Az alább megfogalmazott rendszabályok betartása mindannyiunk közös érdeke, melyek betartása nélkül a gyakorlatot nem tudjuk eredményesen és biztonságosan elvégezni. A leírtak nem csak tájékoztató jellegűek, hanem *igen szigorúan be fogjuk tartani őket*!

Nagyon megkérünk mindenkit, hogy figyelmesen olvassa végig a pontokat, hogy esetleg felmerülő kérdésekre időben válaszolhassunk (legkésőbb a gyakorlat kezdetekor). Utólagos reklamációt a "pénztártól való távozás után" *senkitől sem fogadunk el*!

1. Gyakorlat elvégzéshez kapcsolódó általános szabályok

1.a. A gyakorlat aláírásának feltétele a *megjelenés a gyakorlaton, üzemlátogatáson és a gyakorlat elvézégzése, jegyzőkönyv leadása*. Ezek elmaradása esetén a gyakorlatot *nem tudjuk aláírni*.

1.b. Igazolt hiányzás esetén (pl. betegség) a távolmaradás okáról a gyakorlatot követő egy héten belül *értesítést várunk* (telefon, üzenet, email, stb). Telefonszám: (62/544 503), email: perei@brc.hu
Orvosi igazolást csak a felgyógyulást követő *egy héten belül* fogadunk el. "Visszamenőleges" igazolást *nem veszünk figyelembe*.

1.c. Mivel a gyakorlat eredményes végrehajtásához fontos a pontos időzítés, a gyakorlatot *pontosan kezdjük*. A kezdéstől számított *10 percen túl érkezőket automatikusan elküldjük*, és ez *igazolatlan hiányzással* egyenértékű.

2. Biztonsági rendszabályok

2.a. A laborban *köpeny viselése kötelező*, erről mindenki igyekezzen *magának gondoskodni*. Hiányzó köpenyeket nem tudunk pótolni, a köpeny nélkül megjelenők *gyakorlati munkát nem végezhetnek*. Hasonlóképpen kötelező *laborkesztyű* viselése is a gyakorlatokon, ezt azonban biztosítjuk.

2.b. Gyakorlat előtt ismertetjük a *biztonsági szabályokat*, illetve az esetleges veszélyes anyagokkal való bánásmódot. Ennek betartása *mindenkire nézve kötelező*.

3. A gyakorlat értékelése

3.a. A gyakorlat elméleti anyagát, valamint az elvégzendő kísérletek menetét tartalmazó *protokollt* mindenkinek időben eljuttatjuk, illetve az interneten elérhetővé tesszük. Ennek ismerete *kötelező,* melyről *írásban* is számot kell adni.

3.b. A gyakorlatot kisebb, 2-3 fős munkacsoportokban végezzük, azonban mindenki *külön jegyzőkönyvet* fog vezetni, melyet szintén értékelünk.

3.c. A gyakorlat végső jegye az *elméleti* (írásbeli) és *gyakorlati* (labormunka, jegyzőkönyv) eredményeiből fog kialakulni.

3.d. A gyakorlati jegy kísérletes részének javítására *nincs lehetőség*. Az elméleti felmérő javítására kizárólag a *vizsgaidőszak kezdetéig* és csak *egyszeri alkalommal* van lehetőség.

Biotechnológia gyakorlat: 3. évfolyam/2. félév, biológusoknak.

A gyakorlat 3 fő részből fog állni. Egyrészt a gyakorlatban is megismerkedünk néhány, az előző félév elméleti óráin ismertetett, *fehérje túltermeltetésére* használt vektorokkal és baktériumtörzsekkel (i). Emellett bemutatunk egy példát a környezetben található szervesanyagok közül a *keratin lebontására* képes baktériumtörzsek működésére (ii), valamint a gyakorlat harmadik részében (iii) egy 1 órás látogatást teszünk a Szegeden nemrég beindult fermentációs üzemnél (Corax-Bioner Kft.).

(i). FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉS *Escherichia coli*-ban

A GYAKORLAT CÉLJA

A laboratóriumi gyakorlat célja, hogy megismertesse az egyetemi hallgatókat az *E. coli*-ban történő fehérje túltermeltetés kísérleti elemeivel. A munkához a pET indukálható expressziós rendszert használjuk, és a gyakorlat során tanulmányozni fogjuk:
- az indukció ***időtartamának*** hatását a termelt fehérje ***mennnyiségére***
- az indukció ***hőmérsékletének*** hatása a termelt fehérje ***oldékonyságára***

FONTOS FIGYELMEZTETÉS: A GYAKORLAT TELJES MEGÉRTÉSÉHEZ ***KÖTELEZŐEN ISMERNI KELL A LAKTÓZ-OPERON SZABÁLYOZÁST***!!
ENNEK ISMERETE NÉLKÜL A GYAKORLAT ***NEM ELVÉGEZHETŐ***. AZ ISMERETEKRŐL A GYAKORLAT ELEJÉN KÖZVETLENÜL, FELMÉRÉSBEN FOGUNK MEGGYŐZŐDNI.

Elméleti háttér

T7 RNS polimeráz alapú rendszer

A T7 fág RNS polimerázán alapuló fehérje termeltetési rendszert Studier és munkatársai fejlesztették ki 1986-ban. A rendszer működési elve azon alapszik, hogy a T7 bakteriofág RNS polimeráza
1. nagyfokú ***szelektivitással*** rendelkezik, azaz nem ismeri fel a gazdasejt (*E. coli*) promotereit,
2. sokkal (kb. 5x) ***gyorsabb***, mint az *E. coli* saját RNS polimeráza, ami nagy mennyiségű mRNS termeltetését teszi lehetővé.

A fentiekből következik, hogy ha egy *E. coli* sejtbe olyan vektort viszünk be, amelyben a termeltetendő fehérje génjének átíródása a T7 fág valamelyik promóteréről történik, ennek a génnek a transzkripcióját ***csak a T7 RNS polimeráz tudja biztosítani*** (az *E. coli* saját RNS-polimeráza nem). A T7 RNS-polimeráz kifejeződését azonban már vezérelheti a gazdasejt (*E. coli*) transzkripcios apparátusa, melyen keresztül a túltermeltetni kívánt fehérje átíródása beindítható.

