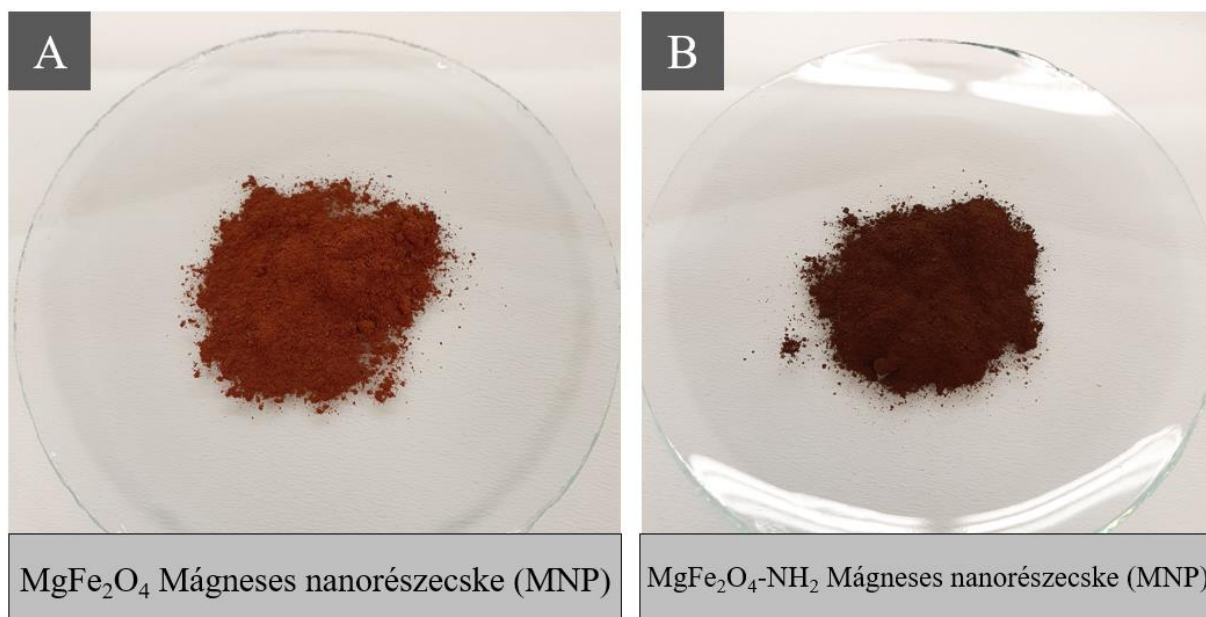
E célok eléréséhez a következő gyakorlati lépések elvégzésére volt szükség:

- Plazmid DNS izolálás a rendelkezésünkre bocsájtott mágneses nanorészecskék használatával.
- A különböző DNS koncentráció meghatározáshoz használatos módszerek elméleti háttérének megismerése.
- A spektrofotometriás mérésekhez használt NanoDrop™ típusú készülék működésének megismerése, mérési folyamat elsajátítása.
- A fluoreszcens spektroszkópiához használni kívánt festékmolekula kiválasztása.
- A fluoreszcens spektroszkópiás koncentrációmeghatározási módszer pontos alkalmazhatóságához szükséges kalibrációs tartomány kiválasztása.
- Mintáink mérési módszerének kidolgozása, inkubációs idők kísérletes meghatározása.
- A fotometrikus módszerrel mért minták fluorimetrikus módszerrel való újramérése, majd a kapott eredmények összehasonlítása.
- Különböző típusú mágneses nanorészecskékkel izolált frakciók koncentrációjának összehasonlítása

4 Anyagok és módszerek

4.1 DNS tartalmú frakciók izolálásában alkalmazott mágneses nanorészecskék

Dolgozatunk elkészítése során két mágneses nanorészecskével izolált DNS frakció koncentrációját mértük. Az egyik ilyen mágneses nanorészecske a MgFe_2O_4 -volt (8. ábra A), míg a másik a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (8. ábra B) volt.



8. ábra A) MgFe_2O_4 mágneses nanorészecske B) $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ mágneses nanorészecske

4.2 A vizsgálatok során használt reagensek, oldószerek, oldatok

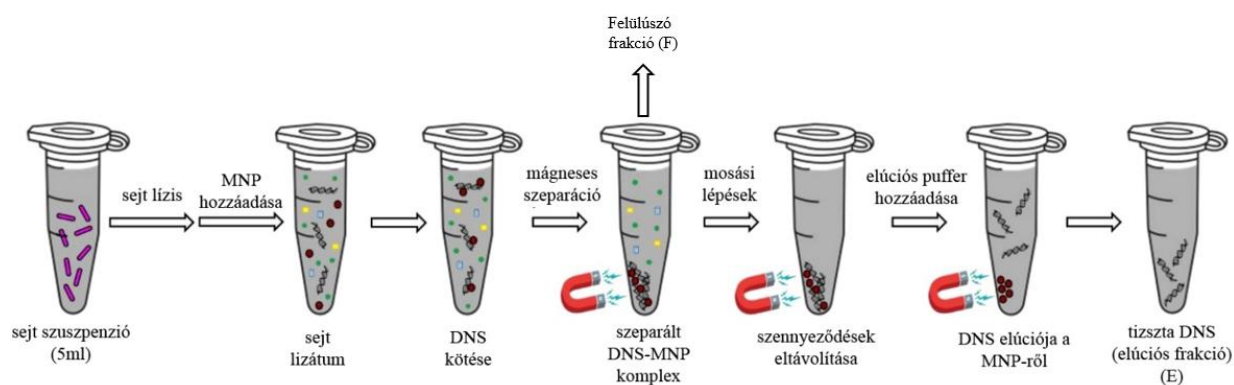
Kísérleteinkhez használt anyagokat, reagenseket, és az alkalmazott oldatok összetételét a 2.sz. *melléklet* tartalmazza.

4.3 Felhasznált modellorganizmus

A nukleinsav izolálási vizsgálatokhoz *Escherichia coli* (*E. coli*) Gram negatív, nem patogén baktériumot használtunk modellorganizmusként (2. ábra). Laboratóriumunkban többféle plazmid DNS-t tartalmazó *E. coli* is rendelkezésre áll. Az *E. coli* pBAD törzsben a pBAD24 típusú plazmid van jelen. Az izolációs folyamatok célja ezen pDNS molekulák lehető leghatékonyabb kinyerése.

