

Miskolci Egyetem

Kerpely Antal Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola



Ferrit-alapú mágneses nanorészecskék nukleinsav-izolálásban való alkalmazhatóságának vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Doktorjelölt:

Gerzsenyi Tímea

okleveles biotechnológus

Témavezető:

Dr. Szóri-Dorogházi Emma, PhD

A Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Mertinger Valéria, MTA doktora

Miskolc, 2026

Témavezetői ajánlás

Gerzsenyi Tímea doktori értekezése a ferrit-alapú mágneses nanorészecskék nukleinsav-izolálásban való alkalmazhatóságának vizsgálatát és az ehhez kapcsolódó módszertani fejlesztéseket mutatja be. A disszertáció a Miskolci Egyetem Kerpely Antal Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskolájában készült, az anyagtudomány, a nanotechnológia, valamint a molekuláris biológia határterületén végzett kutatómunka eredményeként.

A doktori munka során különböző összetételű és felületmódosítású ferrit-alapú mágneses nanorészecskék DNS- és RNS-izolálásban való alkalmazhatóságát vizsgálta, és részecskespecifikus eljárásokat dolgozott ki bakteriális eredetű nukleinsavak kinyerésére. Elemzései kiterjednek a különböző részecsketípusok összehasonlítására, valamint a kinyert nukleinsavak molekuláris biológiai felhasználhatóságának értékelésére is.

Az értekezésben bemutatott eredmények hozzájárulnak a ferrit-alapú mágneses nanorészecskék molekuláris biológiai alkalmazásának mélyebb megértéséhez, különösen a nukleinsavak reverzibilis kötődésének és szelektív elúciójának optimalizálásához. A kidolgozott módszerek potenciálisan alkalmazhatók diagnosztikai, bioanalitikai és biotechnológiai rendszerekben, ahol a gyors, centrifugálásmentes és automatizálható izolálási megoldások kiemelt jelentőséggel bírnak.

A dolgozat alapjául szolgáló tudományos eredmények 3 db Q1-es besorolású, referált nemzetközi folyóiratcikkekben jelentek meg. Ezek a közlemények közvetlenül kapcsolódnak a doktori kutatáshoz, és annak főbb megállapításait tartalmazzák. Emellett további nemzetközi folyóiratcikkek és egyéb publikációk is kötődnek a jelölt munkájához. Eredményeit több hazai és nemzetközi tudományos konferencián ismertette poszter- és szóbeli előadások formájában. A doktori képzés ideje alatt külföldi tanulmányutakon is részt vett, amelyek hozzájárultak szakmai ismereteinek bővítéséhez. A kutatócsoport tevékenységében oktatási és hallgatói mentorálási feladatokban is közreműködött.

A doktori képzés során a tanulmányi és kutatási követelményeket teljesítette. Az értekezésben bemutatott eredmények a jelölt önálló tudományos munkáját tükrözik.

A fentiek alapján meggyőződésem, hogy Gerzsenyi Tímea alkalmas önálló tudományos kutatómunkára, ezért sikeres védést követően javaslom számára a PhD fokozat odaítélését.

Dr. Szőri-Dorogházi Emma

Dr. Szőri-Dorogházi Emma

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	1
2.	Szakirodalmi áttekintés	4
2.1.	A mágneses nanorészecskék	4
2.1.1.	A mangán-ferrit és felhasználási lehetőségei	7
2.1.2.	A nikkelferrit és felhasználási lehetőségei	8
2.1.3.	A magnézium-ferrit és felhasználási lehetőségei	9
2.2.	A nukleinsavak.....	10
2.2.1.	A DNS felépítése és szerkezete.....	10
2.2.2.	Bakteriális genomi és plazmid DNS	11
2.2.3.	Az RNS felépítése és szerkezete	14
2.3.	A nukleinsavak kinyerésének alapelvei és kihívásai.....	15
2.4.	Mágneses nanorészecskékkel történő DNS- és RNS-kinyerés bakteriális sejtekből.....	16
2.5.	A nukleinsavak és nanorészecskék fiziko-kémiai kapcsolata	19
3.	Célkitűzések	21
4.	Anyagok és módszerek.....	22
4.1.	Felhasznált anyagok és eszközök.....	22
4.2.	Bakteriális sejtenyésztes folyamatok	22
4.3.	A $MnFe_2O_4$ MNP DNS-kötésének és a kötés reverzibilitásának vizsgálata	23
4.4.	Bakteriális pDNS-izolálási protokoll kidolgozása $MnFe_2O_4$ MNP-vel	24
4.5.	Bakteriális pDNS-izolálás $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel, és pDNS-izolálási hatékonyság vizsgálata a különböző szintézisidejű nanorészecskék esetén	26
4.6.	$NiFe_2O_4$ mágneses nanorészecskék pDNS-izolálásban való alkalmazhatóságának vizsgálata	26
4.7.	Extrakciós protokoll optimalizálása mindegyik vizsgált MNP-re	27
4.8.	A pDNS-izolálási hatékonyság kritériumai	28
4.9.	A nukleinsav-izolálást követő downstream folyamatok módszertani leírása	31
4.9.1.	Nukleinsav koncentrációjának meghatározása UV-Vis spektrofotometriával....	31
4.9.2.	Agaróz gélelektroforézis	32
4.9.3.	Restrikciós endonukleázokkal történő reakciók.....	33
4.9.4.	qPCR.....	33
4.9.5.	Bakteriális transzformálás	34
4.9.6.	pDNS-izolálás komplex biológiai mátrixból $MgFe_2O_4-NH_2$ mágneses nanorészecskékkel	34
4.10.	Statisztikai próbák	35

4.11.	Genomi DNS-izolálási protokoll aminocsoporttal ellátott $MgFe_2O_4$ mágneses nanorészecskékkel	35
4.11.1.	Az alkalmazott pufferek szerepe a mágneses nanorészecskékkel történő gDNS-izolálásban	37
4.12.	RNS-izolálási protokoll kidolgozása $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskékkel	38
4.12.1.	Az alkalmazott vegyszerek szerepe a nanorészecskékkel történő RNS-izolálásban	41
4.13.	Az extrahált RNS minták RT-PCR folyamata	41
4.13.1.	Reverz transzkripció (RT)	41
4.13.2.	Polimeráz lánreakció (PCR)	42
5.	Eredmények	43
5.1.	A $MnFe_2O_4$ MNP reverzibilis DNS kötési tesztje	43
5.2.	A $MnFe_2O_4$ MNP-vel történő pDNS-izolálás és annak optimalizálása	44
5.3.	Bakteriális pDNS-izolálás $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel, és a különböző szintézismódszerrel készült MNP-k DNS-izoláló hatékonyságának összehasonlítása	49
5.4.	A 6 tesztelt mágneses nanorészecskével ($MnFe_2O_4$, $MnFe_2O_4-NH_2$, $MgFe_2O_4$, $MgFe_2O_4-NH_2$, $NiFe_2O_4$, $NiFe_2O_4-NH_2$) történő pDNS-izolálás és a protokolloptimalizálás eredményei..	53
5.5.	A kiválasztott MNP-protokoll kombinációkból származó pDNS részletes kvantitatív és kvalitatív jellemzése	56
5.6.	A kinyert pDNS integritásvizsgálata restrikciós endonukleáz reakciók és qPCR alkalmazásával	59
5.7.	Az MNP-vel izolált pDNS bakteriális transzformálása	63
5.8.	pDNS-izolálás baktériumsejtekkel fertőzött humán vészérum mintából	64
5.9.	gDNS-izolálás eredményei: négy baktériumfajból származó extrakció aminoszulfonizált magnézium-ferritellel	65
5.9.1.	Az extrahált gDNS integritásának vizsgálata qPCR-rel	68
5.10.	A $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel végzett RNS-izolálás és RT-PCR eredményei	69
6.	Tézisek	72
7.	Összefoglaló	73
8.	Summary	75
9.	Köszönetnyilvánítás	77
10.	Szakirodalmi közlemények	78
11.	Hivatkozások	79
12.	Szakirodalmi jegyzék	80

1. Bevezetés

A DNS a sejt genetikai állományában tárolt információ elsődleges hordozója, míg az RNS ezen kódnak a funkcionális megvalósításában vesz részt: közvetíti az információt a fehérjeszintézishez (mRNS), valamint a fehérje-előállító apparátus szerkezeti és katalitikus elemeit alkotja (rRNS és tRNS). Ennek megfelelően a sejtekből izolált és tisztított nukleinsavak a modern élettudományok alapvető vizsgálati anyagai, mivel lehetővé teszik genetikai variánsok és génexpressziós mintázatok molekuláris szintű elemzését, kórokozók azonosítását, valamint a sejtműködéshez és anyagcsere-folyamatokhoz kapcsolódó mechanizmusok feltárását. A nukleinsav-alapú vizsgálatok egyben számos orvosbiológiai és ipari-biotechnológiai alkalmazás alapját is képezik.

A sejtek nukleinsav-tartalma jelentős mértékben függ a sejtípustól és az anyagcsere-állapottól, miközben e molekulák a teljes sejtömeghez viszonyítva csak kis hányadot képviselnek [1]. Ezzel szemben a sejtes környezetet nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben fehérjék, lipidek és egyéb makromolekulák alkotják. Ennek következtében a nukleinsavak tiszta állapotban történő kinyerése összetett feladat, amely során egyidejűleg kell biztosítani a kis mennyiségben jelenlévő nukleinsavak megőrzését, valamint a kísérő makromolekulák hatékony eltávolítását. A kinyert nukleinsavak minősége és mennyisége közvetlenül befolyásolja a downstream analitikai eljárások (például PCR-alapú amplifikáció, szekvenálás, klónozás vagy hibridizációs vizsgálatok) megbízhatóságát. A szennyező komponensek jelenléte gátolhatja az enzimes reakciókat, illetve torzíthatja az analitikai eredményeket, ezért a nukleinsavak tiszta és koncentrált előkészítése kulcsfontosságú lépés a molekuláris biológiai és géntechnológiai munkafolyamatokban.

A nukleinsav-izolálási módszerek fejlődése során számos klasszikus és korszerű technika vált elérhetővé. A hagyományosan alkalmazott fenol-kloroform extrakció során a sejtízist követően szerves oldószeres fázisszétválasztással különítik el a nukleinsavakat a fehérjéktől, majd az ezt követő alkoholos kicsapással a nukleinsavak nagy hozammal gyűjthetők össze, és a hosszú molekulák is megőrizhetők [2,3]. Az eljárás alkalmazása ugyanakkor jelentős egészségügyi és környezetvédelmi kockázatokkal jár: a fenol erősen toxikus és maró hatású [4], míg a kloroform humán karcinogénként van nyilvántartva, emellett neurotoxikus és hepatotoxikus hatással is rendelkezik [5]. Illékonyságuk miatt ezen vegyszerek fokozott munkavédelmi intézkedéseket és szigorú hulladékkezelést igényelnek, továbbá az eljárás nehezen automatizálható, ami nagy áteresztőképességű alkalmazásokban korlátozza használhatóságát.

A nukleinsav-tisztítás területén jelentős előrelépést hoztak az 1990-es évektől elterjedt szilika-alapú oszlopos extrakciós módszerek. A sejtfeltárást követően a nukleinsavakat olyan kémiai környezetbe hozzák, amely elősegíti a nukleinsavak foszfátváza és a szilícium-dioxid felület közötti kölcsönhatások kialakulását. Ennek eredményeként a célmolekulák a szilika membránhoz kötődnek, míg a szennyező komponensek eltávolíthatók, majd mosási és eluálási lépések révén nagy tisztaságú DNS vagy RNS nyerhető vissza [3]. A módszer gyors és egyszerű, ugyanakkor a kereskedelmi készletek (kitek) költségesek lehetnek [6], bizonyos esetekben – különösen kis méretű nukleinsavak (például miRNS-ek (mikro RNS-ek)) esetén – hozamvesztéssel járhatnak [7], valamint nagy mintaszám párhuzamos feldolgozásához speciális eszközök, például vákuummanifold alkalmazása szükséges.

A legkorszerűbb megoldások közé sorolhatók a mágneses részecskéken alapuló nukleinsav-izolálási módszerek [8]. Ezek paramágneses, jellemzően vas-oxid alapú nanorészecskéket alkalmaznak, amelyek felszínét nukleinsav-megkötésre alkalmas réteggel, például szilikával vagy funkcionizált polimerekkel látják el. Megfelelő kémiai feltételek (azaz meghatározott összetételű pufferoldatok alkalmazása) mellett a DNS és RNS molekulák a részecskék felszínéhez kötődnek, majd külső mágneses tér segítségével gyorsan és hatékonyan elválaszthatók a folyadékfázistól. A centrifugálási lépések elhagyása, a rövid feldolgozási idő és az egyszerű automatizálhatóság hozzájárult ahhoz, hogy ezek a technikák széles körben elterjedjenek, például a SARS-CoV-2 vírus RNS-ének nagyléptékű diagnosztikai vizsgálataiban is alkalmazhatóak voltak [9–11].

A mágneses nanorészecskék izolálási teljesítményét alapvetően a részecskék fizikai-kémiai tulajdonságai határozzák meg. A nukleinsavak megkötése jelentősen fokozható például a felület funkcionizálásával, amelynek során a kötés erősségét és szelektivitását a jelenlévő funkcionális csoportok jellege és töltésállapota szabja meg. Aminocsoportokkal módosított felületek esetén savas pH-n az aminocsoportok protonált formában vannak jelen, ami kedvező elektrosztatikus kölcsönhatást eredményez a nukleinsavak polianionos foszfátvázával. Ugyanakkor a részecskék kémiai összetétele és felületi módosítása a diszperziós stabilitást, az aggregációs hajlamot és ezáltal az izolálási folyamat reprodukálhatóságát is befolyásolja, ami részecskespecifikus eljárások kidolgozását teszi szükségessé.

A jelen disszertáció célja ferrit-alapú mágneses nanorészecskék és nukleinsavak közötti kölcsönhatások részletes vizsgálata, valamint ezen rendszerek nukleinsav-izolálási alkalmazhatóságának feltárása és optimalizálása. A doktori kutatás középpontjában olyan mágneses nanorészecske-alapú eljárások fejlesztése állt, amelyek a nukleinsavak hatékony,

szelektív és reprodukálható kinyerését teszik lehetővé, különös tekintettel a modern molekuláris biológiai és diagnosztikai alkalmazások minőségi- és mennyiségi igényeire.