A T7 RNS polimeráz transzkripciójának indukciója

A T7 RNS polimeráz génjének indukálható transzkripcióját úgy a oldották meg, hogy a gént a *lac*UV5 promóterről átíródó *lacZ* gén 5' végi régiójával fúzionáltatták (1. Ábra). Így az alábbi konstrukciót kapták: *represszor: LacI + promoter: LacUV + operátor: LacO + struktúrgén: T7 RNS polimeráz*. Ily módon a T7 RNS polimeráz génjének szabályozása az IPTG-vel indukálható *lac* operon szabályozásához vált hasonlatossá. Érdemes megjegyezni, hogy a szabályozásból a glükóz/cAMP függő elem UV mutagenezissel ki lett iktatva, így a gén glükóz jelenlétében, gazdag táptalajon is kifejeződik.

Gazdasejtek

BL21(DE3). A DE3 egy λ baktriofág származék a "21 - es" fág immunitás régióval. Az *int* génjébe, melynek terméke a kromoszómális integrációért felelős, beépítettek egy fragmentumot, amely tartalmazza a fent említett *lac*UV5 promotert, a *lacZ*-T7 RNS polimeráz konstrukciót, és a *lacI* represszor gént. Ily módon ez a régió egy olyan helper fág segítségével, amely tartalmazza az intakt *int* gént, mobilizálható, viszont a kromoszómán belül az inaktív *int* gén miatt stabil marad. A lizogén

állapot létrejöttével az *E. coli* kromoszóma tartalmazza a T7 RNS polimeráz génjét a *lac* operon szabályozó elemeivel együtt (1. ábra), s ezért izopropil-tiogalaktoziddal (IPTG) indukálható. E sejtekben mind a Lon mind az OmpT proteáz el lett rontva, így a fehérjék várható élettartama megnövekszik.

pET vektorok

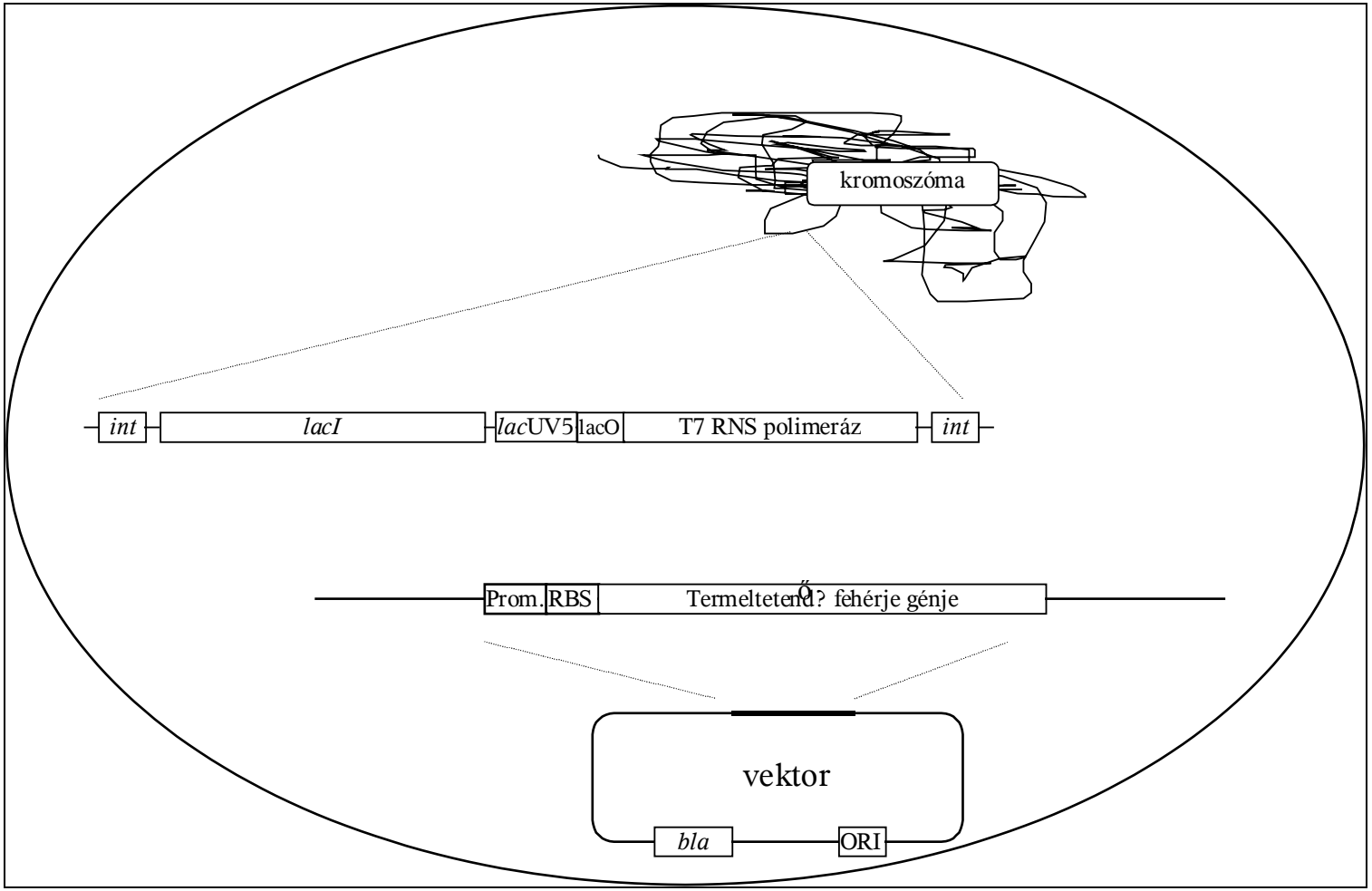
A pET vektorok olyan vektorok, amelyek esetén a termeltetendő fehérjék transzkripcióját T7 promóter biztosítja (*p*lasmid for *e*xpression by *T*7 RNA polymerase). pBR322 alapú, alacsony kópiaszámú vektorok, amelyek jelenlétére általában ampicillinnel lehet szelektálni, a rezisztenciát a plazmidon található *bla* gén terméke biztosítja.
A termeltetendő fehérje génjének transzkripcióját a T7 fág egyik legerősebb, *ϕ10* promótere vezérli.
Léteznek olyan konstrukciók is, amelyekben a T7 promóterhez 3' irányban fúzionáltatták **a *lac* operátor (*LacO*)** 25 bp hosszúságú szakaszát (T7*lac* promóterek). Ilyen vektorok ***kettőzött biztonságú rendszert jelentenek***, hisz mind a T7 RNS polimeráz, mind a termeltetendő fehérje génje a *lac* operátor szabályozása alatt áll, így a termeltetendő fehérje transzkripciójának gátlása a nem-indukált fázisban duplán gátolt, mivel az operátorhoz kötődő represszor megakadályozza a promoterről a gén transzkripcióját. Természetesen minden vektor tartalmaz a promótertől 3' irányban olyan restrikciós helyeket, ahová a termeltetendő fehérje génje beilleszthető (multi cloning sites).