4.4 A mágneses nanorészecskével történő pDNS extrakció folyamata

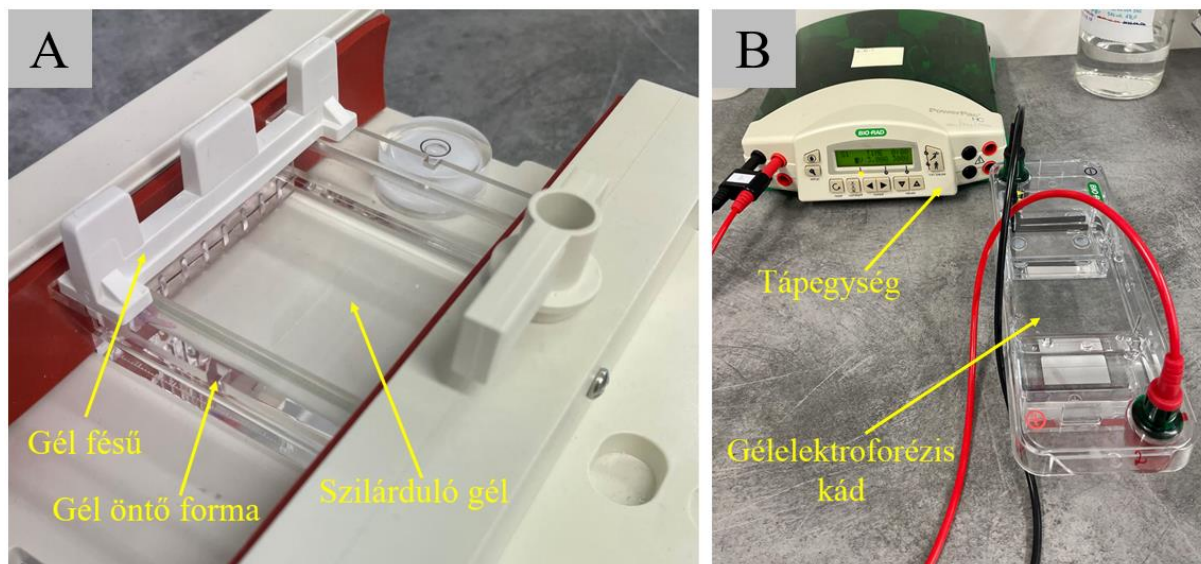
A vizsgálat alapját a P. Oberacker és munkatársai által közölt eljárás [19] jelentette, melynek egyes lépéseit módosítottuk. Az izolálás lépéseit így a T. Gerzsenyi és munkatársai által közlés alatt lévő cikk [11] alapján végeztük el. A folyamat főbb műveletei a következők voltak: a kiindulási sejtszuszpenziót centrifugáltuk, majd a felesleges tápfolyadék eltávolítása után a visszamaradt sejttömeget feltáró oldatokkal kezeltük (P1-P3). A kapott sejtlizátumot centrifugáltuk és a tesztelni kívánt MNP-k diszperzióját is előkészítettük. Az MNP diszperzót tartalmazó Eppendorf csövet mágneses tartóba helyeztük, majd a fázissztétválás után a felülúszót eltávolítottuk és a visszamaradt szilárd fázist az ún. „MNP-kötő puffer (2)”-vel újra szuszpendáltuk. Ehhez adtuk hozzá a sejtlizátum centrifugálása után kapott tiszta felülúszót. A DNS-MNP komplex kialakulásához az Eppendorf csövet rázógépbe helyeztük. Az Eppendorf csövet ezután mágneses tartóba tettük és mosó pufferrel többszöri mosási lépést végeztünk. A mosást követően elúciós pufferrel választottuk le a DNS molekulákat az MNP-kről. A folyamat lépéseit a **9. ábra** *Az MNP-kkel történő plazmid DNS izoláció folyamatábrája [11]* mutatja be.



9. ábra *Az MNP-kkel történő plazmid DNS izoláció folyamatábrája [11]*

4.5 A DNS tartalmú frakciók gélelektroforetikus vizsgálatának folyamata

Az agaróz gél készítéséhez 1 g agarózhoz 100 ml TAE puffert adtunk, majd mikrohullámú sütőben az agaróz teljes oldódásáig melegítettük az elegyet. A folyékony gél a gélöntő formába öntöttük és behelyeztük a zseb kialakításához szükséges műanyag gélfésűt (10. ábra A).



10. ábra A) Gélöntő formában lévő szilárduló gél. B) Tápegység és a gélelektroforézishez használt futtató kád (*ábrán gélfésű és gélöntő egybe írandó)

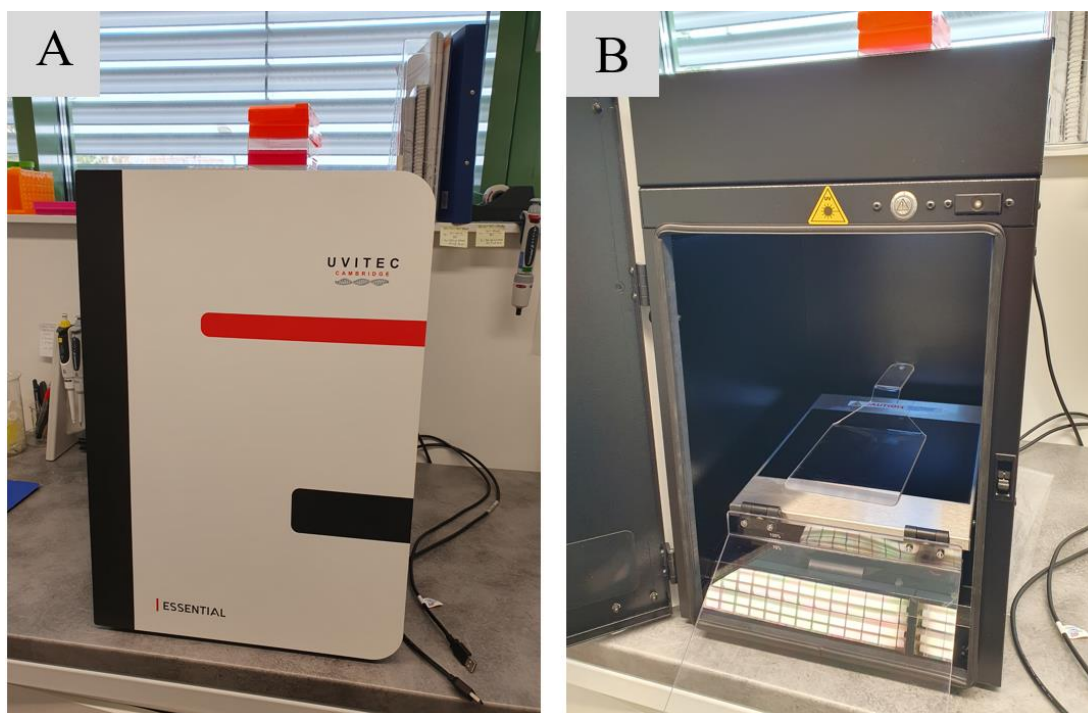
A gél szilárdulása után a fésű eltávolításával annak helyén kis mélyedések, zsebek maradnak a gélben. Az agaróz gél után a futtató pufferrel (1 x TAE puffer) feltöltött gélelektroforézis kádba kell helyezni (10. ábra B). Ezután történik a minták zsebekbe való felvitele pipettával. Az elektroforézis 90 V-on 45 percig zajlott.

A gélfuttatás végeztével a kész gél egy műanyag edénybe kell helyezni, melyben 1 x TAE pufferben hígított, 3x **GelRed™** fluoreszcens festék található. 30 perces festékben való ráztatás alatt a gélelektroforézissel elválasztott DNS molekulák láthatóvá válnak, hiszen a **GelRed™** egy olyan fluoreszcens festék, mely interkalálódik, beékelődik a DNS molekula kettős láncába, majd UV tartományú fénybesugárzás hatására a DNS-hez kötött festék fluoreszcens fényt bocsájt ki. A kibocsájtott fény intenzitása arányos a gélben lévő DNS mennyiségével, azaz minél több DNS van a mintában, ahhoz annál több festékmolekula tud kötődni, és ez annál intenzívebben világító sávot produkál.

4.6 Gélképek elkészítése

A fent említett módon megfestett géleket a megfelelő módon dokumentálni is kell. Ehhez egy a gélfotók elkészítéséhez kifejlesztett Uvitec Essential V6 típusú készüléket használtunk. A

készülék saját fotókamrával rendelkezik, egy beépített számítógép által vezérelhető kamerával és UV fényforrással. A fényképek elkészítése teljesen zárt térben történik, számítógép vezérléssel így nem éri a kezelőt erős UV-sugárzás (11. ábra A-B).