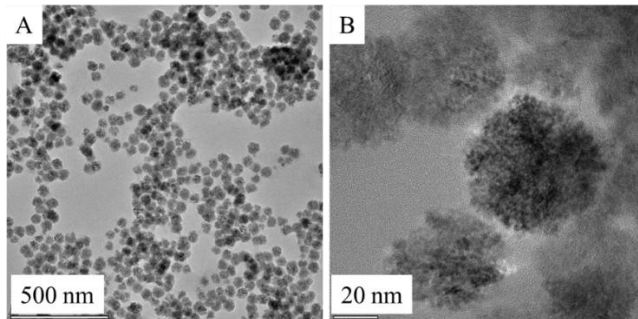
A munka során hat, eltérő kémiai összetételű és felületi funkcionizáltságú ferrit-alapú mágneses nanorészecske (MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$) került vizsgálatra. Az elemzés kiterjedt a részecskék felületi tulajdonságainak és diszperziós viselkedésének, valamint az alkalmazott kémiai környezetnek a nukleinsav-megkötést és -eluálást befolyásoló szerepének értékelésére, melynek eredményeként részecskespecifikus izolálási eljárások kidolgozása vált lehetővé.

A fejlesztett módszerek bakteriális eredetű nukleinsavakon kerültek alkalmazásra, beleértve plazmid DNS (pDNS), genomi DNS (gDNS) és teljes RNS izolálását. Az eljárások értékelése a kinyert nukleinsavak mennyiségi és minőségi jellemzőinek vizsgálatán, valamint downstream molekuláris biológiai módszerekben való alkalmazhatóságuk elemzésén alapult. A disszertáció felépítése ennek megfelelően először a vizsgált mágneses nanorészecskék általános jellemzését mutatja be, majd az izolálási eljárások optimalizálásának kísérleti tapasztalatait tárgyalja, végül pedig értékeli a módszerek alkalmazhatóságát különböző nukleinsav-típusok esetén. A bemutatott eredmények hozzájárulnak a mágneses nanorészecskéken alapuló nukleinsav-izolálási technikák mélyebb megértéséhez és továbbfejlesztéséhez.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A mágneses nanorészecskék

A mágneses nanorészecskék (MNP) a nevükből adódóan kettős tulajdonsággal rendelkező anyagok. Egyrészt mágnesezhetők, amely megkönnyíti elválasztásukat különböző közegektől, másrészt pedig nanoméretűek, vagyis átmérőjük (melynek mérete szabályozható) 1 és 100 nm közé esik (1. ábra), azonban a bevonatolás miatt a hidrodinamikai átmérő esetenként meghaladhatja a 100 nm-t. A nanorészecskék mérete olyan dimenziót jelent, amely összehasonlítható egy vírus (20–450 nm), egy fehérje (5–50 nm) vagy egy génszekvencia (2 nm széles és 10–100 nm hosszú) méretével [12]. Ez azt jelenti, hogy a mágneses nanorészecskék méretükből adódóan közvetlen kölcsönhatásba léphetnek a vizsgálat tárgyát képező biológiai entitásokkal. A nanoméret egyik legfontosabb következménye a nagy fajlagos felület: minél kisebbek a részecskék, annál nagyobb fajlagos felülettel rendelkeznek [13], ami lehetővé teszi különböző molekulák, például nukleinsavak adszorpcióját a felületükön. A nanométeres mérettartomány további előnye a gyors diffúzió, amely kedvező kölcsönhatási és kötődési kinetikát biztosít, ezáltal elősegítve a biomolekulák hatékony kapcsolódását a felszínhez [13].



1. ábra. A jelen kutatás alapjául is szolgáló egyik, $MgFe_2O_4-NH_2$ mágneses nanorészecske nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópos (HRTEM) felvétele 500 nm (A), illetve 20 nm-es nagyításban (B) [14]

A mágneses nanorészecskék kémiai felépítésüket tekintve három csoportba sorolhatók: fémes MNP-k (pl. vas, kobalt, nikkal) [15], fém-oxid MNP-k (pl. ferritek, vas-oxidok) [16] és ötvözet MNP-k (pl. FeCo) [17]. A ferritek olyan fém-oxidok, amelyek általános képlete AB_2O_4 , ahol A kétértékű-, B pedig háromértékű kation. Egyik fontos alcsoportjukat a spinell ferritek alkotják, amelyek köbös kristályszerkezetűek, és nevüket a természetben előforduló $MgAl_2O_4$ spinell ásványhoz való szerkezeti hasonlóságukról kapták. A spinell ferritek egyedülálló mágneses és elektromos tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért felhasználásuk széleskörű, többek között MRI kontrasztanyagként, sejtjelölésben, rákterápiában és

környezetvédelmi alkalmazásokban [18]. Szerkezetileg általános képletük AFe_2O_4 , ahol a vas Fe^{3+} formában van jelen, míg a kétértékű kation (A) lehet vas, nikkelt, cink, kobalt, mangán, magnézium, réz vagy kadmium [19,20].

A mágneses nanorészecskék mágneses viselkedésük alapján tovább osztályozhatók ferro-, para-, dia-, antiferro- és ferrimágneses anyagokra. A paramágneses anyagokban, például vas(III)- (Fe^{3+}), mangán(II)- (Mn^{2+}) vagy gadolínium(III)-ionokat (Gd^{3+}) tartalmazó rendszerekben, a párosítatlan elektronokkal rendelkező ionok nettó mágneses momentummal rendelkeznek, amely külső mágneses tér hatására orientálódik [21]. A tér megszűnését követően azonban a mágneses momentumok rendezetlenné válnak, így nem marad fenn makroszkopikus mágnesezettség.

A molekuláris biológiai és bioanalitikai elválasztási eljárásokban leggyakrabban alkalmazott, és a jelen kutatás szempontjából is releváns mágneses nanorészecskék ezzel szemben szuperparamágneses viselkedést mutatnak. Ezek jellemzően ferro- vagy ferrimágneses eredetű, vas-oxid alapú nanorészecskék, például magnetit (Fe_3O_4) vagy maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$), illetve megfelelő mérettartományban vas-, kobalt- vagy nikkelt-alapú részecskék [14]. A szuperparamágneses nanorészecskék egyetlen mágneses doménből állnak, és külső mágneses térben úgy viselkednek, mintha egyetlen nagy mágneses dipólust alkotnának. Ennek következtében a külső tér hatására jelentős mágneses momentummal reagálnak, ugyanakkor a mágneses tér megszűnését követően nem mutatnak remanens mágnesezettséget [22]. Ez a tulajdonság különösen fontos a nukleinsav-izolálási eljárások során, mivel a szuperparamágneses részecskék külső mágneses tér alkalmazásával gyorsan és hatékonyan összegyűjthetők, majd a mágnes eltávolítása után ismét stabil kolloid szuszpenziót alkotnak, lehetővé téve a mosási lépések és az ismételt felhasználás egyszerű kivitelezését.

A szuperparamágneses viselkedés kialakulásának feltétele, hogy a nanorészecskék mérete kellően kicsi legyen ahhoz, hogy egyetlen mágneses domént alkossanak, valamint, hogy a mágneskristályos anizotrópia energiája összemérhető legyen a termikus energiával [22]. A mágneses anizotrópia azt fejezi ki, hogy a részecskében a mágnesezettség kialakulása és irányváltóztatása nem minden irányban azonos energetikai feltételek mellett történik: bizonyos kristálytani irányok mentén a mágneses momentum stabilabban rendeződik, míg más irányokban könnyebben elfordul. Amennyiben ez az irányfüggő stabilizáló hatás gyenge a hőmozgás energiájához képest, a mágnesezettség a külső mágneses tér megszűnése után nem marad fenn, ami a szuperparamágneses viselkedés alapfeltétele. Tipikus vas-oxid alapú szuperparamágneses nanorészecskék (SPION-ok) esetén ez a feltétel általában 5–

20 nm mérettartományban teljesül, ahol a koercitivitás gyakorlatilag nulla, és a mágneses szeparáció reverzibilis [23,24].

A mágneses nanorészecskék karakterizálása kiemelt fontosságú, hiszen fizikai, kémiai és mágneses tulajdonságaik meghatározzák, hogy milyen területen használhatók fel [25]. Röntgendiffrakcióval (XRD) meghatározható a kristályrács típusa és a fő fázisaik (pl. magnetit, maghemit) jelenléte [26]. A Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR) megmutatja a kémiai kötések, a funkciós csoportokat, ezáltal a felületi módosításokat, bevonatokat. A nanorészecskék mérete és méreteloszlása, illetve morfológiája megállapítható transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) [27]. A vibrációs mintamagnetométer (VSM) segítségével vizsgálható a részecskék mágneses tulajdonsága (mágneses szaturáció, koercitivitás, remanencia), zéta-potenciál méréssel pedig a kolloidstabilitásuk [14].

A nanorészecskék felülete funkcionálizálható különböző anyagokkal, jellemzően kovalens vagy nemkovalens módon, például polimerláncok, szilícium-dioxid bevonatok vagy egyszerű funkciós csoportok (például amino- vagy karboxilcsoportok) alkalmazásával, ami célzott kölcsönhatásokat, fokozott kolloidstabilitást és jobb biokompatibilitást eredményez [28,29]. A felületi tulajdonságok különösen meghatározóak a nukleinsav-megkötés szempontjából: a DNS- és RNS molekulák negatív töltése miatt a pozitív felületek erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki velük [30], míg negatív vagy kezeletlen felületek esetén a kötődés jellemzően csak magas sókoncentráció mellett, ionhidak közvetítésével valósul meg [31,32]. A felületmódosítás egyúttal megakadályozza a bevonat nélküli, ferromágneses Fe₃O₄ szemcsék agglomerációját, amely egyébként csökkentené a fajlagos aktív felületet és az adszorpciós hatékonyságot [33].

Az eddig felsorolt tulajdonságok révén a mágneses nanorészecskék számos területen alkalmazhatók, többek között az elektrokémiában, anyagtudományban, biokémiában, molekuláris biológiában, orvostudományban és a környezetvédelemben [34]. Környezetvédelmi alkalmazásuk lehetővé teszi például különböző szennyezőanyagok eltávolítását vizes közegből; ilyen esetekben huminsavval funkcionalizált MNP-eket alkalmaztak nehézfémek megkötésére [35]. Az orvostudományban a kutatók felhasználják a nanorészecskéket biomolekulák (pl. antitestek, enzimek) immobilizálására is [36], továbbá szerepet játszanak a célzott gyógyszerbevitelben és a betegségek korai diagnosztikájában [13].

A fenti alkalmazások szempontjából nemcsak a részecskeméret és a mágneses viselkedés típusa meghatározó, hanem az alkalmazott anyagi összetétel is. A biológiai alkalmazásokban

leggyakrabban magnetit- és maghemit-alapú részecskéket használnak, de más spinell ferritek (MFe_2O_4 ; $M = Mn^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}$) is alkalmasak lehetnek. A különböző kationok jelenléte módosítja a telítési mágnesezettséget és az anizotrópiát, ami lehetőséget ad a mágneses viselkedés finomhangolására [37,38]. Az optimális összetétel és részecskeméret kiválasztása ezért alapvető fontosságú a nukleinsav-izolálás hatékonysága szempontjából [26].

A jelen kutatás középpontjában a mágneses nanorészecskék molekuláris biológiai alkalmazása áll, különös tekintettel a nukleinsavakhoz való reverzibilis kötődésük kihasználására.

2.1.1. A mangán-ferrit és felhasználási lehetőségei

A mangán-ferrit ($MnFe_2O_4$) spinell ferrit típusú mágneses nanorészecske, amelyet a szakirodalomban az egyik legígéretesebb ferrit-alapú rendszerként tárgyalnak [39]. Ennek megfelelően alkalmazási lehetőségei széles körben ismertek és kísérletileg igazoltak. Környezetvédelmi alkalmazásként például mezőgazdasági hulladékból előállított bioszenet módosítottak $MnFe_2O_4$ -tel koprecipitációval, majd azt adszorbensként használták réz(II)-ionok eltávolítására. A rendszer több tisztítási cikluson keresztül is újra felhasználhatónak bizonyult [40]. Orvosbiológiai területen $MnFe_2O_4$ -alapú rendszereket vizsgáltak gyógyszeradagolásban [41], mágneses rezonancia képalkotásban kontrasztanyagként, valamint mágneses hipertermián alapuló rákterápiás alkalmazásokban [42,43].

Az *in vivo* rákdiagnosztikai és -terápiás alkalmazások miatt a $MnFe_2O_4$ esetében a citotoxicitás vizsgálata kiemelt jelentőségű. Ilyen körülmények között a nanorészecskék közvetlenül sejtes környezetbe kerülhetnek, és a sejtekben, különösen a tumorsejtek savas mikrokörnyezetében, a nanorészecskékből felszabaduló vas-ionok oxidációs reakción keresztül reaktív szabadgyökök képződését eredményezik. Ezek a folyamatok különböző biomolekulák (például nukleinsavak, enzimek) működésének megváltozását vagy gátlását okozzák [42,43].

A fenti példák alapján a $MnFe_2O_4$ nanorészecskék alkalmazási területe környezetvédelmi és orvosbiológiai irányban kifejezetten széles, ugyanakkor (bakteriális) nukleinsav-izolálásban való, célzott felhasználásukra vonatkozó irodalmi adatok hiányosak vagy csak elszórtan állnak rendelkezésre, ami a tématerület feltáratlanságára utal.

2.1.2. A nikkelferrit és felhasználási lehetőségei

A nikkelferrit (NiFe_2O_4) is spinell ferrit alapú mágneses nanorészecske, amelyhez a szakirodalomban több, egymástól eltérő alkalmazási irány kapcsolódik.

Bioanalitikai felhasználásként grafén-oxid–nikkelferrit–kitozán nanokompozit rétegeket állítottak elő, amelyeket elektrokémiai génszenzorként alkalmaztak. A szenzoron rögzített DNS szekvencia komplementere volt az *Escherichia coli* baktériumban megtalálható egyik specifikus génszakasznak, amely ily módon lehetővé tette a baktérium azonosítását [44]. Egy másik kutatásban bemutatták, hogy a nikkelferrit bevonatú elektrokémiai grafit elektród felület egyszálú DNS (ssDNS), kétszálú DNS (dsDNS) és egyszálú RNS (ssRNS) megkötésére is képes volt az elektrosztatikus kölcsönhatások révén [45].