A fehérjetúltermeltetéshez használt vektorok két fő típusa

Transzkripciós vektorok olyan vektorok, amelyek tartalmazzák a T7 promótert, és a transzkripcióhoz szükséges elemeket, de nem tartalmaznak potenciális transzlációs szignálokat (pl. pET1-5).

Transzlációs vektorok, amelyek a transzkripciós elemeken kívül tartalmazzák a ***"T7 Tag"*** fehérjéhez tartozó transzlációs szignálokat (2. ábra, a silabusz végén). A vektorokba beépített "-23" - "+96" régió hordozza az első 11 aminosavat kódoló tripleteket, és a polilinker szakasz csak ezután következik. Ez azt jelenti, hogy amennyiben ezen helyek valamelyikére klónozunk, és nem illesztünk a fenti génünk elé transzlációs stop kodont, fúziós fehérjét kapunk. Ez nem feltétlenül zavaró, esetenként a tisztítást megkönnyíti. Általában egy típusú vektornak három változatát készítették el, amelyek csak abban különböznek, hogy a klónozó régiót egy-egy nukleotiddal eltolták, így a gént tetszőleges leolvasási keretbe lehet klónozni (pl. *pET21a, pET21b, pET21c*…).
A transzlációs start kodon úgy lett kialakítva, hogy ez valamilyen restrikciós endonukleáz felismerőhelyén belül található, lehetővé téve, hogy a gént közvetlenül ide klónozzuk. Ebben az esetben a fúzió elkerülhető, és csak a kívánt fehérje fog termelődni.
A gyakorlat során a *pET21b* vektorral készült konstrukciót használunk. Ez egy T7*lac* promótert tartalmazó transzlációs vektor.

Az indukció folyamata tehát a következőképpen zajlik:
1. a túltermeltetni kívánt fehérjét klónozzuk a pET vektorba, a T7 fág ϕ10 vagy T7lac nevű promotere mögé
2. ezt a konstrukciót betranszformáljuk olyan BL21(DE3) E. coli gazdasejtvonalba, mely a kormoszómáján tartalmazza az inaktív *int* régiók között a LacUV/LacO mögé klónozott, ezáltal IPTG-indukcióra működő T7 RNS polimeráz gént
3. IPTG hozzáadásakor a LacI (inhibitor) génről termelődő represszorfehérje nem tud az operátorhoz (LacO) kötődni, így a LacUV promoterről megindulhat a T7 RNS polimeráz fehérje termelődése, ami
4. a vektoron levő T7 (ϕ10 vagy T7lac) promoterekhez kapcsolódva megindítja a célgén kifejeződését



lacI: laktóz inhibitor
lacO: laktóz operátor
Pro: promoter ϕ10 v. T7lac
RB: riboszómakötő hely
bla: ampicillin-rezisztencia génje
OR: replikációs origó
int: kromoszómális integrációs elem

1. ábra. A pET vektorokon alapuló, indukálható fehérje termelés elvi sémája.

A termelt fehérje toxicitásának kivédése

Az idegen fehérjék - főleg, ha nagy mennyiségben vannak jelen toxikus hatással lehetnek a gazdasejt számára, ezért álatlában nagy mennyiségű biomassza a fehérje termelésével párhuzamosan nem nyerhető. A probléma feloldható, ha a biomassza képződést (sejtnövesztés) és a fehérje termeltetés folyamatát elválasztjuk. Erre a pET rendszer esetén két alapvető stratégia létezik:

A. a T7 RNS polimeráz génjének transzkripcióját egy ***indukálható promóteren*** keresztül biztosítjuk. Ennek során a sejteket először normál körülmények között növesztjük, majd a növekedés legintenzívebb szakaszában beindítjuk - ***indukálószerrel*** - a vektoron bevitt idegen fehérje túltermelését. A gyakorlaton ezt a módszert fogjuk bemutatni, mégpedig a laktóz-operonhoz hasonlóan szabályozódó, IPTG-vel indukálható pET-vektorrendszer felhasználásával.

B. a T7 RNS polimeráz génjét egy fág vektoron keresztül juttatjuk be a sejtekbe a növekedés megfelelő periódusában. Ennek a megközelítésnek különösen nagy jelentősége van olyan fehérjék esetén, amelyek rendkívül kis koncentrációban is mérgezőek a gazdasejtre, hisz a T7 RNS polimeráz hiányában a megfelelő mRNS egyáltalán nem képződik. Ugyanakkor ez a stratégia komplikáltabb, nehézkesebb, ezért csak végszükség esetén szokták használni, és a továbbiakban mi sem foglalkozunk vele részletesen.