11. ábra A) Uvitec Essential V6 készülék B) A készülék fotókamrája

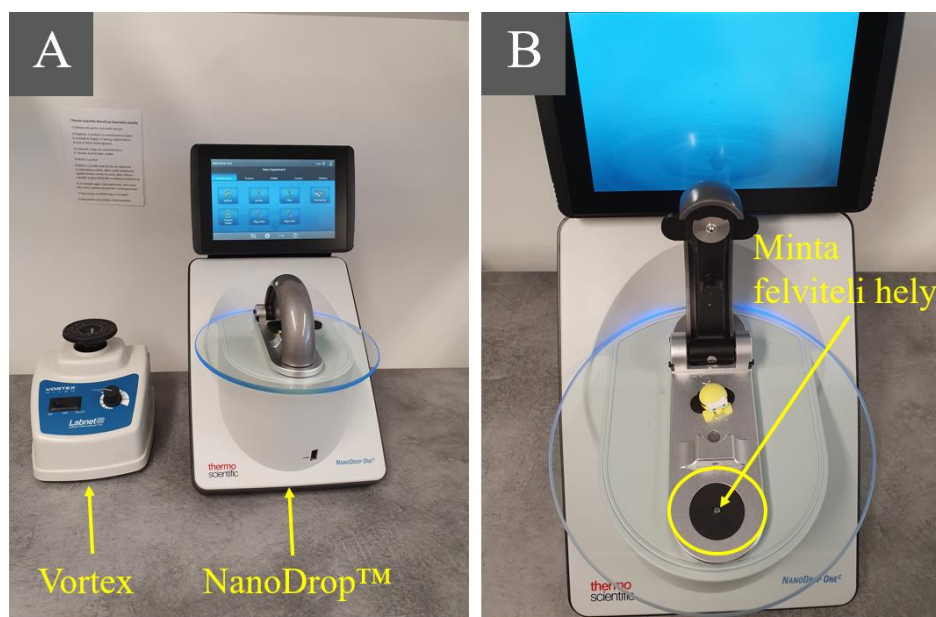
4.7 DNS tartalom spektrofotometrikus vizsgálata

A gélelektroforetikus vizsgálatok után a minták koncentrációját UV-Vis spektrofotometrikus vizsgálattal mértük. Erre a célra egy mikrotérfogatú, nukleinsav koncentráció meghatározásra alkalmas NanoDrop™ készüléket használtunk. A készülék működési elve megegyezik a 2.3 fejezetben leírt hagyományos, egy utas spektrofotométerek működési elvével. A készülék számunkra legelőnyösebb tulajdonsága viszont az, hogy rendkívül kis (mikroliteres) mennyiségű minta elegendő a mérésekhez.

A készüléken kiválasztottuk a számunkra megfelelő mérési algoritmust, ami jelen esetben a kettősszálú DNS mérési protokollja. A minták mérése előtt nullázni (blank) kell az eszközt, ezzel megadva azt a referenciát a készülék számára, hogy mely értékhez társítsa a 0 koncentráció értéket. Ezt a mi esetünkben steril ultratiszta vízzel tettük meg. A mintáinkat mérés előtt vortexeltük (12. ábra A), hogy minél egységesebb szuszpenzióból tudjunk mintát venni, majd 2 μ l-t pipettáztunk a készülék mérési pontjára (12. ábra B). A kar lehajtása után a mérés gombra nyomva a készülék elvégzi az abszorbanci mérést. A készülékben előre beállított

mérési protokoll szerint a minta abszorbanciája 260, 280 és 230 nm-en is meghatározásra kerül (230 nm-en egyes szerves oldószerek: pl. fenol, kaotróp sók (guanidin-tiocianát, guanidin hidroklorid), EDTA, Triton™ X-100, Tween® 20, poliszacharid, szuszpenzióban esetlegesen előforduló egyéb szilárd részecskéknek van fényelnyelésük). Ezen abszorbancia értékekből nemcsak a DNS koncentráció automatikus kiszámítása történik, de a minta tisztaságára vonatkozó abszorbancia hányadosok ($A_{260/280}$, $A_{260/230}$) kiszámítása is.

A NanoDrop™ készülék a Beer-Lambert-törvény alapján és előre meghatározott extinciók együtthatók segítségével végzi el az abszorbancia-koncentráció konverziót. Így egy dsDNS minta esetén, ha $A_{260} = 1$, a mintában a DNS koncentrációja 50 ng/μl-nek tekinthető [20]. Ezen a konvencionális összefüggés alapján standard görbe felvétele nélkül is meghatározható a minta dsDNS tartalma. Igény szerint μg/ml-ben vagy ng/ml-ben kaphatjuk meg az eredményt, illetve a készülék megjeleníti a mért mintánk tisztaságára jellemző $A_{260/280}$ hányadost is.



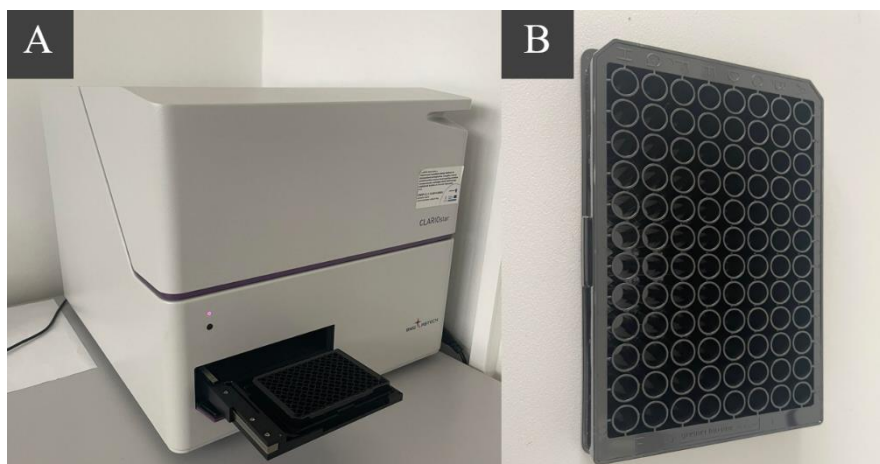
12. ábra A) Vortex és NanoDrop készülékek B) NanoDrop készülék mintafelviteli helye

4.8 DNS koncentráció fluorimetriás vizsgálata

4.8.1 Alkalmazott eszközök

A méréshez használt műszer egy BMG Labtech Clario Star Plus™ (13. ábra B) mikrolemez olvasó, mely multifunkcionális (több spektroszkópiai vizsgálat elvégzésére is) alkalmas. A fluoreszcens mérések során használt mikrolemezek fekete polisztirolból készülnek (13. ábra B). A mintahelyek geometriai méretei szabványosítottak. A készülék rendelkezik a legtöbb szabványos lemez geometriájával és tulajdonságaival így ezt nem szükséges manuálisan

betáplálni. Nem szabványos lemez használata esetén a geometria megadható a készülék számára manuálisan is. A készülék a 2.4 fejezetben leírt elven végzi el a méréseket.



13. ábra A) BMG Labtech Clario Star Plus™ B) Fluoreszcens mérések során használt mikrolemezek

4.8.2 A kidolgozott mérési protokoll

A méréseinkhez a PicoGreen™ fluoreszcens festéket tartalmazó, DNS koncentráció meghatározásra alkalmas „gyári” készletet és a hozzá tartozó protokollt használtuk. A készlet tartalmazza az összes szükséges reagenst. Szükséges volt azonban a gyártó által megadott protokoll laboratóriumi körülményeinkre való adaptálására. Ezért a következő változtatásokat eszközöltük:

- Mérési hőmérséklet megszabása.
- Megfelelő mérési koncentráció-tartomány kiválasztása, hígítás lépéseinek standardizálása.
- Kalibrációs pontok számának meghatározása (növelése) és értékeinek igazítása a saját mintáinkhoz.
- Inkubációs idők bevezetése, időtartamuk optimalizálása.
- Minták mérési módszerének megválasztása (mérés előtti rázatás alkalmazása, egy mintahely többszöri mérése, egy mintához tartozó mintahely számának növelése).

Ezen változtatások szükségességét minden esetben kísérletesen is ellenőriztük, és a kapott eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ezen lépések alkalmazásával pontosabb és reprodukálhatóbb mérések valósíthatók meg.