A NiFe_2O_4 zöld szintézisével kapcsolatosan is több tanulmány született. Egy kutatásban a közönséges vízijácint (*Eichhornia crassipes*) vizes kivonatát alkalmazták redukáló és stabilizáló ágensként, amely komplexálta a Ni^{2+} - és Fe^{3+} -ionokat, majd alacsony hőmérsékletű hőkezelést követően spinell szerkezetű NiFe_2O_4 nanorészecskék keletkeztek. A nikkelferrit MNP-eket *Klebsiella sp.* fermentációjához adagolva javítani lehetett a baktériumok szubsztrát-konverzióját, és ezáltal fokozódott a lignocellulóz-hidrolizátumból történő biohidrogén-termelés [46]. Egy másik érdekes közleményben arról számoltak be, hogy ha a *Chlorella variabilis* zöldalgából izolált zsírsav-fotodekarboxiláz enzimet NiFe_2O_4 nanorészecskékre immobilizálták, az enzim stabilabban működött, mint szabad állapotban, és így az enzim által katalizált pentadekán-termelés hatékonysága javult [47].

A NiFe_2O_4 szennyvíztisztításban való felhasználására is található példák: kristályibolya vízből való eltávolítását vizsgálták, és kimutatták, hogy a festék hatékonyan adszorbeálódott a nikkelferrit nanorészecskék felületén [48].

Orvosbiológiai alkalmazások esetén, az aggregáció csökkentése és a biokompatibilitás javítása érdekében, lipid kettősréteggel bevont vagy liposzómába zárt NiFe_2O_4 nanorészecskéket javasoltak tumorelleses gyógyszerhordozók és hipertermia-ágensek célba juttatására, mágneses térrel támogatott irányítással [49]. A tumorterápián túl paraziták elleni *in vitro* alkalmazást is vizsgáltak: *Leishmania major* tenyészetek esetében NiFe_2O_4 jelenlétében a paraziták túlélési aránya jelentősen csökkent [50].

Mivel a nikkelferrit több tanulmányban is *in vivo* alkalmazásokhoz (különösen MRI irányú fejlesztésekhez) kapcsolódik, a citotoxicitás vizsgálata itt is releváns volt [51]. Humán vörösvértesteken és perifériás mononukleáris vörösvérsejteken végzett vizsgálatok során toxikus hatást és fokozott oxidatív stresszt figyeltek meg, amit nyulakon végzett állatkísérletekkel is

igazoltak [52,53]. További tanulmányok szerint a NiFe_2O_4 csökkentheti a humán epitheliális (tüdő- és bőr-) sejtek, valamint daganatos (máj-, mell- és tüdő-) sejtvonalak életképességét is [18,54–56].

Bár a nikkelferrit bioszenzoros rendszerekben nukleinsavak megkötésére és detektálására alkalmasnak bizonyult [44,45], a nukleinsav-izolálásban való felhasználása eddig nem tartozott a vizsgálatok fókuszába.

2.1.3. A magnézium-ferrit és felhasználási lehetőségei

A magnézium-ferrit (MgFe_2O_4) szintén spinell ferrit típusú MNP, amelyet a szakirodalomban elsősorban orvosbiológiai alkalmazásokban (például mágneses hipertermia ágens), valamint fotokatalitikus aktivitása miatt vizsgáltak [57].

Ehi-Eromosele és munkatársai a MgFe_2O_4 antimikrobiális hatását agar diffúziós módszerrel vizsgálták, és megállapították, hogy egyes baktériumfajokkal szemben (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*), hatásos lehet, míg más mikroorganizmusoknál (*M. varians* és *B. subtilis* baktériumokra, valamint a *C. albicans* és *A. flavus* gombafajokra) nem mutatott aktivitást [58]. A baktericid hatás mechanizmusa nem teljes mértékben tisztázott, de feltételezik, hogy a nagy felület/térfogat arányból adódó fokozott részecske-mikroba kontaktus, valamint az oxidatív stresszhez kapcsolódó szabadgyök-képződés is szerepet játszik [59].

Ahogy a korábbi nanorészecskéknél is láttuk, a ferrit rendszerek esetén képződési és biokompatibilitási összefüggésekben a sejtes válaszokat (például gyulladási jeleket) is vizsgálják [60]. A MgFe_2O_4 citotoxicitását több tanulmány elemezte, és az eredményekből az derült ki, hogy a részecskék eltérő sejtkárosító hatással bírnak a különböző típusú sejtekben (pl. L-929 vagy egér aerola fibroblaszt sejtvonalak esetén). Ennek hátterében az állhat, hogy bizonyos sejtek jobban tűrik a szabadgyökök termelődését és sejtekbe való bejutását, mint más sejt típusok [61–64]. A magnézium-ferrit MNP-k felületmódosításának szerepe citotoxicitási szempontból is hangsúlyos, hiszen kimutatták, hogy például az arannyal bevont MgFe_2O_4 kevésbé volt toxikus, mint a nem burkolt változata [61].

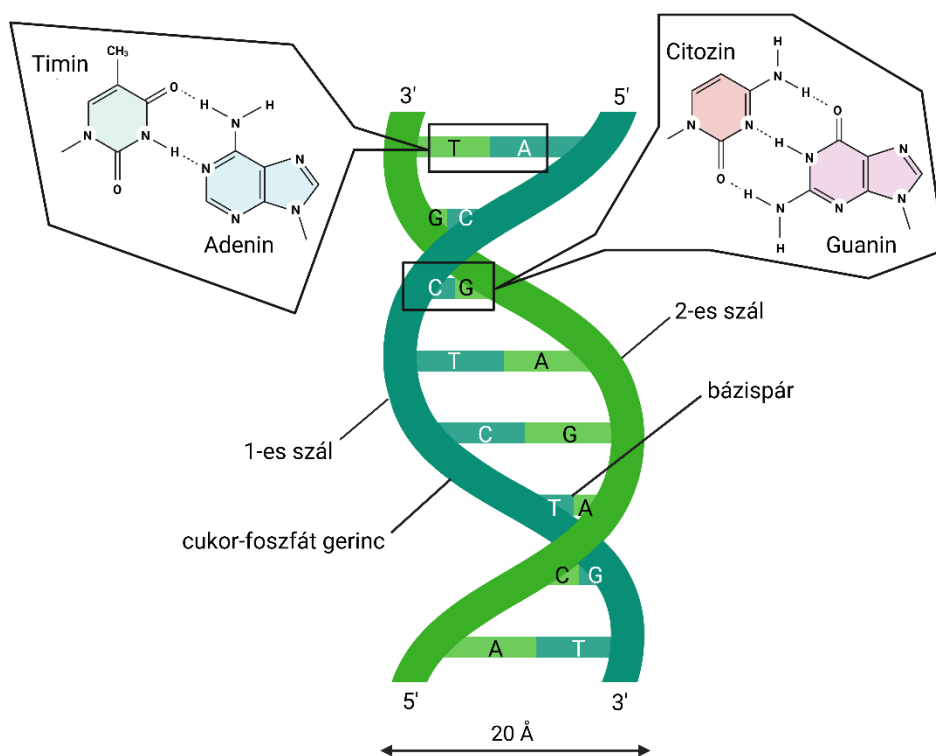
Bár a MgFe_2O_4 alkalmazási lehetőségeit a szakirodalom széles körben tárgyalja, a nukleinsavakkal – különösen a DNS-sel – kialakított kölcsönhatásainak, illetve nukleinsav-izolálási potenciáljának átfogó, rendszerszintű feldolgozása a szakirodalomban jelenleg hiányos, ami a tématerület további vizsgálatának indokoltságát jelzi [6,14].

2.2. A nukleinsavak

2.2.1. A DNS felépítése és szerkezete

A DNS, mint örökítőanyag lehet lineáris – kromoszómákba rendeződött, végén telomerekkel (eukarióták genomi DNS-e) [65] – vagy cirkuláris. Ez utóbbi forma jellemző leggyakrabban a prokarióták genomjára [66], valamint ezekben az élőlényekben előforduló plazmidokra is [67]. Ezenkívül az eukarióták mitokondriális DNS-e általában szintén cirkuláris, míg a kloroplasztisz DNS-e minden esetben ilyen szerkezetű [68].

Függetlenül attól, hogy eukarióta vagy prokarióta, a DNS-re általánosan jellemző, hogy nukleotidokból épül fel (egy nukleotid három komponensből áll: egy foszfát-csoportból, egy nukleobázisból és egy pentóz molekulából). A DNS nukleotidjainak sorrendje (szekvenciája) hordozza az élőlényt alkotó sejtek működésére vonatkozó teljes biológiai információt. Több, mint 70 évvel ezelőtt Watson és Crick megjelentettek egy publikációt a DNS struktúrájáról, amelyben kihangsúlyozták két fő jellemzőjét: a nukleobázisok komplementaritását a két DNS szálon, valamint a polimer duplahelikális voltát [69] (2. ábra).



2. ábra. A DNS dupla hélix szerkezete és felépítése

A DNS molekula alapvetően két részre osztható: a cukor-foszfátgerincre és az oldalcsoportokra. A cukor-foszfátgerinc felváltva 2-dezoxi-D-ribóz molekulákból és foszfátcsoportokból áll, amelyek szabályos, 3',5'-foszfodiészter kötések révén kapcsolódnak össze. Az oldalcsoportokat purin- vagy pirimidinbázisok alkotják, amelyek

közül minden egyes cukorhoz csak egy bázis kapcsolódik. A DNS felépítésében két purin, az adenin (A) és a guanin (G), valamint két pirimidin, a citozin (C) és a timin (T) bázis vesz részt. A bázis és a pentóz glikozidos kapcsolata nukleozidot eredményez, amelyben a cukorkomponens dezoxiribóz, furanóz formában. A dezoxiribóz N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a pirimidin-nukleozidok esetében az N₁-, míg a purin-nukleozidok esetében az N₉-atomhoz. A DNS két láncát hidrogénkötések tartják össze a nitrogéntartalmú, heterociklusos bázisok között, amelyek a bázispárosodási szabályt követve kapcsolódnak egymáshoz: az adenin kizárólag a timinnel tud kapcsolódni, két hidrogénhidat alkotva, míg a citozin csak a guaninnal, három hidrogénhidat képezve. Ezek a kötések erősen irányított jellegűek, a molekula másodlagos szerkezetét stabilizálják, és a bázisok síkjában képesek kialakulni [70]. A különböző DNS molekulák bázisösszetétele széles határok között változhat, de a kettős szálú DNS-ben az adenin-timin (A:T), valamint a citozin-guanin (G:C) aránya megközelítőleg 1:1. A DNS két szála egymáshoz képest antiparallel, vagyis párhuzamos lefutásúak, de ellentétes irányultságúak. Ez a két lánc egymásra csavarodik és így adja a molekula kettős spirál jellegét (2. ábra) [69]. A DNS – az RNS-sel szemben – a kettős szálú szerkezete miatt, nagy fiziko-kémiai stabilitással és jelentős mechanikai rigiditással rendelkezik [71].

2.2.2. Bakteriális genomi és plazmid DNS

A dolgozatban bemutatott kísérleti rendszerhez igazodva elsősorban a bakteriális sejtekben megtalálható DNS két, funkcionálisan eltérő típusának, a genomi és a plazmid DNS-nek a bemutatására kerül sor. E két DNS típus nemcsak biológiai, hanem izolálástechnikai szempontból is különböző tulajdonságokkal rendelkezik, mivel eltérő méret és kópiaszám jellemzi őket (3. ábra).

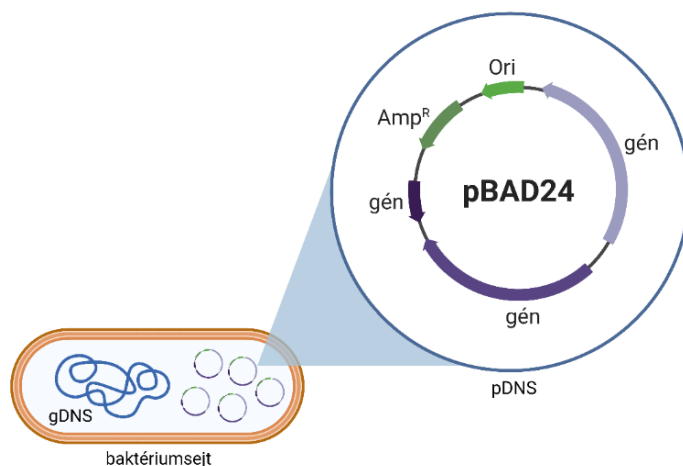
A prokarióta gDNS nagy molekulatömegű és komplex szerkezetű biomolekula, amely funkciójából adódóan izolálási körülmények között mechanikailag sérülékenyebb, mint a kisebb, cirkuláris pDNS. Komplexitása kémiai összetételével is magyarázható, mely tartalmaz kisebb mennyiségben társult fehérjéket (hisztionszerű fehérjék), kétértékű kationokat (pl. Mg²⁺), és egyéb kis molekulákat (pl. vízmolekulák), amelyek befolyásolhatják az oldhatóságot és a molekula térszerkezetét [72]. Mindezen természetes asszociációk, bár elengedhetetlenek a DNS funkciójához a sejtben, izolálási körülmények között problémát jelenthetnek.

A genomi DNS izolálása során jellemzően nagy méretű, alacsony kópiaszámú DNS-frakció kinyerése a cél. Ezen folyamat során azonban gyakran juthatnak szennyezések az

extraktumba, például RNS, fehérjék, poliszacharidok vagy fenol vegyületek formájában, amelyek gátolhatják az enzimek működését és torzíthatják az analitikai eredményeket [73]. A hatékony extrakció célja olyan, nagy molekulatömegű, tiszta DNS kinyerése, amely mentes az inhibitoroktól, és megőrzi a genomi szerkezet integritását [74]. A megbízható gDNS-izolálás különösen fontos a klinikai diagnosztikában, a kriminalisztikában, valamint a genetikai módosítások során, mivel a minták minősége közvetlenül befolyásolja a kísérletek reprodukálhatóságát és az adatok megbízhatóságát [75]. A genomi DNS emellett alapvető kiindulási molekulaként szolgál a környezeti mikrobiológiai vizsgálatokban is, például biodegradációs folyamatok elemzésében, a mikrokörnyezet genetikai sokféleségének feltárásában és fajok azonosításában [76,77].

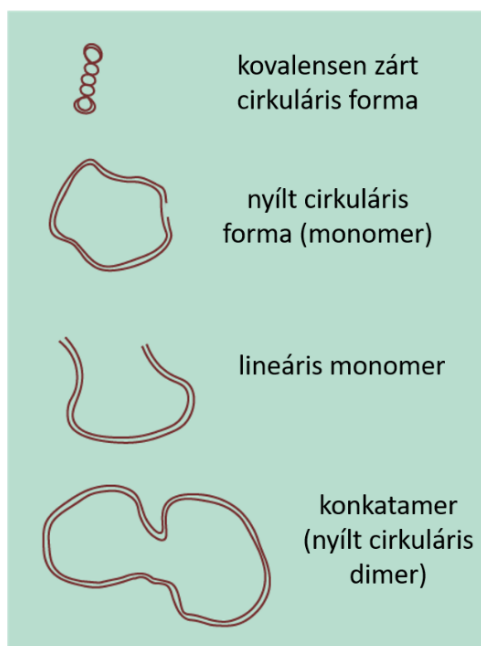
A gDNS izolálása során nemcsak a kémiai szennyezők, de a polimer fizikai darabolódása is problémát jelenthet. Bár a DNS stabil vegyület, azonban izolálása során, ha nem dolgozunk elég óvatosan, hosszabb-rövidebb fragmentumokra töredezhethet [78]. A DNS extrakcióját követően az izolált biomolekulát, mint terméket, downstream eljárásokban, esetleg preparatív célokra használhatják fel. Így a szerkezetileg ép molekula kinyerése elengedhetetlen.