<u>*Kísérleti előzmények*</u>

Laboratóriumunkban hipertermofil sejtek, köztük a *Thermococcus litoralis* és *Pyrococcus furiosus* hidrogenázait tanulmányozzuk. A *T. litoralis* heterotetramer citoplazmatikus fehérje négy alegységét ($\beta\gamma\delta\alpha$) kódoló gének szekvenciáját meghatároztuk, és a γ alegység funkciójának részletesebb analízise érdekében az ezt kódoló gént (*hydG*) túltermelő vektorba klónoztuk.

A klónozás menete a következő volt:
1. A *hydG* elejére és végére tervezett oligonukleotid primerek felhasznásával, kromoszómális DNS-ről polimeráz láncreakcióval (PCR) kiamplifikáltuk a gént tartalmazó DNS szakaszt. A PCR-ben használt 5' végi primert úgy terveztük meg, hogy a gén start kodonjának (ATG) a második nukleootidjatól (***TG…..***) induljon. Miután a PCR termékét tompa véggé alakítottuk, Klenow polimerázzal feltöltött *Nde*I helyre (CAT<u>A↓TG</u> ⇒ CATA) klónozva a felismerési szekvenciában szereplő transzlációs start kodon helyreáll (CATA***TG…..***). A 3' végi primer pedig a transzlációs stop kodonnal komplementer szekvenciával kezdődik.
2. Ezt a fragmentumot pET21b vektor *Nde*I - *Bam*HI helyére klónoztuk, miután a megfelelő végeket feltöltöttük. Mivel a fragment beépülésének iránya ismeretlen volt, ezért az inszert beépülésének irányát is ellenőrizni kellett. Ez a feladat restrikciós térképezéssel egyszerűen megoldható volt.
Ily módon olyan konstrukciót hoztunk létre, amelyben
- a "T7.Tag" fehérje transzlációs elemeit használjuk,
- nem képződik fúziós fehérje, mert a "10" fehérje első 11 aminosavját kódoló régiót az *Nde*I - *Bam*HI emésztéssel eltávolítottuk.

A fragment nukleotid sorrendjét szekvenciaanalízissel ellenőriztük. Erre azért van szükség, mert a termostabil polimerázok gyakrabban hibáznak, és szinte minden esetben meg kell győződni arról, hogy az így izolált DNS darab 100%-ban megfelel-e a vad típusú szekvenciának. Az így előállított konstrukció, a pLHG1/5, BL21(DE3) sejtekbe juttatva fehérje túltermeltetésre közvetlenül felhasználható. A keletkezett túltermelt fehérjék várható mérete: 32 kDa.

Megjegyzendő, hogy pET rendzser esetén, mivel a T7 RNS-polimeráz fehérjét is "túltermeljük", így ez is egy jól látható sávot ad 90 kDa magasságában.

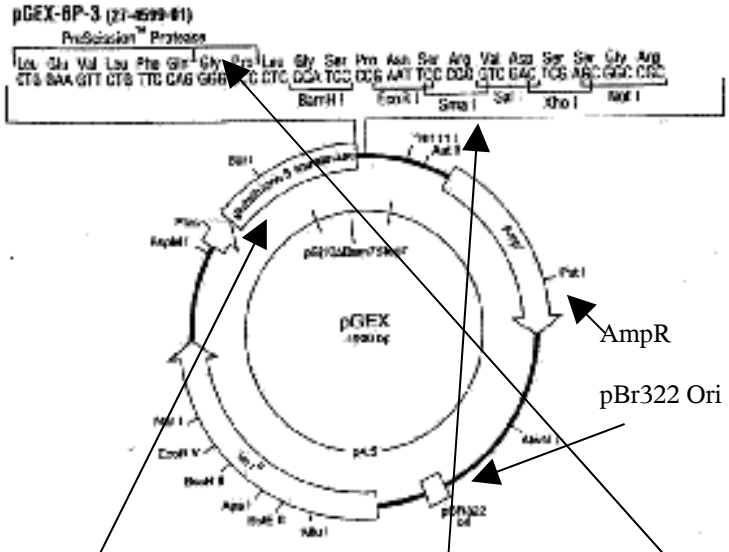
pGEX-rendszer

A pGEX vektorok olyan vektorok, amelyekben a termeltetni kívánt fehérje génjét a glutation S-transzferáz (GST) génjével fúzionáltatjuk. A glutation S-transzferáz egy 26 kDa-os fehérje, amely *E. coli*-ban aktívan termeltethető. A GST fúziós fehérjék pedig glutationt hordozó affinitás oszlopon (Glutation -Sepharose) tisztíthatóak. A mai napig 13 fajta pGEX vektor létezik, és a vektorok általános felépítése a 3. ábrán látható.

Jellemzőik:

A replikációs origo a pBR322 plazmidból származik, ezért ezek a vektorok alacsony kópiaszámúak.

Minden vektorban a β-lactamase biztosítja a vektort tartalmazó sejtek számára az ampicillin rezisztenciát.



A ***GST*** és a ***termeltetni kívánt fehérje*** közé egy ***proteolitikus hasítóhelyet*** építettek be.

A vektorok általában úgy készültek, hogy mind a három leolvasási keretben legyen kónozható a fehérjénk génje, azaz ahhoz, hogy a leolvasási keret ne sérüljön csak a megfelelő vektort kell kiválasztani a három közül.

A GST fúziós fehérjék csakúgy, mint a természetes GST dimerizálódnak

A gének transzkripcióját a *tac* promóter vezérli. Ez a *trp* operon és a lac promóter megfelelő régióit tartalmazza az operátor szekvenciával együtt. Ez sokkal erősebb indukálható expressziót biztosít, mint a *lac* promóter. Tehát ebben az esetben is IPTG-vel tudjuk indukálni az expressziót, csak a pET vektoroktól eltérően itt közvetlenül a termeltetni kívánt fehérje génjének transzkripcióját indukáljuk, nem egy köztes termékét (T7 polimeráz).

A nem-indukált körülmények között a repressziót a $lacI^q$ represszor biztosítja.