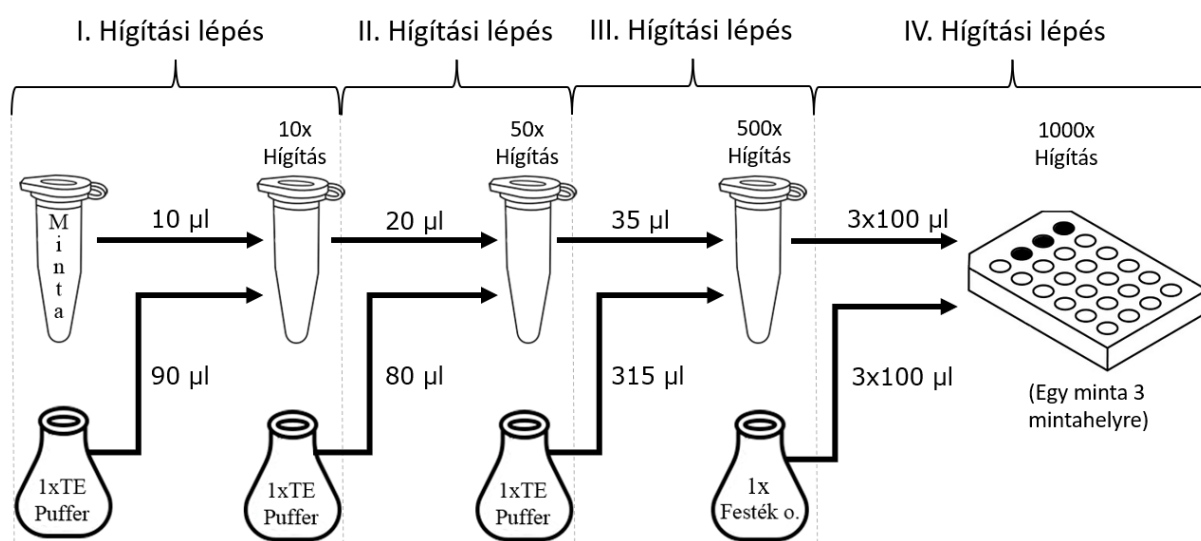
Első lépésben a gyártó által előírt pufferoldatokat hígítani kell a megfelelő mértékben. Fontos, hogy a festék oldatot csak az utolsó lépésben hígítsuk ki, ugyanis a festékmolekulák fény hatására degradálódhatnak. A TE puffer megfelelő hígítása után (20x) el kell készíteni a kalibrációhoz használatos sztenderd DNS szuszpenzió megfelelő mennyiségű törzsoldatát. A készletben erre egy hitelesített koncentrációjú (100 µg/ml) λDNS oldat áll rendelkezésre. Ezt hígítanunk kell 500 ng/ml-es koncentrációra. Mivel ez a hígítás viszonylag nagy mértékű és kis térfogatra kellene elvégezni, ezért egyszerre nagyobb mennyiségű törzsoldatot készítettünk, mint amennyi egy méréshez szükséges lenne. Ennek oka az, hogy a kis mennyiségek kimérése (<10 µl) automata pipettával jelentős mértékben megnöveli a szórást és rontja a kalibrációs egyenes linearitását. A fel nem használt törzsoldat -20 °C-on tárolható.

Az oldatok elkészítése után a minták hígítása következik. Tapasztalati alapon a mágneses részecskékkal izolált frakciók DNS tartalma egy 0-150 µg/ml-es tartományba esik. Ez a tartomány a festékmolekulával pontosan detektálható tartományon kívül esik (mintáink hígítására van szükség). A protokoll lépéseinek finomhangolása közben több koncentráció tartományt is ellenőriztünk, és a kapott eredmények alapján azt láttuk, hogy a legnagyobb linearitású kalibrációs egyenes a 0-500 ng/ml-es mérési tartományban volt. Ezért a kalibrációs tartományt 0-150 ng/ml-es tartományra választottunk meg. Ez a mintákra nézve azt jelenti, hogy az izolációs kísérletek (**9. ábra**) során kapott elúciós frakciókat (E) ezerszeresére kell hígítani. Mivel ez a hígítás az előzőekben leírtakhoz hasonlóan rendkívül nagy mértékű és kis térfogatban kellene elvégezni, ezért elkerülhetetlen a többlépcsős hígítási lépések alkalmazása. A hígítási lépcsőket úgy határoztuk meg, hogy egyik lépés esetében se kelljen 10 µl-nél kisebb mennyiséget kimérnünk. A hígítási lépések elvégzésének folyamatát a **14. ábra** szemlélteti. A hígítások elvégzése után, a kalibrációs egyenes felvételéhez, a kalibrációs pontokhoz tartozó elegyek bemérése következik a mikrotiter lemez mintahelyeire. A kalibrációs egyeneshez tartozó pontok megfelelő hígításához az 1. táblázat szerint kell a mintahelyekre bemérni a komponenseket. Minden kalibrációs pontot háromszoros mennyiségben készítettünk és egyenlően elosztva három mintahelyre mértük be. A mérés kiértékelésekor az azonos koncentrációhoz tartozó mintahelyek értékeit átlagoltuk.

1. táblázat A kalibrációs pontokhoz szükséges oldatok mennyisége

1x TE Puffer mennyisége [μl]	500ng/ml DNS törzsoldat mennyisége [μl]	Pico Green festék oldat mennyisége [μl]	DNS koncentráció 200μl mintatérfogóban [ng/ml]
100,0	0,0	100,0	0,0
88,0	12,0	100,0	30,0
76,0	24,0	100,0	60,0
64,0	36,0	100,0	90,0
52,0	48,0	100,0	120,0
40,0	60,0	100,0	150,0

Mint ahogy az a **14. ábra** IV. részén is látható, a mintákat is 3x mennyiségben kell elkészíteni, majd azt egyenlően szétosztani három mintahelyre. Erre a lépésre is azért van szükség mert így csökken a mért értékek szórása.



14. ábra Minták hígítási lépcsőinek folyamatábrája

A standard kalibrációs pontok bemérése és a minták **14. ábra** szerinti bemérése után következik a festékkoldat hígítása. A festékkoldatot a gyártó 200x-os töménységben bocsájtja rendelkezésre melyet 200x-ára kell hígítani (hogy végül 1x-es töménységű festékkoldatot kapjunk). A lépés során itt is kiemelt fontosságú, hogy ne történjen olyan hígítási lépés, amikor 10 μl-nél kisebb mennyiséget mérünk pipettával, emellett fontos az is, hogy a festékkoldat hígítása és lemezbe történő bemérése közben ne érje az oldatot erős fényhatás. A hígítás után törekedni kell arra,

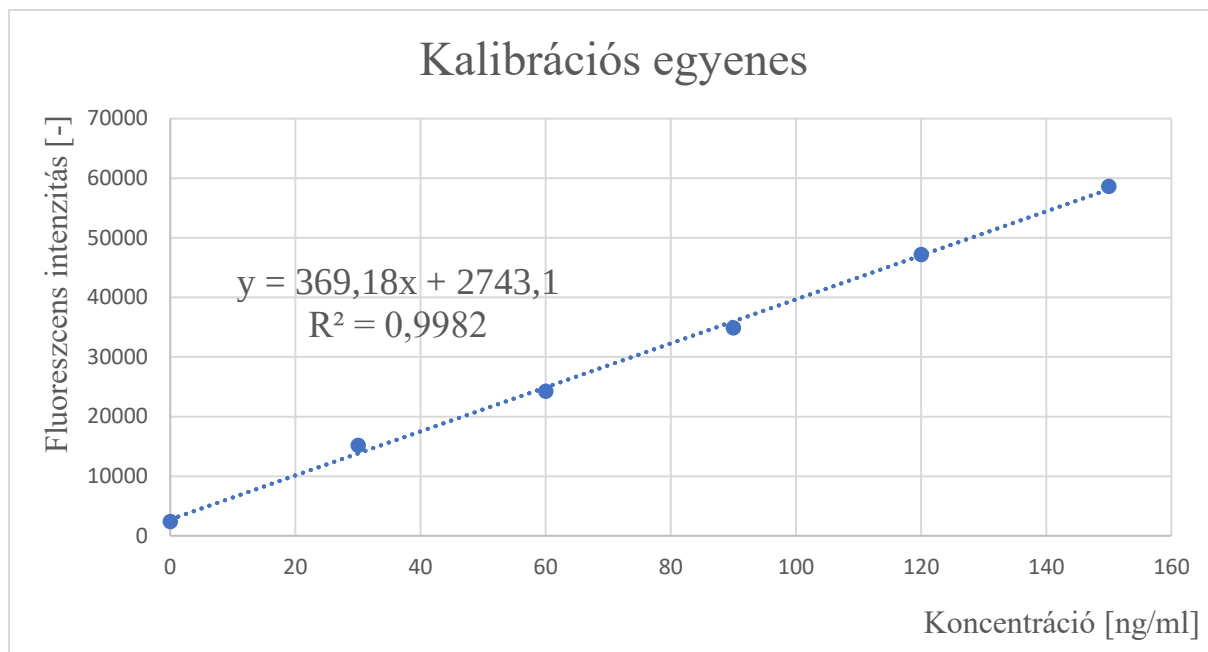
hogy a festékoldatot a lehető legkisebb időintervallumon belül adjuk a mintákhoz. Erre a célra többcsatornás pipettát alkalmazunk (15. ábra).