A bakteriális sejtekben megtalálható plazmid DNS kisebb méretű, önállóan replikálódó, extrakromoszomális genetikai elem, amely egy sejten belül gyakran több kópiában van jelen. A plazmidok általában olyan géneket kódolnak, amelyek csak bizonyos környezeti feltételek mellett expresszálódnak, ugyanakkor a gazdasejt alapvető növekedéséhez standard körülmények között nem szükségesek [52]. Kivételt képeznek ez alól a plazmid fennmaradásához szükséges gének – például a replikációt és szegregációt biztosító *rep* és *par* gének –, amelyek rendszerint konstitutívan expresszálódnak [79,80]. Tipikus példa egy plazmidon található génre az antibiotikum-rezisztencia gén (3. ábra), amely lehetővé teszi, hogy az azt hordozó baktériumok egy vagy több antibiotikummal szemben ellenállóvá váljanak [81]. A rezisztencia a pDNS replikációja révén az utódsejtekre is átöröklődik, továbbá egyes plazmidok esetében horizontális géntranszfer útján más baktériumsejteknek is átadható [82].



3. ábra. Baktériumsejt örökítő anyagai: gDNS és pDNS (kinagyítva egy pDNS sematikus ábrája, melyen egy ampicillin rezisztanciáért felelős gén (Amp^R) és a replikációs origó (Ori) látszódik)

A plazmid DNS különböző topológiai formákban fordulhat elő. Jellemzően megkülönböztethető a **szuperhelikális** (kovalensen zárt cirkuláris) forma, amelyben a cirkuláris, kettős szálú DNS még inkább felcsavart állapotban van, **nyílt cirkuláris**, amely egyetlen szál megszakadásának következtében alakul ki, valamint a **lineáris**, amelynél a DNS mindkét szála ugyanazon a ponton megtörik, így a molekula linearizálódik (4. ábra).



4. ábra. A pDNS négy topológiai formája

In vivo körülmények között a pDNS jellemzően tömör, szuperhelikális állapotban van jelen, egyrészt a kompaktabb térkitöltés biztosítása érdekében, másrészt pedig azért, mert ez az állapot befolyásolja a transzkripciót, a replikációt és a DNS-fehérje kölcsönhatásokat [83]. A laboratóriumban azonban, óvatos preparálás mellett is megtörténik, hogy bizonyos pDNS molekulák egyik szálán törés alakul ki. Mivel ez a törés csak az egyik szálon található, a

molekula még cirkuláris marad, de a kialakult hézag hatására megszűnik a topológiai kényszer, ami lehetővé teszi az extrafeltekeredés kilazulását és a foszfodiészter gerinc szabad rotációját a törési pont körül. Ez nyílt cirkuláris formát eredményez, mely formák összekapcsolódhatnak és **konkatamert** (nyílt cirkuláris dimert vagy akár trimert) formálhatnak (4. ábra). Emellett a konkatamer forma lehet rekombinációs események, ligálás vagy replikációs hibák következménye is [84].

A pDNS molekulák törése az izolálási folyamatban a sejtlízis vagy a genomi DNS eltávolításának lépésében történhet. Ennek következtében az említett topológiai formák mindegyike benne lehet egyazon preparált pDNS mintában. A kovalensen zárt cirkuláris DNS annyira tömör, hogy sokkal könnyebben áthalad az agaróz gél pórusain, míg a nyílt cirkuláris, illetve lineáris formák – bár bázispárjaik száma megegyezik a kovalensen zárt formáéval – nagyobb ellenállást mutatnak a pórusokkal szemben, ezért rövidebb utat tesznek meg a térhálós szerkezetben. Mindez az agaróz gélelektroforézis során komplex sávmintázat kialakulásához vezethet [85]. Így elmondható, hogy az agaróz gélelektroforézis során megfigyelt sávmintázat nem csupán a DNS mennyiségéről, hanem a pDNS topológiai állapotáról is információt szolgáltat.

A pDNS nemcsak analitikai szempontból jelentős, hanem alapvető kiindulópontja számos molekuláris biológiai és biotechnológiai alkalmazásnak, mint a génmódosítás (pl. rekombináns fehérjék fejlesztése, virális vektorok előállítása), valamint génterápia és bioterápiás alkalmazások [86]. Éppen ezért fontos a gyors, hatékony és megbízható DNS-izolálási stratégiák kidolgozása, amelyek nemcsak kevés laboratóriumi eszközt igényelnek, hanem költséghatékonyak is [6].

Mivel a plazmid és genomi DNS molekulák szerkezete és funkciója is eltérő, így izolálásuk is részben különböző technológiák alkalmazását igényli. Az utóbbi években megjelent új technológiák, mint például a funkcionális mágneses nanorészecskék alkalmazása, tovább növelték a DNS-izolálás hatékonyságát és egyszerűségét [87].

2.2.3. Az RNS felépítése és szerkezete

A ribonukleinsav (RNS) lineáris polimer, amely szintén nukleotidokból épül fel, ugyanolyan foszfodiészter kötések révén, amelyek a DNS szerkezetében is megtalálhatók. Az RNS egyik legfontosabb kémiai sajátossága a ribóz 2'-hidroxil (-OH) csoportja, amely hiányzik a DNS 2'-deoxiribózában. Ez a funkciós csoport növeli az RNS kémiai reaktivitását, különösen báziskatalizált hidrolízissel szembeni érzékenységét [88]. Az RNS bázisai az adenin és guanin purinok, valamint a citozin és uracil (U) pirimidinek. Az uracil a DNS-ben található

timint helyettesíti. Az egyszálú RNS (ssRNS) a sejt szerkezetekben a leggyakoribb, ide tartozik az mRNS, tRNS, rRNS és számos szabályozó kis RNS (sRNS). Ezekben a molekulákban gyakran megfigyelhető az intramolekuláris bázispárosodás jelensége. A kettős szálú RNS (dsRNS) ritkább, de jelen lehet bizonyos vírusok genomjaként (pl. *Reoviridae*) [89], továbbá molekuláris mechanizmusokban, mint például az RNS-interferencia során (siRNS, miRNS) [90].

Az RNS molekula tehát kémiai tulajdonságaiból adódóan lényegesen érzékenyebb a környezeti tényezőkre, mint a DNS. Különösen igaz ez a bázikus közegre és a ribonukleáz enzim jelenlétére, ez utóbbi gyakorlatilag minden biológiai rendszerben nagy mennyiségben előfordul. Ennek következtében az RNS molekulák (főként az mRNS és sRNS) élettartama rövid, és funkciójuk túlnyomórészt átmeneti jellegű [91]. A hírvivő RNS-ek (mRNS) például csak addig maradnak stabilan jelen a sejtben, ameddig a bennük tárolt genetikai információ átírása (transzláció) zajlik. Ezt követően specifikus lebontó mechanizmusok (pl. exoribonukleázok és endoribonukleázok által végzett degradáció) eltávolítják őket, biztosítva ezzel a génexpresszió gyors és dinamikus szabályozását [92].

A sejtekből kinyert RNS-t leginkább génexpressziós profilok vizsgálatára alkalmazzák [11], valamint patogén és nem patogén baktériumok mechanizmusainak feltárására, beleértve a gazdasejtrel való interakciókat, de fontos terület a transzkriptomika is, amellyel lehetőség nyílik például környezeti minták mikrobiális közösségeinek funkcionális elemzésére [93].

2.3. A nukleinsavak kinyerésének alapelvei és kihívásai

Mivel a pDNS és gDNS, illetve az RNS molekulák struktúrájukat és funkciójukat tekintve is eltérnek, ezért izolálásuk is részben különböző technikák és vegyszerek alkalmazását igényli. A bakteriális plazmid-izolálási eljárás alapja a pDNS molekula gDNS-től eltérő fiziko-kémiai tulajdonságain (méret, topológia) és az ebből adódó eltérő renaturációs képességen alapul. A pDNS izolálás hagyományosan alkalikus lúzzal történik, mely módszer szelektivitása a plazmidok gyors renaturációján és a nagyméretű makromolekulák eltávolításán alapul [94]. A bakteriális sejtmembrán feltárása ilyenkor lúgos pufferrel és detergensekkel (NaOH + SDS (nátrium-dodecil-szulfát)) történik, amely egyszerre denaturálja a fehérjéket és a DNS-t. A pH semlegesítésével (pl. kálium-acetát tartalmú puffer) a sejtől származó fehérjék, lipidek és a nagyméretű DNS irreverzibilisen precipitálódnak, miközben a pDNS képes gyorsan és teljesen renaturálódni. Ennek hátterében az áll, hogy a pDNS egy kis méretű cirkuláris molekula, és bár a denaturáló körülmények között megszűnnek a hidrogénkötések a két DNS szál között, a szálak nem távolodnak el, mert egymásra vannak

tekeredve. A pDNS további tisztítása történhet szilícium-dioxid affinitás oszlopon, mágneses nanorészecskéken, vagy hagyományos fenol-kloroform extrakcióval [3].

A gDNS kinyerése eltérő megközelítést, több időt és nagyobb körültekintést igényel a szerkezeti integritás megőrzése miatt. A bakteriális sejtlízis nem alkalikus puffer segítségével történik, hiszen itt a nagyobb méretű gDNS épsége a fontos. A kíméletes feltárás lényege, hogy a gDNS ne fragmentálódjon. Ebben az esetben a membrán megbontása lizozim enzimmel történik, de mechanikai módszer (pl. ultrahangos kezelés) is alkalmazható. A fehérjék eltávolítása proteáz enzimmel (proteínáz K) és detergenssekkel történik. Az RNS degradációja pedig bármilyen típusú DNS-izolálás esetén RNáz enzimmel valósul meg. A denaturált fehérjék és lipidek kicsapása történhet szerves oldószerekkel, de alternatív módszer a pDNS-nél már említett affinitás oszlop és a mágneses nanorészecskék alkalmazása.

Mind a pDNS, mind a gDNS izolálási folyamatában az utolsó lépés az elúció, mely során általában TE (Tris-EDTA) pufferben oldják vissza és tárolják az izolált nukleinsavat [3,95]. Az RNS izolálása további kihívásokkal jár, különösen a báziskatalizált hidrolízisre való hajlam, és a sejtekben nagy mennyiségben jelenlévő RNázok miatt. Így az extrakciós folyamat fő kihívása a sejtek feltárása mellett az RNáz enzimek inaktiválása és a tiszta RNS megőrzése. A sejtlízis során kaotróp anyagokat, például guanidinium-tiocianátot (GTC) használnak, amely egyszerre inaktiválja az RNázokat és denaturálja a fehérjéket [96]. Ebben az esetben is alkalmazható szerves extrakció (pl. fenol, kloroform, izoamil-alkohol), de a kereskedelmi forgalomban kapható, affinitás oszlop-alapú készletek [97] és a mágneses nanorészecskék, mint szilárd fázisú extrakciós eszközök, szintén alkalmasak RNS-kinyerésre [11].

Összességében a pDNS, gDNS és RNS izolálásának különbségei a molekulák méretéből, fizikai és kémiai szerkezetéből, illetve asszociált komponenseikből adódnak. A magas minőségű nukleinsav-extrakció alapvető a downstream alkalmazások sikeréhez. Ez indokolja a gyors, hatékony és megbízható nukleinsav-kinyerési stratégiák, például a mágneses nanorészecske-alapú izolálás fejlesztését.

2.4. Mágneses nanorészecskékkel történő DNS- és RNS-kinyerés bakteriális sejtekből

A 2000-es évektől kezdve megjelentek olyan közlemények, amelyek különböző típusú és összetételű mágneses nanorészecskékről számoltak be, és ezeket szilárd fázisú nukleinsav-izolálóként vagy -szeparálóként alkalmazták különböző sejtekből és közegekből [98–100]. A mágneses nanorészecske-alapú DNS-izolálás – az affinitás oszlopos módszerhez

hasonlóan – számos előnnyel jár az időigényes, egészségre káros oldószerekkel végzett, hagyományos (fenol-kloroformos) módszerhez képest. A mágneses tulajdonságú gyöngyökhöz kötött DNS molekulák sejtlizátumtól való elválasztása egy erős külső mágneses tér segítségével történik. A mágneses részecskék (a hozzájuk kötődött DNS molekulákkal együtt) a mágnes elhelyezkedésétől függően a mintatartó cső alján vagy oldalán gyűlnek össze, így a (DNS mentes) felülúszó frakció pipetta segítségével eltávolítható. Az MNP-DNS komplex etanolos mosását követően a DNS molekulák elúciója (deszorpciója a részecskék felületéről) történik [3]. A konvencionális nukleinsav-izolálási módszerekkel összehasonlítva, az MNP-alapú technika előnye, hogy gyorsabb és egyszerűbben automatizálható, mivel nem igényel hosszadalmas centrifugálási lépéseket, és így a nyíróerőből eredő károsodás kockázata is csökkenthető [3]. A szakirodalomban megjelent eredmények alapján a ferrit-alapú mágneses nanorészecskék bakteriális nukleinsav-izolálásban való alkalmazása lehetséges, ugyanakkor az alkalmazott megközelítések és rendszerek jelentős változatosságot mutatnak, különösen az egyes ferrit-összetételek és felületkémiaili tulajdonságok tekintetében.

Az elmúlt közel két évtized szakirodalmában számos példa található ferrit-alapú mágneses nanorészecskék nukleinsav-izoláló képességének vizsgálatára, amelyek tematikusan kapcsolódnak a jelen kutatás tárgyához. Kobalt-ferrit (CoFe_2O_4) nanorészecskéket használtak például csirkék véréből és *Lactococcus* baktériumból izolált DNS adszorpciós és deszorpciós vizsgálataira, majd a részecskék felületén sikeresen megkötött nukleinsavat PCR reakcióban használták fel [101]. Szintén CoFe_2O_4 -et (alginsavval bevonva) használtak PCR amplikonok szeparálására, amelyeket a továbbiakban restriktív enzimek katalizálta reakciókban sikeresen teszteltek [102]. Chiang és munkatársai kifejezetten plazmid molekulák kinyerését tűzték ki célul, és mindehhez polietiléniminnel bevont Fe_3O_4 (magnetit) nanorészecskéket használtak [103]. Dimerkaptó-szukcininsavval bevont magnetit MNP-ken végzett kísérletek során tiszta DNS adszorpcióját tanulmányozták, és a visszanyerési arány a kezdeti DNS-mennyiséghez képest 86,16%-nak bizonyult [104].