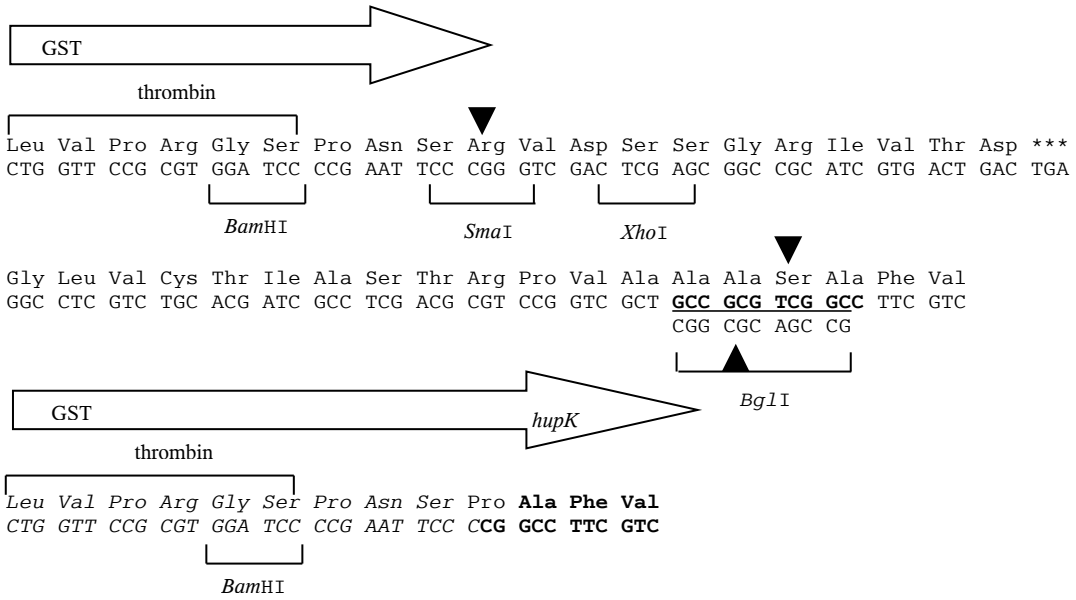
A vektorok egymástól az alábbiakbban térnek el:
- a többszörös klónozó régióban hány restrikciós endonukláz felismerő hely található
- milyen proteáz hasítóhelyet építenek a GST és a termeltetni kívánt fehérje közé (Thrombin, Factor XA, PreScission Protease).

A fehérje termeltetéshez a fent ismertetett BL21 törzset használjuk (Nem a BL21(DE3)-t, mert a T7 RNS polimerázra nincs szükség..

Kísérleti előzmények

A *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] hidrogenázainak érésében szerepet játszó hupK gént egy darabját klónoztuk. A pM42-5 klónt *Bgl*I-gyel emésztettük, políroztuk, majd *Xho*I-gyel hasítottuk. A kapott 1.4 kb fragmentet, pGEX4T-3 *Sma*I, *Xho*I helyére klónoztuk. Ezzel a stragégiával a HupK 10%-a marad csak le, ami poliklonális ellenanyagtermeltetés szempontjából talán nem lényeges csonkítás.

A fentiek alapján (1400÷3) x 100) ÷ 1000 + 26 ≈ 47 +26 ≈ 73 kDa nagyságú túltermeltetett fúziós fehérjét várunk. A klónozás elvi sémája és a kapott konstrukció a 4. ábrán látható.



4. ábra GST-HupK fúziós konstrukció készítése. A leolvasási keretek illesztése

A GYAKORLAT MENETE

1. LB^{amp} lemezen frissen felnövesztett kultúrából oltsunk le egy kolóniát 30 ml LB^{amp} tápoldatba. Erlenmeyer lombikban rázassuk 37°C-on $OD_{600nm} \approx 0.4$ értékig.(LB tápoldat ($1dm^3$): 10 g Bacto tripton, 5g élesztőkivonat, 10 g NaCl, pH=7.0, az LB lemez 1.5% agar tartalmaz, az ampicillint pedig 100 µg/ml végkoncentrációban használjuk.)

2. Felezzük el a kultúrákat, és 15 ml-t rázassunk tovább indukció nélkül. A másik 15 ml kultúrához adjunk 150 µl (1mM) IPTG-t 100mM törzsoldatból.

3. Rázassuk tovább a kultúrákat:

1, 3 pár:	37 C-on	2 órát
2, 4 pár:	37 C-on	éjszakán át
5, 7 pár:	20 C-on	2 órát
6, 8 pár:	20 C-on	éjszakán át

4. A következő lépéseket mind az indukált mind az indukálatlan mintákkal meg kell csinálni. Mérjük meg a fényszóródást 600 nm-en

5. Vegyünk ki 1.5 ml-es eppendorf csőbe 1.5 ml kultúrát, és centrifugáljuk max. sebességgel eppendorf centrifugában 5 percig.
A felülúszót gyűjtőbe öntjük.

6. Szuszpendáljuk fel a sejteket 300 µl TE pufferben (50mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH=8.0), és centrifugáljuk az 5. pontban leírtaknak megfelelően.

7. Szuszpendáljuk fel a sejteket TE pufferben. A hozzáadandó puffer mennyiségét a mért fényszórás alapján határozhatjuk meg,
$V= OD_{600nm} \times 100$ [µl]
azaz, ha a fényszórás 1.93 volt a 4. pont alapján, akkor a sejt csapadékhoz 193 µl TE puffert adunk.

8. Fagyasszuk le a mintákat folyékony N_2-ben kétszer. (Folyékony N_2-be rakjuk a sejteket tartalmazó eppendorfokat 2-3 percig, majd szobahőmérsékleten vagy 37°C-on felmelegítjük.) Ez a sejtek feltárását szolgálja. Az SDS-PAGE-n való futtatásig -20°C-on tároljuk a sejteket.