15. ábra Többcsatornás pipetta

A festékoldat mintákhoz való hozzáadásakor a reakcióelegyet szuszpendáljuk pipettázással. Ha minden mintahelyhez hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű festékoldatot, akkor a lemezt behelyezzük a készülék 25°C-ra temperált mintaterébe és 20 percig sötétben inkubáljuk (ezzel az inkubációs idővel segítjük elő azt, hogy minden festékmolekula kötődni tudjon a DNS láncokhoz).

Az inkubációs idő alatt beállítjuk a mérési paramétereket. A készülék programja előre meghatározott protokollal rendelkezik a PicoGreen™ fluoreszcens festékekkel történő mérés paramétereit tekintve, így nem kell sem a besugárzási (480 nm), sem a detektálási (520 nm) hullámhosszokat beállítanunk. Meg kell azonban adnunk, hogy egy lemezen mely mintahelyeken történjen meg a mérés, illetve meg kell adnunk a besugárzási fény intenzitását. A besugárzás intenzitása minden mérésünkön azonos, így az értékek jobban összehasonlíthatóak lettek. A mérés előtt még meg kell határozni azt a mintahelyet a lemezen, ahol a legintenzívebb jelet várjuk (ez a legnagyobb koncentrációjú kalibrációs pont). A mintahely megadása történhet manuálisan, illetve úgy is, hogy a készülék végig ellenőrzi (pásztázza) az összes mintahelyet és kiválasztja automatikusan a legintenzívebb jelhez tartozó helyet (ha ezt valamelyik minta esetében jelzi, úgy az az érték a kalibrációs egyenes tartományán kívül fog esni). A mérést követően az egyes kalibrációs pontokhoz tartozó értékeket átlagoljuk és ábrázoljuk a kalibrációs egyenest (16. ábra).



16. ábra Fluoreszcens spektroszkópiával mért kalibrációs egyenes

A mintáknál mért fluoreszcens intenzitást behelyettesítve az egyenletbe és azt megoldva x-re (koncentráció), megkapjuk a minta koncentrációját ng/ml mértékegységben.

$$\text{Fluor. Intenzitás} = \text{Meredekség} * \text{Koncentráció} + \text{Blank fluor. intenzitása}$$

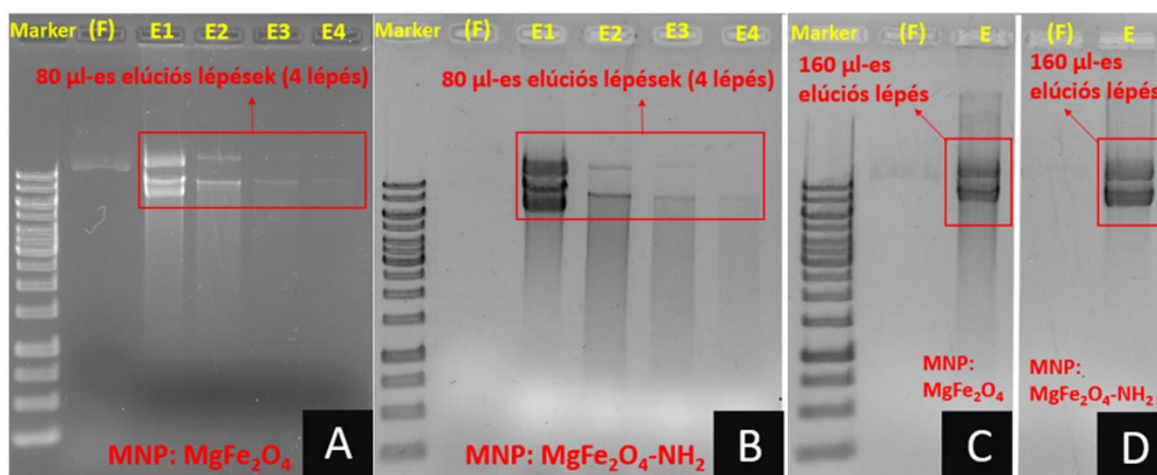
1. egyenlet

Az egyenlet megoldásaként kapott eredményt µg/ml-be kell átszámolni , hogy az így kapott DNS koncentráció értékeket a spektrofotometrikus eredményekkel könnyebben össze tudjuk majd hasonlítani..

5 Eredmények

A vizsgálatra kapott MgFe_2O_4 és $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ mágneses nanorészecskékkel először plazmid DNS izolálási reakciót végeztünk a 4.4 fejezetben leírtak alapján. A részecskékkel két féle módon végeztük el a kísérletet. Az egyik esetben az elúciót egy lépésben tettük meg. Az elúciós frakció térfogata ebben az esetben 160 μl -volt (**1x160 μl**) (17. ábra C-D). A másik esetben az elúciós puffert négy egymást követő lépésben 80 μl -enként adtuk a DNS-MNP komplexhez. Ez azt jelenti, hogy négy darab elúciós frakció (E1-E4) keletkezett a kísérlet során, melyek térfogata egyenként 80 μl volt (**4x80 μl**) (17. ábra A-B). Korábbi kísérleteink során meggyőződünk már róla, az elúciós lépések többszöri ismétlésével növelni tudjuk az izolálási folyamat során MNP-khez kötődött plazmid DNS molekulák visszanyerési hatékonyságát. Esetünkben a különböző elúciós térfogatok alkalmazásával azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a korábbiakban alkalmazott **4x80 μl** -rel végzett elúció DNS kihozatalát kevesebb, de nagyobb elúciós térfogatok alkalmazásával is elérhetjük-e. Számunkra ez azért lényeges, mivel az elúciós lépések számának csökkentésével az izolálási protokoll egyszerűsödik, és gyorsabbá válik. Viszont mindez nem mehet a MNP-ről eluálható összes plazmid DNS mennyiség csökkenésének rovására.

Az izolálások során kapott DNS frakciókat (9. ábra. E: elúciós frakciók) először gélelektroforézissel vizsgáltam a 4.5 fejezetben leírtak szerint, melynek eredményei az alábbi gélképeken láthatók (17. ábra).