Jelentős számú olyan kutatás van, amelyekben nem bevonatolt magnetit részecskéket alkalmaznak DNS sejtes extrakciójára vagy közegekből történő elkülönítésére, és ehhez a részecskék felszínén lévő $-\text{OH}$ csoportokat használják [105,106]. Ezekben a rendszerekben a kötődés körülményeit (például az ionerősséget és a kondenzációt elősegítő adalékokat) úgy választják meg, hogy a DNS-felület kölcsönhatások kialakulását támogassák, amelynek fiziko-kémiai hátterét a 2.5. fejezet tárgyalja. Ilyen, bevonat nélküli Fe_3O_4 MNP-k esetén más publikációkban a maximálisan kinyerhető DNS koncentráció 18-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ volt [8,107].

Hasonló eredményeket értek el egy másik kutató csoportban, ahol a magnetit részecskékkel bakteriális sejtekből 13,4 µg/mL DNS-t izoláltak [108].

A baktériumokból extrahált RNS a sejtek izolálásának időpontjában fennálló, aktuális génextpressziós állapotot tükrözi. A kinyerés pillanatában izolált teljes RNS-tartalom (amely magában foglalja az mRNS-t, rRNS-t, tRNS-t és egyéb nem-kódoló, szabályozó vagy strukturális funkciójú sRNS-eket is) azon gének összességét reprezentálja, amelyek az adott környezeti feltételek, fiziológiai állapot vagy élelciklus-szakasz hatására transzkripcióval átíródtak vagy éppen átíródnak, például a tápanyagfelvételben szerepet játszó géncsoportokat [109]. Léteznek azonban olyan gének is, amelyek expressziója a környezeti körülményektől függetlenül stabilnak mondható. Ezek a háztartási gének, amelyek a sejt alapvető életfolyamatainak fenntartásához szükségesek, és transzkriptomjaik a teljes RNS-készlet stabil komponenseit alkotják [110]. Az RNS nanorészecskékkel való kinyerését fókuszba helyezve, a publikációk száma főleg a SARS-CoV-2 fertőzés kitörése után nőtt meg jelentősen. A szakirodalomban túlnyomórészt olyan kutatásokat találunk, amelyek virális RNS extrakcióját célozzák meg MNP segítségével [11,111], ezáltal nemcsak egy kevésbé vizsgált területet érintve, hanem a vírusfertőzések detektálását is megkönnyítve. Ezen kívül megjelenik néhány olyan kutatás, amelyben bakteriális DNS és RNS együttes extrakcióját valósítják meg MNP-vel különböző sejtekből [112,113], vagy csak RNS-t eukariótákból [114]. Azonban kizárólag bakteriális RNS kinyerésére irányuló, olyan MNP-alapú protokoll, amely nem funkcionális MNP-eket használ (olyan értelemben, hogy a nanorészecskék felületét a cél RNS szekvenciával komplementer nukleinsavval funkcionalizálják, a szelektív kinyerés érdekében [115]), a szakirodalomban egyelőre nincs. Mindezek alapján indokoltnak tűnt olyan MNP-alapú megközelítések vizsgálata, amelyek bakteriális RNS kinyerésére is alkalmasak lehetnek, különös tekintettel az ilyen értelemben nem funkcionális nanorészecskék alkalmazására.

A kinyert nukleinsavak mennyiségének és minőségének ellenőrzése az extrakciós eljárások fontos része. A minőségellenőrzést jellemzően elektroforézissel és/vagy spektrofotometriás, illetve fluorometriás mérésekkel végzik. RNS esetében – kémiai instabilitása és funkcionális szerepe miatt – ezt gyakran funkcionális validációs módszerekkel, például reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) egészítik ki [116]. Az RT-PCR nemcsak az izolálás sikerességének visszaellenőrzésére, hanem a kinyert RNS funkcionális analízisére – adott célszekvencia amplifikálhatóságán keresztül – is alkalmas.

2.5. A nukleinsavak és nanorészecskék fiziko-kémiai kapcsolata

A protokollfejlesztés alapja az izolálendő nukleinsav és az izolálásra használt felület fizikai-kémiai tulajdonságainak ismerete, mivel ezek nélkül sem a szelektív kötődés, sem a hatékony visszanyerés nem biztosítható. Ennek megfelelően a mágneses nanorészecskék és nukleinsavak közötti kölcsönhatások mechanizmusainak megértése lehetővé teszi olyan kinyerési protokollok kialakítását, amelyek a komponensek fizikai-kémiai tulajdonságainak célzott kihasználásával nagy hatékonyságot érnek el, miközben csökkenthető a szükséges reagensek, lépések és eszközök száma.

A nukleinsavak más molekulákkal és szupramolekuláris komplexekkel való kölcsönhatásában jelentős szerepet játszik a foszfátcsoportok és a nukleobázisok protonáltsági állapota. A foszfátváz fiziológias pH-n állandóan negatív töltésű, míg a bázisok protonálódása savas, illetve deprotonálódása lúgos pH-tartományban válik jelentőssé, ami hatással lehet a hidrogénkötésekre és az elektrosztatikus kölcsönhatásokra [30,31]. Az aminocsoporttal módosított ferrit-alapú nanorészecskék esetében a felületen található $-NH_2$ csoportok sav-bázis egyensúlya pH-függő: savas és semleges pH-tartományban ezek túlnyomórészt protonált ($-NH_3^+$) formában vannak jelen, míg lúgos környezetben fokozatos deprotonálódásuk következik be [117]. A nem funkcionizált ferrit-alapú MNP-k felületét fém-hidroxil csoportok borítják, amelyek amfoter jellegükből adódóan szintén pH-függő protonálódási és deprotonálódási egyensúlyt mutatnak [102,118]. Amennyiben a mágneses nanorészecskék elektrokinetikai potenciálja negatív, a DNS molekulákkal történő kölcsönhatás nem elsősorban elektrosztatikus vonzáson alapul, hanem különböző nemkovalens kölcsönhatások – többek között hidrogénkötések – együttes hozzájárulásával valósulhat meg. Ferrit-alapú nanorészecskék esetében a felületi $\equiv Fe-OH$ csoportok donor hidrogénatomjai hidrogénkötéseket alakíthatnak ki a DNS foszfátgerincének oxigénatomjaival, amelyek nemkötő elektronpárjaik révén hidrogénkötés-akceptoroként vesznek részt ezekben a kölcsönhatásokban [119].

A kötődés hatékonyságát jelentősen befolyásolja a kísérleti környezet, különösen az ionerősség és a nukleinsav molekulák konformációja. A nagy ionerősség (pl. NaCl-tartalom) [32], az oldatban jelenlévő ellenionok révén töltésárnyékolást eredményez, míg a PEG-indukált kondenzáció a nukleinsav-molekulák kompaktabb konformációjának kialakulását segíti elő. Ezek együttesen rendszerfüggő módon növelhetik vagy csökkenthetik az adszorpció mértékét [93,94]. Rittich és munkatársai eredményei is ezt támasztják alá,

igazolva, hogy az eltérő sókoncentrációjú kötő pufferek (az adszorpciós kémiai körülmények) alkalmazása jelentős különbséget eredményezhet a DNS hozamban [102].

Az MNP-k mérete, morfológiája, mágneses szaturációja és felületi módosítása mind befolyásolják a nukleinsavakkal történő interakciókat. Például kisebb részecskeméret nagyobb fajlagos felületet biztosít, így több kötőhely lehet a nukleinsav molekulák számára. Emellett a magasabb mágneses szaturáció előnyös lehet az adszorbeált DNS vagy RNS gyors és hatékony mágneses elválasztásához [102].

A fenti szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy a ferrit-alapú mágneses nanorészecskék alkalmasak lehetnek nukleinsavak megkötésére és kinyerésére, azonban a kölcsönhatások mértékét és a kinyerés hatékonyságát számos, egymással összefüggő paraméter (összetétel, felületkémia, pH, ionerősség, részecskeméret) befolyásolja. Ennek következtében az egyes megközelítések közvetlen összehasonlítása gyakran nehéz, és indokolt a rendszerek egységes szempontrendszer szerinti vizsgálata, illetve a kinyerési feltételek célzott optimalizálása. A fenti megfontolások alapján fogalmaztam meg a disszertáció célkitűzéseit, amelyeket a következő fejezetben részletezek.

3. Célkitűzések

A disszertáció fő célja olyan nukleinsav-izolálási protokollok kifejlesztése mágneses nanorészecskék segítségével, amelyek hatékonyságukban megközelítik vagy felülmúlják a kereskedelmi forgalomban elérhető izoláló készletek teljesítményét. Emellett célom volt, hogy a kidolgozott módszerek egyszerűbb, felhasználóbarát megközelítést kínáljanak, kevesebb laboratóriumi eszköz használatát tegyék szükségessé, és az alacsony előállítási költség révén gazdaságos, költséghatékony alternatívát biztosítsanak a konvencionális izolálási eljárásokkal szemben. Mindezek megvalósítása érdekében az alábbi konkrét célokat tűztem ki:

- reverzibilis DNS-kötés lehetőségének vizsgálatát ferrit-alapú mágneses nanorészecskével
- a tesztelt ferrit-alapú mágneses nanorészecskék (mangán-, nikkell- és magnézium-ferrit) esetén egyedi és hatékony, toxikus vegyszerektől mentes pDNS-izoláló protokoll kidolgozását,
- mindhárom vizsgált ferrit-alapú MNP esetén összehasonlítani a funkciós csoporttal ellátott és a nem funkcionális változatokat, olyan szempontból, hogy a felületi módosítás milyen mértékben befolyásolja a pDNS-izolálás hatékonyságát,
- két, azonos összetételű, de eltérő előállítási módszerrel készült mágneses nanorészecske ($\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$) bakteriális DNS-kinyerésre való alkalmasságának összehasonlítását, annak megállapítása céljából, hogy a szintézis módja kritikus paraméter-e a DNS-izolálás hatékonysága és a módszer gyakorlati alkalmazhatósága szempontjából,
- a pDNS-izolálásra legalkalmasabb MNP kiválasztását annak alapján, hogy nemcsak nagy mennyiségű és jó minőségű DNS-t biztosítson, hanem a kísérleti körülmények változásaira a lehető legkisebb mértékben legyen érzékeny,
- a pDNS-izolálásra legalkalmasabb MNP alkalmazhatóságának kiterjesztését bakteriális gDNS és RNS-kinyerésére alkalmas protokoll kidolgozására, valamint a kinyert nukleinsavak molekuláris biológiai felhasználhatóságának kísérletes igazolását.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A doktori kutatásom során alkalmazott reagensek, laboratóriumi eszközök, mérőműszerek és szoftverek részletes felsorolását a Mellékletek 2. fejezete tartalmazza. A főszövegben kizárólag azokat az anyagokat és eszközöket ismertetem, amelyek a kísérletek módszertani megértése és reprodukálhatósága szempontjából lényegesek.

A bakteriális sejt kultúrák tenyésztéséhez standard LB-alapú (Luria-Bertani tápközeg) táptalajokat és szelektív antibiotikumokat alkalmaztam. A nukleinsav-izolálási kísérletekhez különböző kémiai reagenseket (detergensek, pufferkomponensek, sók, kaotróp anyagok), valamint mágneses nanorészecskéket használtam. A mágneses nanorészecskéket a Miskolci Egyetem Kémiai Intézetének Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoportjában dolgozó munkatársak szintetizálták és karakterizálták. A fehérje- és nukleinsav-szennyezések eltávolításához proteáz, RNáz és DNáz enzimeket alkalmaztam.

Az izolált DNS és RNS mennyiségi és minőségi vizsgálatát agaróz gélelektroforézissel, valamint spektrofotometriás mérésekkel végeztem. A nukleinsavak molekuláris biológiai felhasználhatóságát restrikciós emésztésekkel, PCR- és qPCR-alapú módszerekkel igazoltam. Az RNS minták funkcionális épségének vizsgálatát – egy adott célszekvencia amplifikálhatóságán keresztül – reverz transzkripció PCR reakcióval (RT-PCR) végeztem. A mágneses nanorészecskékkel végzett izolálási eljárásokat kereskedelmi forgalomban elérhető DNS- és RNS-izoláló készletekkel hasonlítottam össze, amelyek referenciamódszerként szolgálták a hozam, tisztaság és reprodukálhatóság értékeléséhez.

A kísérletek során alkalmazott mérőműszerek közé tartoztak többek között centrifugák, inkubátorok, PCR- és qPCR készülékek, UV-Vis spektrofotométer, gélelektroforézis berendezés és géldokumentációs rendszer. Az adatok feldolgozásához és az ábrák készítéséhez általánosan használt bioinformatikai és grafikai szoftvereket alkalmaztam.

4.2. Bakteriális sejtenyésztés folyamata

A baktériumsejteket LB agarlemezeiről LB táptalajba oltottam, majd rázatás mellett inkubátorban tenyésztettem egy éjszakán át, az adott baktériumtörzs növekedéséhez legmegfelelőbb hőmérsékleten (*E. coli* (37 °C), *P. fluorescens* (26 °C), *M. luteus* (30 °C), *B. subtilis* (30 °C)) [120–123]. A tenyésztést követően a sejtszuszpenziók optikai denzitását 600 nm hullámhosszon (OD₆₀₀ NanoDrop™ spektrofotométerrel) mértem. Az OD₆₀₀ mérését a sejtnövekedés nyomon követésére alkalmaztam. Sejtszuszpenziók esetében a mért

jel nem tisztán molekuláris abszorpción, hanem elsősorban a sejtek által okozott fényszóráson alapul. Ennek ellenére meghatározott koncentrációtartományban az OD₆₀₀ érték arányos a sejtszuszpenzió zavarosságával, és jó közelítéssel a sejtkoncentrációval is, így alkalmas a sejtnövekedés nyomon követésére.