Hallgató pár	Indukció időtartama	Felhasznált vektorrendszer	Indukció hőmérséklete
1	2 h	pET21	37°C
2	éjszaka	pET21	37°C
3	2 h	pGEX	37°C
4	éjszaka	pGEX	37°C
5	2 h	pET21	20°C
6	éjszaka	pET21	20°C
7	2 h	pGEX	20°C
8	éjszaka	pGEX	20°C

IPTG-koncentráció: 1mM

Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Elvi megjegyzések

A sejtszuszpenziót denaturáló körülmények között, SDS jelenlétében poliakrilamid gélen analizáljuk. Az akrilamid gyökképző (ammónium perszulfát) hatására lineáris polimert képez, s ezt a polimerizációs folyamatot katalizátorral (TEMED) lehet gyorsítani. A térhálós polimer szerkezet kialakítása bis-akrilamid alkalmazásával oldható meg. Ilyen térhálós szerkezet makromolekulák, fehérjék, nukleinsavak elválasztását teszi lehetővé. Az SDS-poliakrilamid gérelelektroforézis (SDS-PAGE) denaturált fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztására használható. Az SDS hozzátapad a fehérjékhez, a több alegységes enzimeket alegységeire bontja, denaturálja azokat, negatív töltést kölcsönöz nekik, ezért SDS jelenlétében az összes fehérje a pozitív pólus felé fut. A kapcsolódó SDS mennyisége arányos a fehérje méretével, ezért a komplex futási sebessége, futási távolsága fordítottan arányos a komplex illetve a fehérje molekulatömegével. Ismert molekulatömegű fehérjék mellett futtatva ismeretlen fehérjék molekulatömege számolható. A transzlációt követő módosulások, mint pl. glikoziláció ezeken a sajátságokon jelentősen változtathatnak.

A gél két részből áll: ún. “stacking” és szeparáló gélből. Felül található az “stacking gél”, amely viszonylag rövid és a minták kis térfogatban való koncentrálását teszi lehetővé a gélek határfelületén, ami az elválasztás hatékonyságát növeli. A szeparáló gél hosszabb, és a fehérjék méret szerinti elválasztását valójában ez végzi.

A gél öntése

FIGYELEM!!!
AZ AKRILAMID ERŐS IDEGMÉREG, EZÉRT A VELE VALÓ MUNKA NAGY ELŐVIGYÁZATOSSÁGOT IGÉNYEL. LABORATÓRIUMI VÉDŐKÖPENY ÉS GUMIKESZTYŰ VISELETE GÉLÖNTÉS SORÁN KÖTELEZŐ. A MÁR POLIMERIZÁLT AKRILAMID EGÉSZSÉGRE LÉNYEGESEN KEVÉSBÉ VESZÉLYES.

A vertikális gélöntő és futtató rendszer Hoefer és BioRad gyártmányú. Ezek összeszerelése a laboratóriumi gyakorlat vezetőinek helyszíni útmutatásai alapján történik.
Először, alulra a szeparáló gélt öntjük ki.
A keveréket összemérés, és elegyítés után azonnal öntsük az üveglapok közé, a szeparáló gélre, és helyezzük be a fésűt. A gél 10 - 20 perc alatt polimerizál.
A polimerizációt követően a gélöntő rendszerből a gélt tartalmazó üveglapokat eltávolítjuk, a fésűt kivesszük, majd a zsebeket vízzel öblítjük.

Futtatás

A gyakorlat vezetőinek instrukciói alapján a gélt a futtató kádban rögzítjük, a kádat futtató pufferrel feltöltjük.
Futtató puffer:

25mM Tris
250 mM glicin pH=8.3
0.1 % SDS

A fehérje mintákat -20°C-ról kivesszük, hagyjuk felengedni.

9a. **Az 1, 3, 5, 7 sorszámú kísérletet végzők**:
Mind a nem-indukált mind az indukált mintákból 30 - 30 µl-t átmérünk egy 1.5 ml-es eppendorfba, hozzáadunk 15 µl vizet, 15 µl 4 X SDS felvivő puffert (200mM Tris-Cl (pH=6.8), 400mM ditiotreitol (DTT), 8% SDS, 0.1% brómfenolkék, 10% glicerin). Az elegyet 95°C-on tartjuk 5-10 percig majd ebből 10 µl-t a gél zsebeibe átpipettázunk. Így egy kísérlethez egy indukált és egy nem-indukált minta tartozik.

9b. **A 2, 4, 6, 8 sorszámú kísérletet végzők:**
Ezekben a kísérletekben megvizsgáljuk, hogy a fehérje (ami a *T.litoralis*-ban citoplazmatikus) oldékonysága hogyan függ az indukció hőmérsékletétől. Ezért (*miután 30 µl mintát kivettünk futtatáshoz*), az indukált minták esetén az oldékony és nem oldékony frakciót centrifugálással

elválasztjuk (maximális sebesség, 10 perc), majd a felülúszót egy másik eppendorf csőbe pipettázzuk. A csapadékot ugyanannyi oldatban szuszpendáljuk, mint a 7. pontban. A nem indukált mintával ezeket a lépéseket nem kell megcsinálni, hanem úgy járunk el, mint 9a. pontban. Ezekből az oldatokból 30 µl-t kiveszünk, 15 µ vizet és 15 µl 4 X SDS felvivő puffert adunk hozzá, 95ºC-on tartjuk 5-10 percig, majd 10 µl-t a gél zsebeibe pipettázunk.
Ebben az esetben egy kísérlethez egy nem-indukált és három indukált (teljes sejtextract, egy oldékony és egy nem-oldékony frakció) tartozik

Minden gél esetén egy zsebbe 15 µl fehérje molekulasúly markert viszünk (Merck Type IV).
A marker által tartalmazott fehérjék molekulatömege:

Fehérje	Molekulatömeg g/mol
citokróm C	12384
Mioglobin	16949
Karboanhidráz	30000
Ovalbumin	42700
Albumin	66250
Ovotranszferrin	78000

A mintákat 75 V-on futtatjuk kb. két órán át.