17. ábra A) MgFe_2O_4 MNP-vel izolált 4 lépcsős (4x80 μl) izolációs frakcióinak gélképe B) $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel izolált 4x80 μl -es elúciós frakcióinak gélképe C) MgFe_2O_4 MNP-vel izolált 1 lépcsős (1x160 μl) izolációs frakció gélképe D) $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel izolált 1 lépcsős (1x160 μl) izolációs frakció gélképe

5.1 Spektrofotometrikus módszerrel való DNS koncentráció meghatározás

A gélelektroforézissel vizsgált elúciós frakciók DNS tartalmának megállapításához DNS koncentráció mérést végeztünk a 4.7 fejezetben és leírt mérési módszer alapján. Méréseinkhez kontrollként (háttérként) olyan az elúciós mintákat használtam fel, melyek a DNS mentes (csupán ultratiszta vízzel végrehajtott) izolálási tesztekéből származtak. Ezen DNS mentes mintákkal kapott abszorbancia értékekkel korrigálva határoztam meg a magnézium-ferrit és amino-funkcionalizált magnézium-ferrit MNP-kel végzett DNS izolálási folyamatok hatékonyságát (azaz az elúciós frakciók DNS koncentrációját). Az eredményeket az alábbi, 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat Spektrofotometrikus meghatározási módszerrel mért frakciók mérési eredményei

Elúciós lépés száma	Elúciós frakciók abszorbanciája	DNS mentes minta abszorbanciája	Háttérrel korrigált abszorbancia értékekből számolt DNS koncentráció (µg/ml)	A _{260/280}
MgFe ₂ O ₄ 4x80µl-es elúciós lépés eredményei				
1. Elúció (80µl)	4,85	0,05	239,9	1,87
2. Elúció (80µl)	2,50	0,05	122,4	1,86
3. Elúció (80µl)	1,38	0,01	68,4	1,91
4. Elúció (80µl)	0,93	0,03	45,0	1,90
MgFe ₂ O ₄ 1x160µl-es elúciós lépés eredményei				
1. Elúció (160µl)	4,76	0,03	236,6	1,86
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂ 4x80µl-es elúciós lépés eredményei				
1. Elúció (80µl)	10,72	0,41	515,1	1,97
2. Elúció (80µl)	5,24	0,18	253,4	1,95
3. Elúció (80µl)	5,17	0,16	250,6	1,99
4. Elúció (80µl)	3,55	0,14	170,9	2,01
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂ 1x160µl-es elúciós lépés eredményei				
1. Elúció (160µl)	4,77	0,25	226,0	1,84

A gélelektroforézis és koncentráció mérések eredményeiből is jól látszik, hogy amikor 4x egymás után **80-80 µl**-rel végeztük az eluálást, az első két elúciós frakció DNS koncentrációja jócskán meghaladta a második két elúciós lépésnél mért DNS tartalmat (17. ábra A-B E1-E2, illetve

E3-E4 frakciók). Az elvégzett koncentráció mérések arra is rávilágítottak, hogy az elúciós lépések többszöri (**4x80 µl**) ismétlésével, ha csupán az E1 és az E2-es frakciók DNS tartalmát vesszük is figyelembe (**17. ábra A-B**, E1-E2), nagyobb mennyiségű plazmid DNS volt izolálható adott sejtmennyiségből, mint mikor **1x160 µl** elúciós térfogatot alkalmaztunk (**17. ábra C-D**, E). Számszerűsítve az elúciós frakciók DNS koncentrációját, a MgFe_2O_4 MNP esetén 4x80µl alkalmazásával E1+E2: 362,3 µg/ml volt, míg. 1x160 µl-es elúciónál E frakció DNS koncentrációja 236,6 µg/ml volt. $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-k esetén a 4x80µl-es elúcióknál E1+E2: 768,5 µg/ml, míg $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ 1x160µl-nél az E frakció DNS tartalma 226 µg/ml volt. Ezen eredmények alapján mind a MgFe_2O_4 , mind a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-kenél az MNP-DNS komplexekről a maximális mennyiségű DNS leválasztásához a (minimum) két lépésben 80 µl-rel történő elúciót javasoljuk.

5.2 Fluoreszcens spektrálanalitikai módszerrel mért minták mérési eredményei

A következő vizsgálatunkkor a már gélelektroforetikus és spektrofotometrikus módszerekkel is vizsgált mintákat a *4.8 fejezetben* leírt protokoll alapján mértük. Ez a fluoreszcens festékeket alkalmazó módszer a spektrofotometriás mérési módszernél sokkal szelektívebb, mivel a festékmolekulák, amelyeket ezen méréskor alkalmazunk, csak a mintánkban található plazmid DNS (dsDNS) molekulákkal tud kölcsönhatásba lépni. Így kiküszöbölhető a mérendő mintában esetlegesen előforduló szennyeződések (pl. fehérjék, RNS) okozta mérési pontatlanság, ami a spektrofotometrikus mérési módszer esetében az említett makromolekulák elnyelési maximumának közelségéből adódóan jelentkezik (lásd fehérjék esetében az elnyelési maximum 280 nm-nél van). Fontos kihangsúlyozni, hogy a spektrofotometrikus mérési módszer ettől még nem rossz módszer DNS koncentráció meghatározáshoz, hiszen összehasonlítások elvégzéséhez egy gyors és költséghatékony megoldást jelent. A spektrofotometrikus mérési módszer bár költségesebb, elvégzése valamelyest körülményesebb, de az alkalmazott festékek dsDNS-re való szelektivitása miatt a mérés sokkal pontosabb lesz.

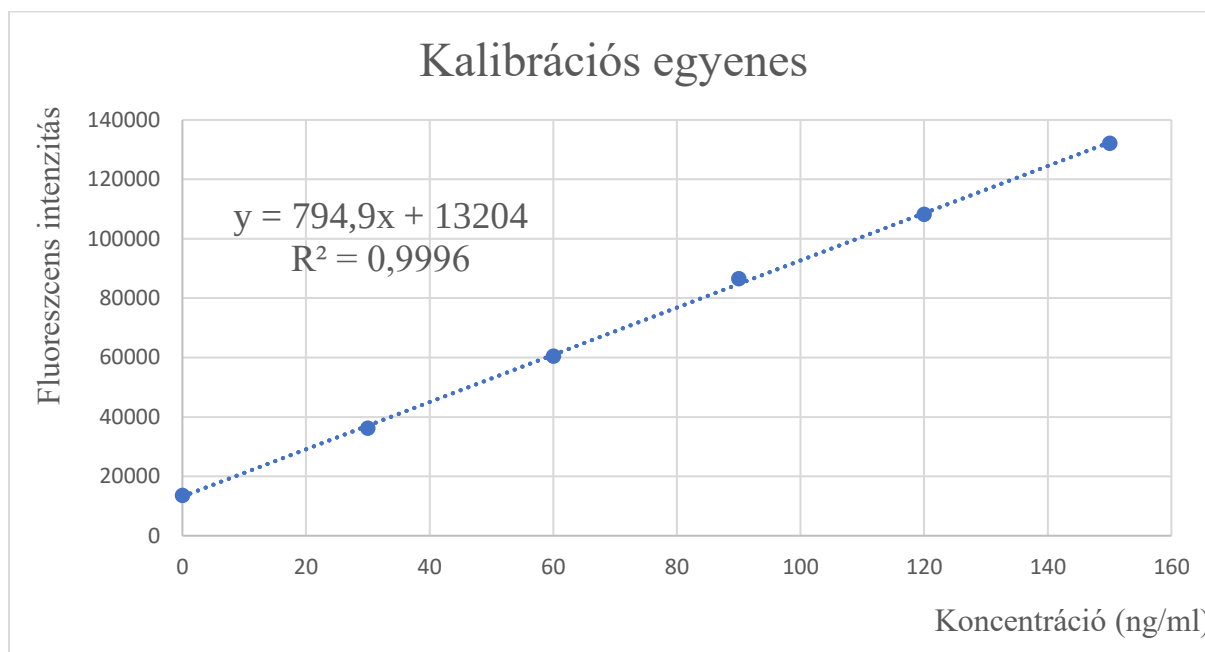
A vizsgálat során az összes frakciót egyszerre mértük, így egy kalibrációs egyenes felvételére volt szükség. A standard koncentrációjú minták bemérését a lemezre az **1. táblázat** alapján végeztük el, a mintákat a **14. ábra** alapján hígítottuk és mértük be a megfelelő mintahelyekre.

A kalibrációs egyeneshez tartozó intenzitás értékeket az alábbi táblázat foglalja össze (**3. táblázat**).

3. táblázat Spektrofluorimetrikus mérésekhez tartozó kalibrációs pontok mért értékei

Standard minta koncentrációja [ng/ml]	Mért fluoreszcens intenzitások átlaga	Fluoreszcens intenzitások szórása
0	13545	288
30	36178	287
60	60475	307
90	86487	2386
120	108167	708
150	132079	522

A **3. táblázat**-ban kiemelt standard koncentráció értékekhez tartozó intenzitás értékeket ábrázoltuk a koncentráció függvényében, és így a következő kalibrációs egyenest kaptuk (**18. ábra** Spektrofluorimetrikus mérések kiértékelésekor használt kalibrációs egyenes).