4.3. A MnFe₂O₄ MNP DNS-kötésének és a kötés reverzibilitásának vizsgálata

A kutatás során tesztelt első mágneses nanorészecske a mangán-ferrit volt, melyet munkatársaim ultrahangos kavitációt alkalmazó égési eljárással készítettek [124]. Első lépésként azt vizsgáltam, hogy DNS molekulák adszorbeálhatók-e az MNP felületére, illetve, hogy az adszorpció reverzibilis-e. Ennek érdekében egy, a szakirodalomban (más nanorészecskéekkel) alkalmazott protokollt [114] vettem alapul és néhány módosítással használtam (pl. más térfogat mennyiségek, inkubációs idők, hatékonyabb etanol eltávolítás), tiszta, csak DNS-t tartalmazó oldatot alkalmazva a teszthez. Ehhez egy kereskedelmi forgalomban elérhető DNS-izoláló készlet segítségével, a gyártó által előírt protokoll [125] alapján végeztem el a DNS előzetes extrakcióját, majd a 4.9.2. alfejezetben leírtak alapján agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem a kinyert DNS meglétét.

A DNS reverzibilis megkötődésének vizsgálatát az alábbi protokoll alapján végeztem:

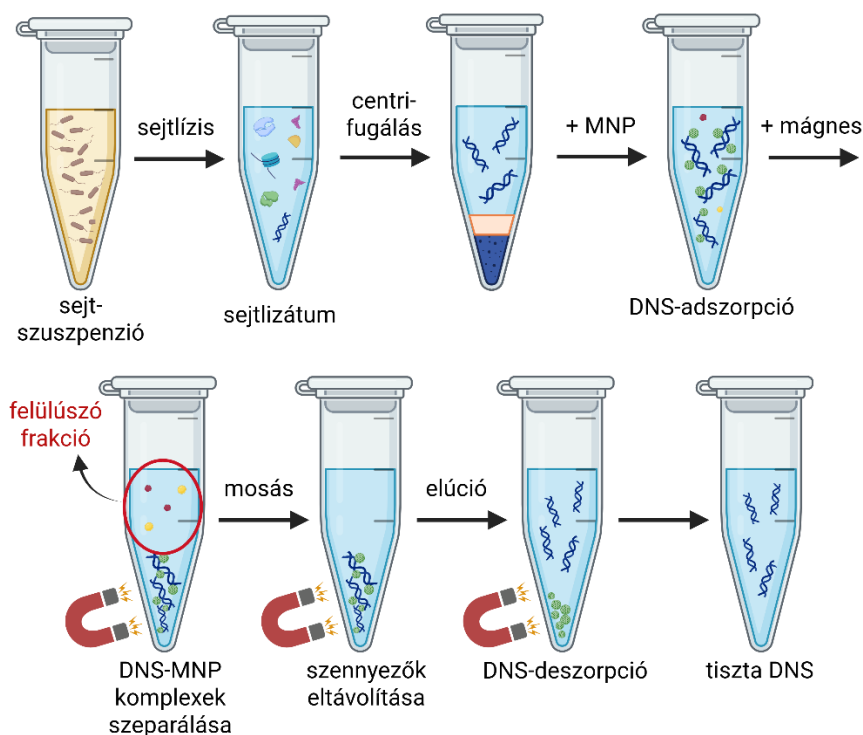
- a szakirodalomban alkalmazott koncentrációtartományhoz hasonlóan készítettem egy 0,014 mg/mL koncentrációjú MnFe₂O₄ diszperziót kötő pufferben (2,5 M NaCl; 10 mM tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 1450; 0,05%v/v Tween 20), amely a DNS adszorpciójának közegeként szolgáló oldat;
- hozzáadtam a DNS oldatot, melynek térfogatát a végtérfogat arányában határoztam meg (2/5 rész), amely a jelen kísérletekben 50 µL-nek felelt meg;
- a mintát rázattam 5 percen keresztül, majd ugyanennyi ideig mágneses tartóra helyeztem (a nanorészecskék a mágneshez rendeződtek);
- a felülúszó frakciót új Eppendorf csőbe pipettáztam;
- az elegyet 200 µL 80%-os etanolban szuszpendáltam, rázattam (1 min), majd mágnesre helyeztem (5 min) és eltávolítottam a felülúszót (ezt a lépést még egyszer megismételtem);
- rövid centrifugálás után a maradék etanolt is eltávolítottam és a mintát szobahőmérsékleten hagytam, hogy teljesen elpárologjon az alkohol;
- az eluálást (DNS deszorpciója az MNP felületéről) 50 µL 10 mM tris-HCl (pH 8,5) elúciós pufferrel végeztem;
- 5 min rázatás után a mágneses tartóra tettem a mintát (10 min inkubáció);

- a mágneshez rendeződött nanorészecskék bolygatása nélkül, a DNS-t tartalmazó elúciós frakciót egy tiszta csőbe pipettáztam.

A teljes folyamatot párhuzamosan végeztem el egy negatív kontrollal, ahol a DNS oldat helyett steril desztillált vizet adtam a nanorészecskékhez.

4.4. Bakteriális pDNS-izolálási protokoll kidolgozása MnFe₂O₄ MNP-vel

A MnFe₂O₄ MNP-vel végzett bakteriális pDNS-izolálási protokoll (5. ábra) kidolgozása során korábban közölt, mágneses nanorészecskéken alapuló nukleinsav-extrakciós eljárások szolgálták kiindulási pontként, elsősorban Oberacker és munkatársai [114], valamint Treitli és munkatársai [126] publikációi. Ezeket a módszereket saját kísérleti rendszeremhez igazítva, továbbá a Qiagen plazmid izoláló készletek pufferösszetételeit figyelembe véve alakítottam ki az alkalmazott extrakciós folyamatot [125].



5. ábra. A kutatás során kifejlesztett pDNS-izoláló protokoll sémája, amely mindegyik vizsgált nanorészecskére, és mindegyik optimalizált protokollra általánosan érvényes

Az alkalmazott alapprotokoll lépései a következők voltak:

- az *Escherichia coli* sejteket (5 mL sejt-szuszpenziót) centrifugáltam (5 min, 6000×g), a felülúszó tápfolyadékot dekantáltam;
- a Plasmid Purification Midi készlet (Qiagen, [125]) által alkalmazott P1-P3 jelölésű puffereket a publikus receptúrák alapján készítettem el és használtam. A P1 reszuszpendáló puffer (50 mM tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNáz A) a

sejtek homogenizálását szolgálta, a P2 lúgos lízis puffer (200 mM NaOH, 1%w/v SDS) a sejtek feltárását és a makromolekulák denaturálását végezte, míg a P3 neutralizáló puffer (3 M kálium-acetát pH 5,5) a pDNS renaturálásán túl a genomi DNS és fehérjék kicsapását tette lehetővé;

- centrifugálás: 14 500×g, 15 min;
- a por formában rendelkezésemre bocsátott mágneses nanorészecskéket kimértem és elkészítettem egy 20 mg/mL-es, 600 µL térfogatú diszperziót kötő pufferben (2,5 M NaCl; 1 M tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20). Az MNP koncentrációját korábbi laboratóriumi tesztek és szakirodalom alapján állítottam be 20 mg/mL-re [99];
- a sejtlizátum folyadék frakcióját (600 µL) hozzáadtam a 20 mg/mL koncentrációjú mágneses nanorészecske diszperzóhoz, ezzel a nanorészecskék végkoncentrációja 10 mg/mL lett;
- az Eppendorf csöveket 10 percen keresztül forgattam (itt történik meg a DNS-MNP komplexek kialakulása);
- 5 min inkubáció mágneses tartón, szobahőmérsékleten;
- a kialakuló nyers felülúszó frakciót (amely a potenciálisan nem kötött DNS molekulákat és szennyeződések tartalmazza) összegyűjtöttem és egy új csőbe pipettáztam;
- a maradék pelletet (DNS-MNP komplex) pedig háromszor mostam, mindháromszor ugyanazt a mosó puffert alkalmazva (10 mM tris-HCl, pH 7,5 és 80% etanol):
 1. mosás: 1 mL mosó puffer, vortex, mágnesen inkubálás (2 min), felülúszó eltávolítása;
 2. mosás: 1 mL mosó puffer, 30 s inkubálás, felülúszó eltávolítása;
 3. mosás: 500 µL mosó puffer, vortex, 2 min inkubálás mágnesen, felülúszó eltávolítása;
- rövid centrifugálás a maradék etanolos puffer egyszerűbb eltávolítása miatt (a reakcióelegyben maradó alkohol a későbbi molekuláris biológiai folyamatokat zavarná);
- az etanol végső eltávolításához a csövek nyitott tetővel történő inkubálása 37 °C-on (az MNP felületéről a maradék alkohol is elpárolog – kb. 15 min). A mintát nem szabad „túlszáritani”, azaz hagyni, hogy a pellet már repedezni kezdjen, hiszen akkor az MNP-hez kötött DNS diszperzió nem lesz homogén, darabos marad. Ez az MNP-ről visszanyerhető DNS mennyiségét csökkenti, ezzel pedig az izolálási folyamat hatékonyságát rontja;

- a mintákat 80 μL elúciós pufferben (10 mM tris-HCl, pH 8,5) szuszpendáltam (10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$), majd mágneses tartón inkubáltam (5 min);
- a tiszta DNS oldat pipetta segítségével különválasztható a nanorészecskéktől;
- hogy megnöveljem az izolált pDNS kihozatalát, egy újabb elúciós lépést alkalmaztam, szintén 80 μL -es térfogattal.

A pDNS-izolálási protokoll optimalizálása során azt is vizsgáltam, hogy az MNP-felületen megkötött DNS minél nagyobb arányú visszanyeréséhez hány egymást követő eluálás szükséges. Ennek érdekében ugyanazon minta esetében az elúciós lépést egymást követően összesen négy alkalommal végeztem el. Egy eluálás az alábbi lépésekből állt:

- az MNP-DNS komplex szuszpendálása elúciós pufferben,
- 10 min inkubáció 37 $^{\circ}\text{C}$ -on,
- 5 min mágneses szeparálás,
- az elúciós frakció (DNS oldat) átmérése tiszta Eppendorf csőbe.

4.5. Bakteriális pDNS-izolálás $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel, és pDNS-izolálási hatékonyság vizsgálata a különböző szintézisidejű nanorészecskék esetén

Az amino-funkcionalizált magnézium-ferrit mágneses nanorészecskék két, eltérő szintézismódszerrel készített változatát alkalmaztam a pDNS-izolálási kísérletek során. Az egyik minta hagyományos koprecipitációs eljárással készült, 12 órán át tartó refluxáltatás mellett („12 h” minta), míg a másik esetében ezt a lépést egy mikrohullámú sugárzással segítette, 4 perces melegítési eljárás váltotta fel („4 min” minta). A karakterizálási eredmények alapján mindkét nanorészecske összetétele és szuperparamágneses tulajdonságai összehasonlíthatónak bizonyultak [14]. A pDNS-kinyerési hatékonyság összehasonlítása érdekében több párhuzamos izolálást végeztem *Escherichia coli* baktériumszuszpenzióból a 4.4. alfejezetben ismertetett alapprotokoll alkalmazásával, mindkét típusú $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel. Az extrahált pDNS minták tisztaságát, mennyiségét és szerkezeti épségét UV-Vis spektrofotometriával, agaróz gélelektroforézissel és restriktációs endonukleázok által katalizált emésztési reakciókkal ellenőriztem.

4.6. NiFe_2O_4 mágneses nanorészecskék pDNS-izolálásban való alkalmazhatóságának vizsgálata

A harmadik és egyben utolsó vizsgált mágneses nanorészecske a nikkelferrit volt, melynek vizsgáltam mind a szolvotermális módszerrel készült, funkcionizált változatát ($\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$), mind pedig a funkciós csoport nélküli formáját (NiFe_2O_4), amelyet szonokémiai

szintézissel állítottak elő [6]. A nikkelferrit részecskék pDNS-izoláló képességét a mangán-ferrit esetében kidolgozott alapprotokollal teszteltem (4.4. alfejezet).

4.7. Extrakciós protokoll optimalizálása mindegyik vizsgált MNP-re

Az MNP alapú pDNS izolálási protokollok optimalizálását hat különböző ferrit-alapú mágneses nanorészecskével végeztem, beleértve a funkciós csoporttal ellátott és a nem funkcionizált változatokat is: MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$.

A nukleinsav-izolálási protokoll optimalizálása során a szakirodalomban közölt, mágneses nanorészecskéken alapuló extrakciós eljárások tapasztalatait vettem figyelembe. A szakirodalmi adatok alapján az izolálási hatékonyságot elsősorban két lépés befolyásolja: a DNS adszorpciója és deszorpciója az MNP felületén. Ennek megfelelően a kísérletek során ezen lépések körülményeit módosítottam, és a hat különböző ferrit-alapú mágneses nanorészecske esetében több, eltérő extrakciós protokollt alkalmaztam.

Referenciaként a korábban alapprotokollként említett eljárást alkalmaztam, melyet az optimalizálási kísérletsorozatban „**1. Tris-HCl**” protokollként pontosítottam. A protokoll elnevezése az alkalmazott elúciós puffer típusára utal, tehát ebben az esetben az eluálás 10 mM tris-HCl (pH 8,5) pufferrel történt.

A második protokoll esetében kizárólag az elúciós puffer összetételét módosítottam: a tris-HCl puffer helyett 0,1 M K_3PO_4 (pH 8,0) foszfát puffert alkalmaztam, míg az adszorpció és mosási lépések változatlanok maradtak. Ezt az eljárást „**2. PB**” protokollnak neveztem el (PB = phosphate buffer). A foszfátionok DNS-deszorpciót elősegítő hatását korábbi tanulmányok is leírták, elsősorban amino-funkciós csoporttal módosított mágneses nanorészecskék esetében [127]. Ennek háttérében az áll, hogy ha negatív töltésű ionokkal teli elúciós pufferben szuszpendáljuk a DNS-MNP komplexeket, akkor a szintén negatív össztöltésű DNS molekulákat ezek az ionok kompetitív módon kiszorítják a részecskék felületéről [128].

A harmadik protokoll kidolgozásakor mind az adszorpció, mind a deszorpció körülményeket módosítottam. A kötő puffer ebben az esetben nem tartalmazott nátrium-kloridot, míg az elúciós pufferben a tris-HCl koncentráció változatlanul maradt, és emellett 800 mM NaCl-ot tartalmazott. Az eljárást „**3. Tris-HCl, NaCl**” protokollként jelöltem. Az eltérő sókoncentrációjú kötő- és elúciós pufferek alkalmazását Xu és munkatársai eredményei alapján választottam, akik kimutatták, hogy ez a megközelítés növelheti a DNS visszanyerési hatékonyságát [127].

Az optimalizált protokollok minden egyéb lépésükben megegyeztek az alapprotokollal; az egyes eljárások közötti eltérések kizárólag a kötő- és elúciós pufferek összetételében jelentek meg, amelyeket az 1. táblázat szemléltet és foglal össze.