A gél festése

Futtatás után a gélt szétszedjük, a „stacking" gélt eltávolítjuk, majd a szeparáló gélt óvatosan a festő tálcába tesszük. A gél térfogatához képest legalább 5-szörös mennyiségű (kb. 50 ml) Coomassie oldatot (0.25 g Coomassie Brilliant Blue R250, 90 ml 50 v/v% metanol, 10 ml jégecet, Whatman No1. szűrön szűrve) öntünk rá. 1 órán át enyhén rázatjuk.
A festék oldatot újra felhasználhatjuk, ezért egy üvegbe visszaöntjük, a gélre pedig 40 - 80 ml mosó oldatot (900 ml 50 v/v % metanol, 100 ml jégecet) öntünk. Szivacs darabkákkal a kimosás gyorsítható. A kimosás 3 - 5 órán át tart vagy egy éjszaka, és a művelet során a mosó oldatot kétszer, a szivacs darabkákat kétszer-háromszor lecseréljük.
A módszer 0.1 µg protein/sáv detektálást teszi lehetővé.

HÚSFELDOLGOZÓ ÜZEMEKBEN KELETKEZŐ KERATINTARTALMÚ HULLADÉK LEBONTÁSA MIKROBIOLÓGIAI ÚTON

A GYAKORLAT CÉLJA

Demostratív gyakorlat a napi aktuális problémák közül. Be szeretnénk mutatni egy olyan újonnan kifejlesztett illetve még jelenleg is fejlesztés alatt álló eljárást, amelynek során a húsipar által kibocsátott nagy mennyiségű keratin fehérjét tartalmazó hulladék mikrobiális eljárással feldolgozható.

Háttér

Az állati eredetű tollak, szőrök természetes úton nagyon lassú mikrobiális aktivitás eredményeképpen lebomlanak. A toll, szőr képletek stabilitását az azokat felépítő keratin szálak között kialakult kénhidak biztosítják. A baromfi feldolgozó üzemekben nagy mennyiségben keletkező hulladékot a természetes folyamatnál sokkal gyorsabban kell eltávolítani a környezetből, hiszen elhelyezése, tárolása gondot jelent.

A biológiai lebontáshoz megfelelő mikroorganizmust kellett találni, mely az üzemekből kikerülő tollat hatékonyan elbontja nagy mennyiségben is. A világ számos kutató intézetében foglalkoztak e probléma megoldásával. Elsősorban dermatofita gombákkal, és *Streptomycesekkel*, a tollat *Bacillus licheniformis* fajjal bontják több-kevesebb sikerrel. Sikerült izolálnunk egy mikroorganizmust, mely rövid adaptációs idő után képes a leforrázott tollat egy nap alatt elbontani

extracelluláris proteázai segítségével, és saját szaporodásához felhasználni a szerves anyagot. Hosszúkás, pálca formájú baktérium, mely kedvezőtlen körülmények között gömb formájú, mikroszkóp alatt látványos, fényes spórákat képez. Előnye, hogy már az inkubálás első napján elkezdi termelni keratinolítikus aktivitású extracelluláris proteázát.

A GYAKORLAT MENETE

A gyakorlat során bemutatjuk, hogy tollon (esetleg szőrön) felnevelt mikroorganizmusunk képes egy nap alatt szárig, míg két nap alatt szinte teljesen elbontani a toll darabokat (három nap alatt a szőrt is).

A kísérlet során a mikroorganizmust tápanyagdús (pepton, húskivonat) oldatban előneveljük. A hőkezelt tollat tartalmazó foszfátos oldatba (pH=8.0) inokuláljuk az előnevelt sejtek egy ml-ét. A kultúrát 43°C-on, 150 rpm sebességgel keverve növesztjük. Másnapra jól látszik a tollakon a változás, demonstrálva, hogy ilyen komplex összetett stabil struktúrák, mint a toll is bonthatóak mikrobiológiai módszerekkel. (Az intenzív növekedési szakaszban a kultúrához friss tolldarabokat (hőkezelt, nem hőkezelt) mérhetünk).

Az enzim jelenléte kimutatható enzimaktivitás méréssel a tápfolyadékból. A lecentrifugált sejtek felülúszóját használjuk, szubsztrátként pedig oldott keratint, ennek hiányában kazeint vagy bovine serum albumint (BSA). A reakcióelegy összemérése után 50-65°C közötti hőmérsékletet biztosítva, nyomonkövethető a fehérjetartalom változása 280 nm-en.