18. ábra Spektrofluorimetrikus mérések kiértékelésekor használt kalibrációs egyenes

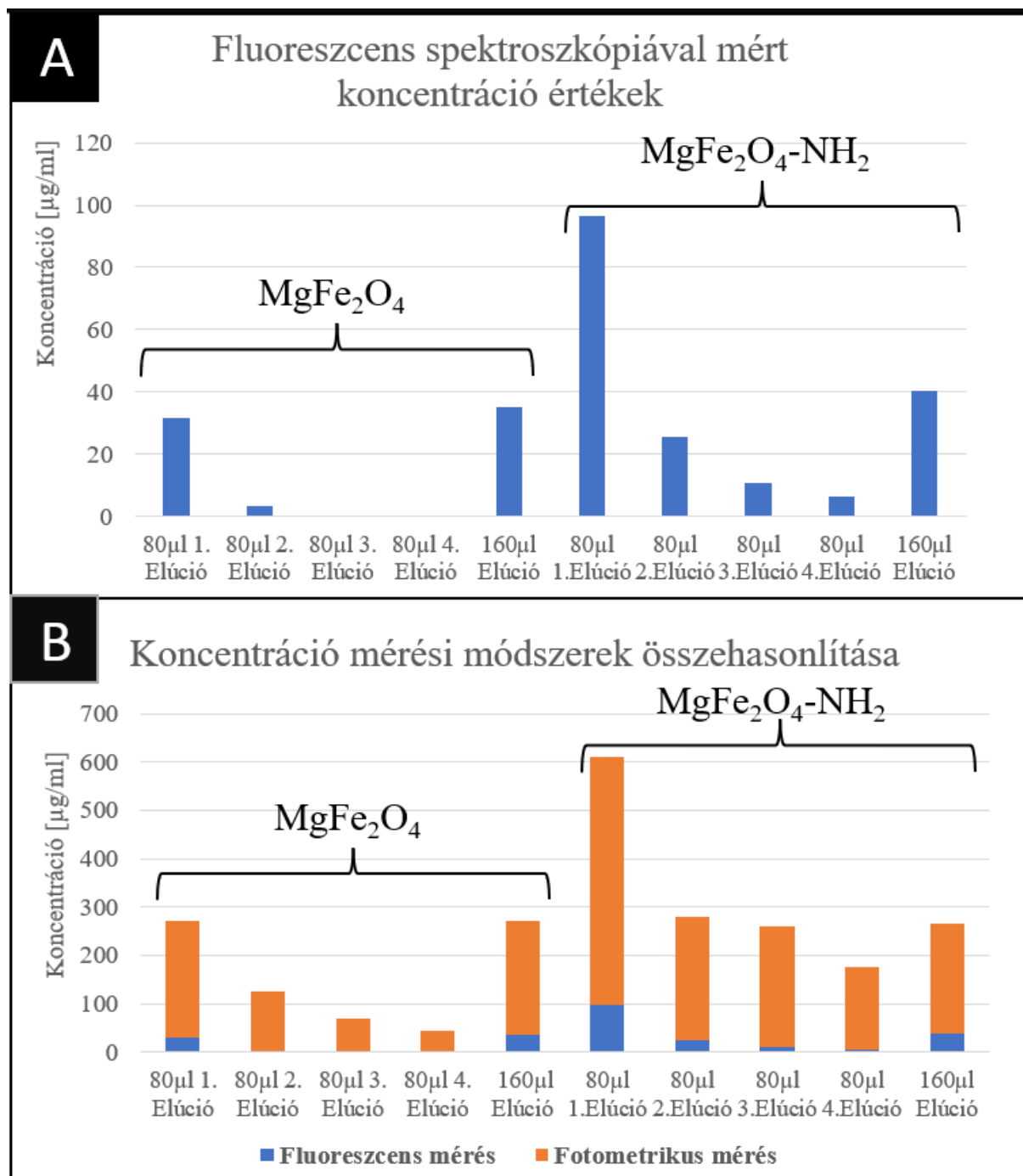
A kalibráció sikeres elvégzése után a minták egy méréshez tartozó eredményeit átlagoltuk, és kiszámítottuk az értékek szórását is. Majd a 4.8.2 fejezetben található **1. egyenlet** megfelelő helyére (*Fluor. Intenzitás*) helyettesítettük be az értékeket és az egyenlet megoldása után kaptuk meg a **4. táblázat** kiemelt értékeit:

4. táblázat Spektrofluorimetrikus módszerrel mért minták koncentráció értékei

Elúciós lépés száma	Elúciós frakciók fluoreszcens intenzitásának átlaga	Intenzitási értékek szórása	Intenzitás értékekből számított DNS koncentráció (µg/ml)
MgFe ₂ O ₄ 4x80µl-es elúciós lépés eredményei			
5. Elúció (80µl)	18910	818	31,78
6. Elúció (80µl)	5590	453	3,54
7. Elúció (80µl)	3963	422	0,00
8. Elúció (80µl)	4298	1212	0,00
MgFe ₂ O ₄ 1x160µl-es elúciós lépés eredményei			
2. Elúció (160µl)	20584	727	35,33
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂ 4x80µl-es elúciós lépés eredményei			
5. Elúció(80µl)	49432	2000	96,51
6. Elúció (80µl)	16075	2494	25,77
7. Elúció (80µl)	8994	694	10,76
8. Elúció (80µl)	6881	290	6,28
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂ 1x160µl-es elúciós lépés eredményei			
2. Elúció (160µl)	22950	395	40,35

5.3 Spektrofotometrikus és fluoreszcens meghatározási módok eredményeinek összehasonlítása

A dolgozatunk utolsó szakaszában a különböző koncentrációmeghatározási módszerek összehasonlítását végeztük el. Az eredmények összefoglalását a **19. ábra B** oszlopdiagrammja szemlélteti.



19. ábra A különböző koncentráció mérési módszerek összehasonlítása

Az oszlopdiagramm kellően szemlélteti a két koncentrációmeghatározási módszer érzékenységbeli különbségét. Mivel a fluoreszcens meghatározási módot specifikusabbnak, pontosabbnak tekintjük, így amennyiben az izolált DNS-t a későbbiekben olyan enzimreakciókhoz szeretnénk felhasználni, ahol ez az izolált DNS templátként lesz alkalmazva (pl. PCR reakciók, vagy restrikciós endonukleázokkal való kezelés), és a reakció sikeres végmenetele függ a templát DNS koncentrációjától, úgy a fluoreszcens festékekkel történő koncentrációmeghatározási módszer alkalmazását javasoljuk.

A diagram alapján jól leolvasható volt az is, hogy azon izolálások során, ahol aminos-funkcionalizált magnézium-ferritet használtunk, az elúciós frakciók koncentrációja magasabb mind a fotometrikusan, mind a fluorimetrikusan mért eredmények esetében. Ebből adódóan a későbbiekre vonatkozóan a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel való plazmid DNS izolálás protokolljának fejlesztését javasoljuk, illetve ezen folyamat automatizálhatóságának tesztelését.