1. táblázat. A kötő- és elúciós pufferek összetétele az alap (1. Tris-HCl) és a továbbfejlesztett protokollokban (2. PB, 3. Tris-HCl, NaCl). Az 1. protokolltól eltérő változásokat pirossal jelöltem.

Protokoll száma és neve	Kötő puffer összetétele (adszorpció)	Elúciós puffer összetétele (deszorpció)
1. Tris-HCl (alap)	2,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20	10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
2. PB	2,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20	0,1 M K ₃ PO ₄ (pH 8,0)
3. Tris-HCl, NaCl	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20	10 mM Tris-HCl (pH 7,0); 800 mM NaCl

4.8. A pDNS-izolálási hatékonyság kritériumai

Annak érdekében, hogy az egyes mágneses nanorészecskék esetében optimalizált, nagy hozamú és jó minőségű DNS-kinyerést érjek el, mind a hat MNP-t mindhárom kidolgozott extrakciós protokollal vizsgáltam (összesen 6 × 3 kombinációban). A kísérleteket legalább három független ismétlésben végeztem el, biztosítva ezzel az eredmények statisztikai megbízhatóságát. A 18 vizsgált kombináció megfelelőségét öt előre meghatározott kritérium alapján értékeltem:

1. a kinyert DNS koncentrációja,
2. tisztasága az A₂₆₀/A₂₈₀ arány alapján,
3. az izolált plazmid minősége agaróz gélelektroforézis képen,
4. a DNS fragmentációs mintázata restriktív endonukleázokkal katalizált reakciót követően,
5. a kinyert DNS integritása qPCR reakció alapján.

Az alábbiakban részletezem a szempontok kritériumait:

1. A pDNS mennyiségi mutatója (koncentrációmérés):

A pDNS minta abszorbanciáját 260 nm specifikus hullámhosszon (A₂₆₀) mértem. A szakirodalomban elfogadott összefüggés szerint A₂₆₀ = 1,0 abszorbanciaérték 50 µg/mL tiszta duplaszálú DNS-nek felel meg, így a mért abszorbanciák alapján a minta DNS koncentrációja kiszámítható [129,130].

Összehasonlítási alapként figyelembe vettem egy kereskedelmi forgalomban elérhető plazmid DNS-izoláló készletet (*Mag-Bind Ultra-Pure Plasmid DNA Kit*, Omega Bio-tek), amely nagy kópiaszámú plazmidok (kb. 300-1000 pDNS kópia/sejt) esetén $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ pDNS hozamot garantál [131]. Jelen vizsgálatban ezzel szemben egy alacsony kópiaszámú plazmidot (pBAD24; körülbelül 10-20 kópia/sejt) izoláltam. Ennek ellenére a protokollok értékeléséhez a $10 \mu\text{g/mL}$ -es koncentrációt határoztam meg küszöbértékként. A küszöbérték alkalmazásának célja az egyes módszerek teljesítményének egységes összehasonlíthatósága volt a kereskedelmi izoláló készletekkel, valamint olyan eljárások fejlesztése, amelyek alacsony kópiaszámú plazmid esetén is magas izolálási hatékonyságot biztosítanak.

2. A pDNS tisztaságának (szennyeződésmertességének) kritériuma:

DNS tartalmú minta esetén a 280 nm (A_{280}) hullámhosszon mért abszorbanciát a potenciálisan szennyező fehérjék meghatározására használják. Az A_{260}/A_{280} arányt a DNS minta tisztaságának értékelésére számítják ki. Jellemzően a tiszta DNS A_{260}/A_{280} aránya 1,6 – 2,0 értékek közé esik [132].

3. A pDNS agaróz gélelektroforézis (AGE) képen való megjelenésének kritériuma:

Az agaróz gélelektroforézissel történő elválasztás után a kapott DNS fragmentumokat tartalmazó mintáknak UV fényvel megvilágítva jól körülhatárolt fluoreszcens sávokként kell megjeleníteniük a gélképen, a megfelelő molekulatömegű DNS méretmarker sávjaival összevethető migrációs pozícióban [133].

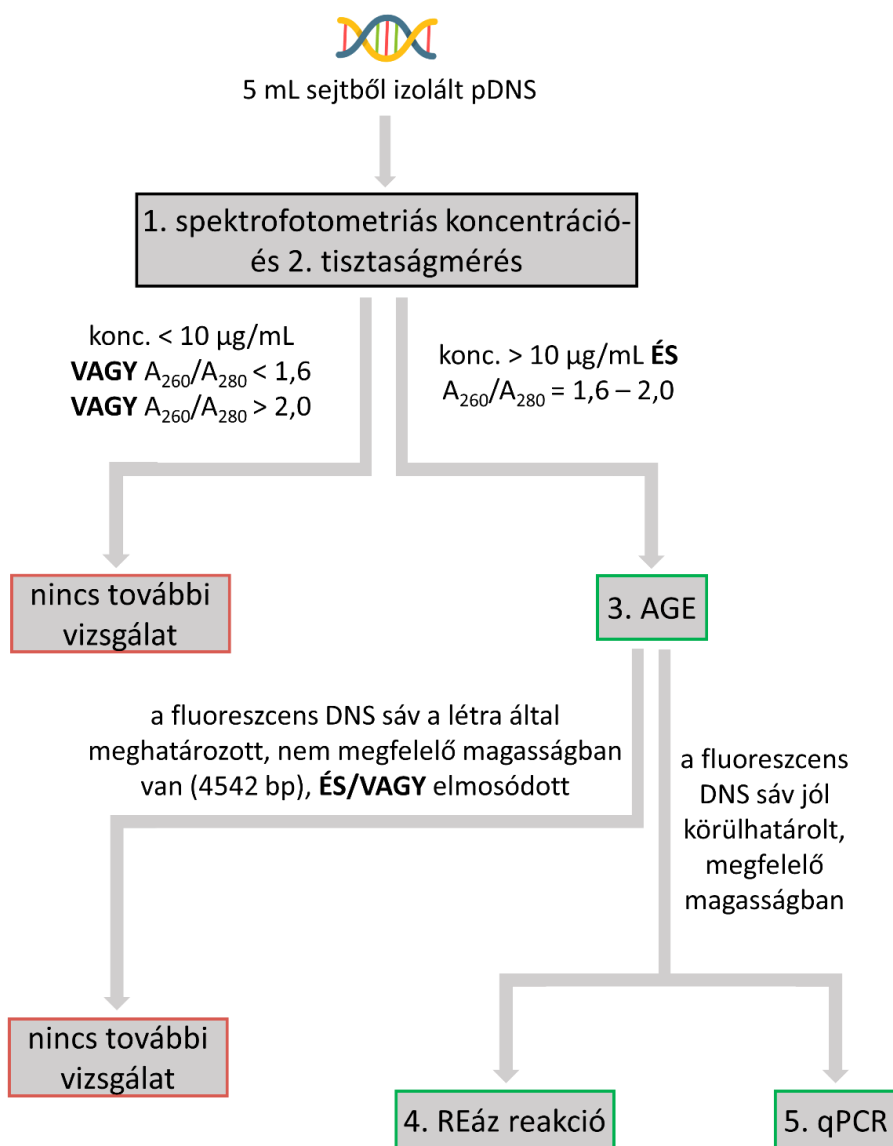
4. A pDNS integritásának kritériuma restrikciós endonukleázokkal történő reakciók (REáz reakciók) alapján:

A bakteriális sejtekből kivont pDNS integritása többek között a pBAD24 molekulán specifikus felismerő- és hasítóhelyekkel rendelkező restrikciós endonukleázok segítségével vizsgálható. Ezek az enzimek felismernek egy adott szekvenciát a DNS-en, és (a felismerési helyen vagy attól távol) hidrolizálják a DNS gerinc két szomszédos nukleotidja közötti foszfodiészterkötést, ragadós vagy tompa véget hagyva maguk után [134]. A DNS épségét akkor lehet megerősíteni, ha az enzimaktivitás meghatározott méretű és számú fragmentumok keletkezését eredményezi. Ha a plazmid molekula az izolálás során szerkezeti sérülést szenved (törés vagy mutáció), a restrikciós endonukleázok szekvencia-felismerése vagy hasítása gátolt lehet, ami eltérő fragmentációs mintázatot eredményez [135].

5. A pDNS integritásának kritériuma qPCR alapján:

qPCR segítségével leggyakrabban génexpressziót vizsgálnak, de a módszer alkalmas a DNS mennyiségi [136] és minőségi [137] elemzésére is. A kutatásomban qPCR-t is használtam a DNS molekulák integritásának értékelésére. Ha a DNS templát ép, az oligonukleotid primerek megfelelő hőmérsékleten hibridizálnak a komplementer szekvenciájukhoz, és az általuk közrezárt génrészlet DNS-polimerázzal történő amplifikációja bekövetkezik. A felsokszorosított termék jelenlétét a megfelelő ciklusszám (Cq) és a fluoreszcencia jel intenzitása jelzi. Szakirodalmi adatok szerint a 35-ös Cq érték körülbelül 10 DNS kópiának felel meg, ami nagyon kis mennyiség. Minél alacsonyabb a Cq érték, annál nagyobb a kiindulási minta DNS tartalma [138]. Ennek alapján a qPCR megfelelőségi kritériumának a 35 alatti Cq értéket választottam. A fluoreszcencia intenzitását (RFU) minden esetben pozitív kontroll mintához viszonyítva értékeltem, mivel az RFU érték nemcsak az amplifikált DNS mennyiségétől, hanem az alkalmazott qPCR berendezés érzékenységétől is függ [139]. Ezért az RFU esetében abszolút küszöbértéket nem határoztam meg (hiszen adott mintában a maximális RFU értékek qPCR berendezésenként eltérnek).

A 6. ábra szerint bemutatott döntési fa volt az alapja az elvégzett kísérletek kiértékelésének. Az ábrázolt vizsgálati szintek határozták meg azt is, hogy a downstream folyamatok közül melyeket lehet és kell elvégezni, vagy mely esetben szükséges a tesztelést, a definiált szabályoknak való nem megfelelés miatt, idő előtt megszakítani. Tehát minden esetben az extrakciót követően először spektrofotométeren mértem az izolált minta DNS koncentrációját és meghatároztam annak tisztaságát. Amennyiben ezek az értékek nem feleltek meg a definiált kritériumoknak, a további vizsgálatokat nem folytattam (pirossal keretezett ágak, 6. ábra). Pozitív eredmények esetén agaróz gélelektroforézis, majd restriktációs emésztés és qPCR vizsgálatok következtek (zölddel keretezett lépések, 6. ábra).



6. ábra. A pDNS-extrakció után végzett downstream módszerek döntési fája (konc. = koncentráció, AGE = agaróz gélelektroforézis, REáz = restrikciós endonukleáz, qPCR = kvantitatív polimeráz láncreakció)

4.9. A nukleinsav-izolálást követő downstream folyamatok módszertani leírása

4.9.1. Nukleinsavak koncentrációjának meghatározása UV-Vis spektrofotometriával

A DNS koncentráció méréseket mikrotérfogatban kiviteleztem UV-látható tartományban működő NanoDropTM spektrofotométerrel, 260 nm hullámhosszon. A készülék beállításai lehetővé teszik mind a DNS (dsDNS), mind pedig az RNS koncentráció könnyű meghatározását, csupán 1-2 µL mintatérfogatból. A nukleinsavaknak aromás nitrogéntartalmú bázisai (purin- és pirimidinbázisok) az UV-tartományban, jellemzően 260 nm-en mutatnak abszorpciós maximumot, ezért ezen a hullámhosszon mérhető abszorbanciájuk közvetlen összefüggésben áll a mintában jelenlévő nukleinsav

mennyiségével. Az abszorbancia és a koncentráció közötti kapcsolatot a Lambert-Beer törvény írja le (1. egyenlet).

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

1. egyenlet. A Lambert-Beer törvény egyenlete

ahol

A = abszorbancia,

ε = moláris extinkciós koefficiens,

c = koncentráció,

l = a fény úthossza.

A mikrotérfogatú spektrofotometriában alkalmazott készülékek (pl. NanoDropTM) esetében a fény úthossza a mérés során automatikusan beállításra és kalibrálásra kerül, így a mért abszorbancia közvetlenül átszámítható koncentrációértékké. A nukleinsavak koncentrációjának meghatározásához a szakirodalomban elfogadott, empirikusan meghatározott extinkciós értékeket használják, amelyek figyelembe veszik a DNS és az RNS átlagos bázisösszetételét, és lehetővé teszik a koncentráció megadását tömegegységben ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Ennek megfelelően a szakirodalomban elfogadott konverziós értékek az alábbiak:

DNS esetén: $A_{260} = 1 \Rightarrow 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ DNS [129],

RNS esetén: $A_{260} = 1 \Rightarrow 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ RNS [140].

Ezek az összefüggések a Lambert-Beer törvény gyakorlati alkalmazásán alapulnak és tiszta, fehérjéktől, illetve egyéb UV-elnyelő szennyezőktől mentes minták esetén biztosítanak megbízható koncentrációbecslést. A NanoDropTM készülék a mért abszorbanciaértékek és a beállított nukleinsavtípus alapján ezeket a konverziós tényezőket automatikusan alkalmazza, így a mérés eredményeként a koncentrációérték közvetlenül leolvasható.

4.9.2. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis egy hatékony módszer a 0,5 – 25 kb méretű DNS fragmentumok elválasztására [141], ugyanakkor egyszerűen csak arra is alkalmas, hogy megállapítsuk, jelen van-e a DNS egy oldatban. Ezt a folyamatot alkalmaztam ahhoz, hogy igazolni tudjam a DNS jelenlétét a mágneses nanorészecskékkel történő izolálás után. 0,75 cm vastagságú, 1%-os, vagy kisebb méretű PCR termékek esetén 3%-os (w/v) agaróz gélét használtam. Az 1%-os gélhez 1 g, a 3%-oshoz pedig 3 g agaróz port adtam 100 mL 1× tris-ecetsav-EDTA (röviden TAE: 40 mM tris-bázis, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA) puffer elkészítéséhez. Az elektroforézishez szükséges futtató puffer szintén TAE volt. A minták gélzsebekbe való

bejuttatásához, illetve a gélben való „vándorlás” monitorozásához géltöltő festéket alkalmaztam (gel loading dye: 30%v/v glicerol, 0,25%w/v brómfenolkék festék). Az elektroforézishez készített mintaelegy 1 rész festéket és 5 rész izolált DNS oldatot tartalmazott. Az elektroforézis paraméterei: 40 min és 90 V az 1% agaróz gél esetén, míg 50 min és 70 V a 3% agaróz gél esetén. Elektroforézis után a gélt GelRed® festékkoldatban utófestettem, a gyártó erre vonatkozó ajánlásának megfelelő hígításban. Az inkubáció 30 percen keresztül, óvatos rázatás mellett történt. Ezt követően a gélt UV fény alá helyeztem, majd egy géldokumentációs kamerarendszerrel kiértékeltem a kapott gélképet.