Enzimaktivitás mérés

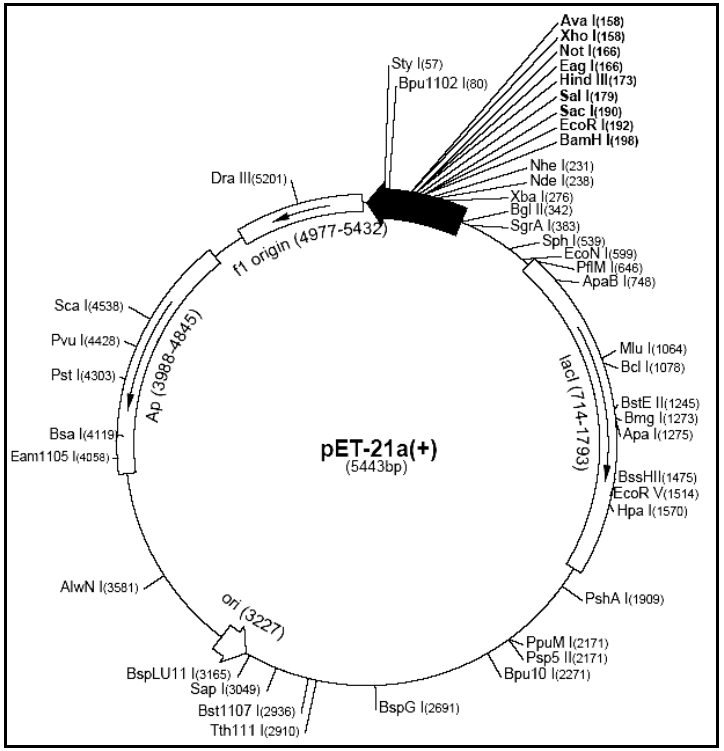
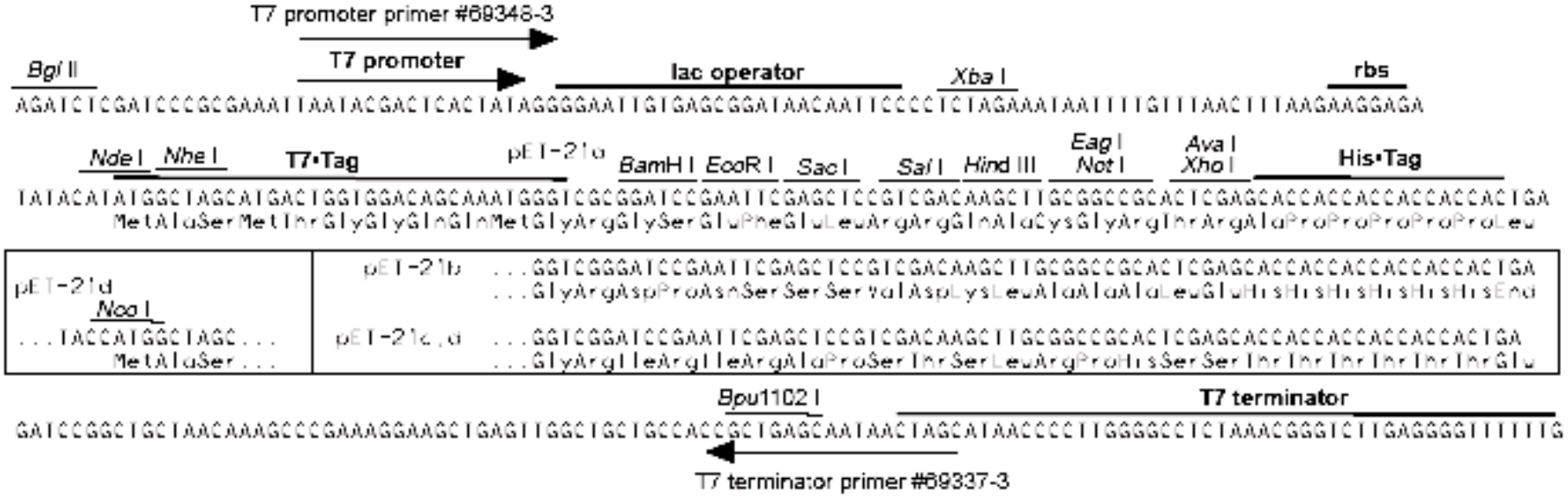
Agaróz lemez teszt: Különböző pH-jú, keratin tartalmú agaróz lemezekbe (2 %) kb. 5-6 mm átmérőjű lukakat fúrunk (a pH-t KH_2PO_4 (pH=4,05) és K_2HPO_4 (pH=9,12) pufferrel állítjuk be, a törzsoldatok megfelelő arányú keverékével 5 mM-os végkoncentrációban). A lukakba keratin tartalmú tápfolyadékon nevelt sejtek felülúszóját csepegtetjük. A lemezeket egy éjszakán át inkubáljuk 43°C-on. Az enzimaktivitást a lukak körüli feltisztulási zónák jelezik.

Poliakrilamid gélen: Fehérjével (1 mg/ml BSA, kazein, keratin) keresztkötött poliakrilamid gélelektroforézis: elkészítjük az akrilamid gélt a szokásos módon [lásd protokol . oldal], azzal a különbséggel, hogy az elegyhez még polimerizáció előtt hozzámérjük a fent említett fehérjék egyikét. A mintákat forralás nélkül mérjük a gél zsebeibe, az aktivitás megóvása érdekében. A futtatás után a gélt 50 ml 2.5 % Triton X-100 oldatban mossuk. A megmosott gélt 50 ml 0.1 M glicin-NaOH pH=8.3 oldatban min. 4 órát inkubáljuk, majd Coomassie Brillant Blue R-250 festékkel tesszük láthatóvá a gélben az el nem bontott fehérje hátteret. A nem specifikus festődést a színtelenítő oldattal távolítjuk el.

Fotometriás úton: A keratin tartalmú reakcióelegy fehérjetartalmának változását 280 nm-en mérjük, az enzimet tartalmazó oldat hozzáadását követően. Reakcióelegy összetétele: 5 mM foszfát puffer (pH=8.0), 0,5 ml 0,3 mg/ml-es keratin oldat, 0,2 mg/ml fehérjét tartalmazó enzimoldat 3 ml végtérfogatban.

A gyakorlatot *két részre* tagolva fogjuk elvégezni:

1. foglalkozás keretében először
- *indukáljuk a fehérje túltermelést* a gyakorlatvezetők által korábban leoltott és megfelelő töménységig növesztett baktériumokban (rövidebb indukció, 2 óra), valamint *leoltjuk* a másnapi kísérlethez szükséges *fehérje túltermelő* (2-2,5 óra) illetve *keratinbontó* (éjszakán át) baktériumtörzseket.
- a leoltást követően rövid *előadásban* ismertetjük a kísérletek elméleti hátterét (2 óra).
- az előadás után a frissen leoltott baktériumokon a fehérje túltermeltetéshez szükséges *éjszakán át tartó indukálást* (hosszabb indukció) is elindítjuk, majd ezt követően feltárjuk a rövid ideig indukált (2 óra) sejteket és eltesszük -20 C-ra.

2. foglakozás
- feltárjuk az *éjszakán át indukált* (hosszú indukció) sejteket, valamint megtekintjük a szintén egész éjszakán át tartó *keratinbontás* eredményét.
- előkészítés *fehérjegél* futtatáshoz: *futtató berendezés* összeszerelése, *akrilamid gél* elkészítése. Minták, marker előkészítése futtatáshoz. Mintafelvivés, és a *futtatás elindítása* (1.5-2 óra).
- minták futtatása alatt: *írásbeli felmérés*.
- gél szétszedése, *megfestése* (1-1.5 óra).

2. ábra. a pET vektorok felépítése