6 Összefoglalás, konklúzió

A rendelkezésünkre bocsájtott két féle mágneses nanorészecskét (**MgFe₂O₄** és **MgFe₂O₄-NH₂**) megvizsgáltuk DNS izolálásban való alkalmazhatóságuk szempontjából, és ezen mérésekkel párhuzamosan teszteltünk egy új DNS koncentráció meghatározásra alkalmas módszert is. Az eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy mind a **MgFe₂O₄**, mind a **MgFe₂O₄-NH₂** alkalmazható plazmid DNS molekulák izolációjára komplex reakcióelegyből (sejtlizátumból) is. Eredményeink arra világítottak rá, hogy a **MgFe₂O₄-NH₂** mágneses nanorészecskével hatékonyabban lehet plazmid DNS-t izolálni, mint a nem funkcionizált párjával. Kísérletekkel alátámasztottuk, hogy kevésbé tiszta minták esetén (amelyekben esetleg a DNS mellett egyéb makromolekulák, vagy szerves oldószer maradványok is vannak/lehetnek) érdemesebb a fluoreszcens festékeket felhasználó koncentráció meghatározási módszert alkalmazni. Hiszen ezek a módszerek olyan festékeket alkalmaznak, melyek specifikusan csak a dsDNS-hez tudnak kötődni, és a megfelelő gerjesztés után fénykibocsátásuk akár 1000x-e is lehet a DNS-hez nem kötött festék formához képest. A spektrofluorimetrikus mérési módszert sikerült adaptálni a saját mérési körülményeinkre, így kijelenthető, hogy a jövőben a módszer alkalmazható a különböző mágneses nanorészecskékkel történő DNS extrakció vizsgálatai során, mint DNS tartalmú minták koncentráció meghatározási módszere, ezzel bővítve a mágneses nanorészecskék molekuláris biológiai tesztelésének folyamatát.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnénk megköszönni Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, a Miskolci Egyetem Anyag és Vegyészmérnöki Kar FIEK Intézetében dolgozó tudományos munkatársnak, konzulensünknek, a munkánk során nyújtott inspiráló segítséget és támogatását. Köszönettel tartozunk Gerzsenyi Tímeának, a Miskolci Egyetem Anyag és Vegyészmérnöki Kar FIEK Intézetében dolgozó PhD hallgatónak a segítségért, amit a kísérletek elvégzése során nyújtott részünkre. Köszönetünket szeretnénk kifejezni Dr. Vanyorek Lászlónak és csoportjának, hogy elvégezték a mágneses nanorészecskék szintézisét és azokat tesztelésre a rendelkezésünkre bocsájtották. Továbbá köszönetet mondunk Prof. Dr. Viskolcz Béla Intézetvezető Úrnak, kutató munkánkban való támogatásáért és a kutatási lehetőségek megteremtéséért.

8 Mellékletek

1.sz.melléklet

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon cl$$

ahol:

A : abszorbancia

I_0 : a minta besugárzása előtti fény intenzitása

I : nem abszorbeálódott fény intenzitása

ε : abszorpciós koefficiens

c : koncentráció

l : optikai úthossz

2.sz.melléklet

Anyag neve	Összetétel/képlet:	Forgalmazó
Bakteriális tápoldat komponensei		
Trypton	tripszinnel emésztett kazein	VWR Chemicals
Élesztő kivonat		VWR Chemicals
NaCl		VWR Chemicals
Agar	tengeri vörösmoszatokból nyert poliszacharid-keverék (70% agaróz, 30% amilopektin)	VWR Chemicals
Izolációs reakcióhoz használt oldatok, reagensek		
Renaturáló oldat (P1)	glükóz-Trisz-EDTA tartalmú puffer oldat (gyártó által meghatározott összetétel)	Merck Life Science Kft.
Lízis (sejtfeltáró oldat) oldat (P2)	NaOH-SDS tartalmú puffer oldat (gyártó által meghatározott összetétel)	Merck Life Science Kft.
Neutralizáló oldat (P3)	Kálium-acetát tartalmú puffer (gyártó által meghatározott összetétel)	Merck Life Science Kft.
Etanolos mosó puffer	gyártó által meghatározott összetétel	Merck Life Science Kft.
Elúciós puffer	Trisz-EDTA tartalmú puffer oldat gyártó által meghatározott összetétel	Merck Life Science Kft.
MNP-kötő puffer (1)	NaCl (2,5 M), Trisz-HCl pH 8.0 (10 mM), EDTA (1 mM), Tween 20 (0,05 v/v%).	[18]
MNP-kötő puffer (2)	NaCl (2,5 M), Trisz-HCl pH 8,0 (10 mM), EDTA (1 mM), PEG 6000 (20% w/v), Tween 20 (0,05%)	[19]
Trisz-etanol mosó puffer (3)	Trisz-HCl pH 7,5 (10 mM), etanol 80 %	[19]

Gélelektroforézishez használt oldatok, reagentek		
Agaróz I™	D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktopiranoz lineáris polimere	VWR Chemicals
GelRed fluoreszcens DNS festék	gyártó által meghatározott összetétel	Biotium/VWR Chemicals
GeneRuler™ 1 kb molekulásúly marker	gyártó által meghatározott összetétel	Thermo Fisher Scientific
TAE puffer elektroforézishez	Trisz(hidroximetil)- aminometán (C ₄ H ₁₁ NO ₃) Ecetsav (CH ₃ COOH) EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	VWR Chemicals
Fluoreszcens spektroszkópiai mérésekhez felhasznált oldatok, reagentek		
20x TE puffer	Tris-HCl (pH 8.0) EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Thermo Fisher Scientific
Lambda DNS (λDNS) standard (100µg/ml)	gyártó által meghatározott összetétel	Thermo Fisher Scientific
Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent	gyártó által meghatározott összetétel	Thermo Fisher Scientific

9 Irodalomjegyzék

- [1] Dr. Váradi Csaba-Nukleinsavak, DNS replikáció, Transzkripció, Transzláció 7., előadás jegyzet, oktatási anyag, Miskolci Egyetem (2021)
- [2] Hironori Nakagami, Development of COVID-19 vaccines utilizing gene therapy technology, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab013>, (2021)
- [3] Arthur D Riggs, Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin doi: 10.1210/endrev/bnaa029 (2020)
- [4] https://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli (2022.11.03) (online hivatkozás)
- [5] S. B. Primrose, The application of genetically engineered micro-organisms in the production of drugs, *Journal of Applied Bacteriology*, (1986) (folyóirat)
- [6] Marie Deckers, et. al., Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview, <https://doi.org/10.3390/foods9030326>, (2020) (folyóirat)
- [7] https://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic_nanoparticles (2022.11.03) (online hivatkozás)
- [8] Jing-fu Liu, Zong-shan Zhao, Gui-bin Jiang, Coating Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles with Humic Acid for High Efficient Removal of Heavy Metals in Water, <https://doi.org/10.1021/es800924c>, (2008), (folyóirat)
- [9] Ji Hyun Min, et. al., Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.018>, (2014) (folyóirat)
- [10] Robert N. Grass, Evagelos K. Athanassiou, and Wendelin J. Stark, Covalently Functionalized Cobalt Nanoparticles as a Platform for Magnetic Separations in Organic Synthesis, DOI: 10.1002/anie.200700613, (2007) (folyóirat)
- [11] Gerzsenyi Tímea, et. al., Sonochemical assisted combustion synthesis of manganese ferrite magnetic nanoparticles and their application in DNA isolation, doi: under review, (2022) (folyóirat)
- [12] <https://hu.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometria> (2022.11.03) (online hivatkozás)
- [13] Dr. Muránszky Gábor, *Analitikai kémia, UV-látható spektrometria*, előadás jegyzet, (oktatási anyag)
- [14] <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/photometry/applications/detailview-applications/news/uv-vis-spectrophotometry-easy-and-quick-quantification-of-nucleic-acids/> (online hivatkozás) (2022.11.04)
- [15] <https://www.microspectra.com/support/learn/protein-absorption> (online hivatkozás) (2022.11.04)
- [16] <http://www2.sci.u-szeged.hu/inorg/fls.pdf> (online hivatkozás) (2022.11.04)
- [17] <https://www.researchgate.net/topic/PicoGreen> (online hivatkozás) (2022.11.04)
- [18] Dr. Szőri-Dorogházi Emma és mts. *Biokémia laboratóriumi gyakorlatok, egyetemi jegyzet* (oktatási anyag) (2022)
- [19] Phil Oberacker, Peter Stepper, Donna M. Bond, Sven Höhn, Jule Focken, Vivien Meyer, Luca Schelle, Victoria J. Sugrue, Gert-Jan Jeunen, Tim Moser, Steven R. Hore, Ferdinand von Meyenn, Katharina Hipp, Timothy A. Hore, Tomasz P. Jurkowski, Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation,, *PLOS Biology*, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000107> (2019) (folyóirat)
- [20] https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvs_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb (online hivatkozás)