4.9.3. Restriktációs endonukleázokkal történő reakciók

A pBAD24 plazmid DNS-re specifikus restriktációs enzimek közül az AgeI és AseI enzimek kerültek alkalmazásra, melyek optimális működési és hasítási hőmérséklete 37 °C. A reakciókat FastDigest™ (gyors reakcióidejű) pufferben, 5 min inkubációval végeztem, a szükséges hőmérsékletet vízfürdő segítségével biztosítva. A restriktációs reakciókat ezt követően 65 °C-on, 10 min inkubációval inaktiváltam thermoblock készülékben.

4.9.4. qPCR

A qPCR-t 96 lyukú lemezben (96-well plate) végeztem. Egy mintahely (well) 5 ng DNS templátot, 1× töménységű Master Mixet (DNS-polimeráz, MgCl₂, dNTP (dezinukleozid-trifoszfát), tárolásra alkalmas puffer), 0,4 μM forward primert, 0,4 μM reverse primert és 0,5× töménységű fluoreszcens PCR festéket tartalmazott. A PCR festék egy SYTO9 festékanalóg, amelynek az excitációs maximuma 485 nm, az emissziós maximuma pedig 498 nm. A festék az Azure Cielo™ Real-Time PCR készülék SYBR/FAM csatornájával gerjeszthető.

A pBAD24 pDNS-t tartalmazó reakciókban az ampicillin promóter forward primert és az ampicillin reverse primert használtam, amelyek a plazmid templátra specifikusak. A gDNS templátot tartalmazó qPCR reakciókban pedig bakteriális genomra specifikus primereket alkalmaztam, melyeket részletesen majd az 5.9.1. alfejezetben ismertetek. A qPCR reakciók általános lépései a 2. táblázatban olvashatók.

2. táblázat. A qPCR lépései és azok leírása. A 2. és 3. lépések ciklusosan ismétlődnek 45-ször annak érdekében, hogy a detektor által mérhető mennyiségű DNS keletkezzen a kezdeti DNS templát fragmentumaiból.

	Lépés	Hőmérséklet	Idő	Lezajló folyamat
1 ciklus	1.	95 °C	60 s	denaturáció
45 ciklus	2.	95 °C	20 s	denaturáció
	3.	60 °C	30 s	primerek bekötődése, DNS szintézis

4.9.5. Bakteriális transzformálás

Három különböző bakteriális transzformálást végeztem, amelyek során az alábbi mágneses nanorészecskékkel és izolálási protokollokkal előállított plazmid mintákat alkalmaztam:

MgFe₂O₄-NH₂ – 1. protokoll (Tris-HCl),

MnFe₂O₄ – 2. protokoll (PB),

NiFe₂O₄ – 3. protokoll (Tris-HCl, NaCl).

Ennek eredményeként mindhárom különböző fém-ferrit-alapú nanorészecske-típus és mindhárom izolálási protokollal kinyert pDNS transzformálásban való alkalmazhatósága tesztelésre került. A transzformálást kémiai módszerrel, hősokk alkalmazásával végeztem *E. coli* JM109 kompetens sejtekben. A kompetens sejteket jégen olvasztottam ki, majd 100 µL sejtszuszpenzióhoz 5 µL pBAD24 mintát adtam. A pBAD24 plazmid ampicillin-rezisztenciagént tartalmaz, ezért a transzformált sejtek szelekciója ampicillin-tartalmú táptalajon történt. Pozitív kontrollként kereskedelmi forgalomban kapható, affinitásoszlop-alapú izoláló készlettel kinyert pBAD24 mintát alkalmaztam [142]. A transzformált sejtekből 100-100 µL-t 0,1 mg/mL ampicillint tartalmazó, előmelegített (37 °C) agarlemezre oltottam, melyeket 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltam. A táptalajon megjelenő baktériumtelepek jelenléte a transzformálás sikerességét jelezte, és azt igazolta, hogy az izolált plazmidok funkcionálisan ép állapotban voltak. A további megerősítés érdekében minden lemezről egy-egy telepet ampicillin-tartalmú LB tápfolyadékba oltottam, majd a felnőtt sejtkultúrákból pDNS-izolálást végeztem. Az újraizolált plazmid mintát agaróz gélelektroforézissel elemeztem, amely során a pBAD24-nek megfelelő méretű DNS sáv megjelenése egyértelműen alátámasztotta a transzformálás sikerességét.

4.9.6. pDNS-izolálás komplex biológiai mátrixból MgFe₂O₄-NH₂ mágneses nanorészecskékkel

Éjszakán át (~16 h) tenyésztett, pBAD24 plazmidot tartalmazó *Escherichia coli* sejtekből 5 mL szuszpenziót azonos térfogatú, enyhe vörösvértest-szennyezettséget mutató, humán vérszérummal elegyítettem. A keverékből vortexelést és centrifugálást követően az aminoszubsztanciák funkcionális magnézium-ferrit nanorészecskékkel és az 1. Tris-HCl protokoll

alkalmazásával pDNS-extrakciót végeztem. Az izolált DNS minták koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás módszerrel értékeltem, ezt követően pedig agaróz gélelektroforézissel elemeztem.

4.10. Statisztikai próbák

A statisztikai elemzés során azt vizsgáltam, hogy a különböző MNP-protokoll kombinációkhoz tartozó DNS koncentrációk és a qPCR ciklusszám (Cq) értékek között kimutatható-e statisztikailag szignifikáns különbség. Az elemzéshez kilenc, eltérő MNP-protokoll kombinációt vettem figyelembe, amelyek mindegyikéhez három párhuzamos izolálásból származó mérési adat állt rendelkezésre. A statisztikai összehasonlíthatóság biztosítása érdekében, mivel a rendelkezésre álló kísérleti adatok csoportonkénti elemszáma alacsony volt, a mért adatok átlag- és szórásértékei alapján csoportonként további, normáeloszlást feltételező szimulált adatpontokat generáltam. Így minden MNP-protokoll kombinációhoz összesen tíz adatpont állt rendelkezésre (a szimulált adatok kizárólag a statisztikai próba alkalmazhatóságát szolgálták).

A DNS koncentrációk és a Cq értékek csoportok közötti összehasonlítására nemparaméteres Kruskal-Wallis próbát alkalmaztam annak megállapítására, hogy a vizsgált csoportok között fennáll-e statisztikailag szignifikáns eltérés. A statisztikai elemzéseket Python programnyelvben, a NumPy és SciPy könyvtárak felhasználásával, a Google Colab környezetben végeztem el.

4.11. Genomi DNS-izolálási protokoll amino-funkcionalizált MgFe₂O₄ mágneses nanorészecskékkel

A gDNS-izolálási protokoll kidolgozása során több, egymást kiegészítő forrást vettem figyelembe. Ezek közé tartoztak a Qiagen által kiadott *Genomic DNA Handbook*, [143]), a <https://bomb.bio/protocols> weboldalon elérhető, MNP-alapú izolálási protokollok, valamint a Zymo Research (*Quick DNA Magbead Plus Kit*, [144]) és az Omega Bio-tek (*E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit* [145]) kereskedelmi gDNS-izoláló készleteihez tartozó módszertani leírások. Emellett olyan szakirodalmi közleményeket is áttekintettem, amelyek bakteriális gDNS-kinyerésével foglalkoznak, különös tekintettel azokra, amelyek az extrakció során mágneses nanorészecskék alkalmazását írják le [87,101,108,146–150]. A különböző protokollok és pufferösszetételek elemzését és adaptálását követően egy olyan, optimalizált eljárást dolgoztam ki, amely megbízható és reprodukálható módon alkalmas mind Gram-negatív (G⁻), mind Gram-pozitív (G⁺) baktériumok genomi DNS-ének izolálására. Az alkalmazott protokoll lépéseit az alábbiakban ismertetem:

- egy éjszakán át, az adott baktériumfajnak megfelelő hőmérsékleten tenyésztett sejtszuszpenzióból 5 mL-t centrifugáltam (5 min, 6000 ×g);
- a felülúszót dekantáltam, a sejtpelletet 500 µL **1-es pufferben** (50 mM tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 0,5%v/v Tween 20) szuszpendáltam;
- a mintához hozzáadtam:
 - 0,2 mg/mL RNázt, amely a sejtekből felszabaduló RNS-t bontja le, megakadályozva, hogy beszennyezze a DNS-extraktumot, ezáltal tisztább DNS-t eredményezve [151],
 - 1,8 mg/mL lizozimot, amely a bakteriális sejtmembrán peptidoglikán rétegét bontja, és főleg a Gram-pozitív fajok esetében fontos, hiszen esetükben vastagabb a peptidoglikán réteg (a lizozim a $\beta(1 \rightarrow 4)$ kötést hidrolizálja az *N*-acetyl-muraminsav és *N*-acetyl-glükózamin között, ezáltal gyengítve a bakteriális sejtmembránt és elősegítve annak megbomlását a sejtlízis során) [152],
 - 1,1 mg/mL proteináz K-t, amely általánosan minden fehérje szerkezetét bontja, többek között a DNS degradációjában szerepet játszó DNáz enzimfehérjékét is [146];
- az elegyet 37 °C-on inkubáltam (30 min). Általánosan elmondható, hogy az előző lépésben a mintához hozzáadott enzimek (RNáz, lizozim, proteináz K) optimális működési hőmérséklete 37 °C. A 30 min pedig azért fontos, hogy legyen minden enzimnek elegendő ideje a hatékony és teljes működéshez [2];
- a sejtlizátumhoz 175 µL **2-es puffert** (3 M g-HCl, 20%v/v Tween 20) adtam, és 50 °C-on 30 percig inkubáltam, ami azért fontos, mert a membrán felbomlása, annak szolubilizálása, és a fehérjék denaturálása hatékonyabb 50 °C-on, továbbá ezen a hőmérsékleten történő inkubáció segít a DNS foszfátgerincének feltárásában, amely a következő lépésben elektrosztatikus interakcióba lép a felületen pozitív töltésekkel rendelkező mágneses nanorészecskékkel [2,3];
- a mágneses nanorészecske diszperziót **kötő pufferben** (2,5 M NaCl; 10 mM tris-HCl pH 4,0; 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20) készítettem el úgy, hogy a mintához adva a végső MNP koncentráció 10 mg/mL legyen;
- rotátorban 5 percig szobahőmérsékleten forgattam az Eppendorf csövet, hogy az adszorpció minél homogénebb közegben, minél hatékonyabb legyen;

- a csövet mágneses tartóba helyeztem, és miután a nanorészecske-DNS pellet a mágneshez rendeződött, tiszta felülúszót hagyva maga után, a felülúszó folyadékot pipetta segítségével eltávolítottam;
- mosási lépések következtek: 300 μ L 96% etanolt adtam a részecskékhez, vortexeltem a mintát és visszatettem a mágneses tartóra. A felülúszót eltávolítottam, majd 300 μ L 80%-os etanolt alkalmazva kétszer megismételtem ezt a lépést;
- rövid centrifugálást követően a pellet az Eppendorf cső aljában összegyűlt, elkülönülve a maradék folyadéktól. Majd mágneses tartóra helyeztem a csöveket és a visszamaradt etanolt pipettával eltávolítottam;
- nyitott tetővel 37 °C-os inkubátorba helyeztem a csöveket és 15 percig hagytam, hogy az a folyadék, amit pipettával nem lehet eltávolítani, elpárologjon. Az etanol teljes eltávolítása azért is fontos lépés, mert ha a gélelektroforézis során a DNS minta alkoholt is tartalmaz, akkor a DNS nem marad benne a gél mintafelvívő zsebében, ezzel ellehetetlenítve az izolálás elektroforetikus ellenőrzését;
- a szárítást követően a pelletet **elúciós pufferben** (5 mM tris-(hidroximetil)-aminometán (röviden: tris-bázis) pH 10,0) szuszpendáltam, mágneses tartón pedig a nanorészecskék szétváltak a gDNS-t tartalmazó elúciós frakciótól;
- az eluátumot egy tiszta csőbe pipettáztam, a gDNS mintát azonnal felhasználtam downstream folyamatokban, vagy -20 °C-on tároltam felhasználásig.

Fontos hangsúlyozni, hogy a bemutatott eljárás újdonsága nem az egyes lízis- vagy mosási lépések önálló alkalmazásában rejlik, hanem annak kísérletes igazolása, hogy a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ mágneses nanorészecskék megfelelő körülmények mellett alkalmasak bakteriális genomi DNS izolálására, beleértve Gram-negatív és Gram-pozitív fajokat is.

4.11.1. Az alkalmazott pufferek szerepe a mágneses nanorészecskékkel történő gDNS-izolálásban

1-es puffer (50 mM tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 0,5%v/v Tween 20): Reszuszpéndáló puffer, amelyben a tris-HCl fenntartja a pH-t (8,0), amely a DNS stabilitáshoz szükséges, hiszen a molekula enyhén alkalikus pH-n a legstabilabb, ugyanakkor sok enzim, például a DNáz ilyen pH-n kevésbé aktív [153]. A pufferben lévő EDTA kelátorként funkcionál, amely bivalens fémionokat köt meg, mint például Mg^{2+} -ot vagy Ca^{2+} -ot. Ezen ionok fontos kofaktorai a nukleinsavat bontó enzimeknek (pl. DNázoknak), melyek EDTA általi megkötése gátolja a nukleáz-aktivitást, megvédve ezáltal

a DNS-t a lebontástól [154]. A Tween 20 (más néven polioxietilén(20)-szorbitán-laurát) egy nemionos detergens, mely megbontja a sejtmembránban lévő lipid-lipid és lipid-protein kölcsönhatásokat, ezzel segítve a lízist és a fehérjék oldatban tartását, ezáltal pedig növeli a membrán permeabilitását. Ez elősegíti a sejtkomponensek felszabadulását (a DNS-t is beleértve) az extrakciós folyamat során [155].

2-es puffer (3 M guanidin-HCl (g-HCl), 20%v/v Tween 20): A g-HCl egy erős kaotróp ágens, amely a nemkovalens kötések destabilizálásán keresztül elősegíti a fehérjék denaturációját, inaktiválja a nukleázokat, valamint megbontja a DNS-hez asszociált makromolekuláris komplexeket. A kaotróp környezet hatására a DNS felszabadul a hozzá asszociált fehérjétől (pl. nukleoid fehérjétől), és a vizes közegben olyan konformációba kerül, amely kedvez a szilárd fázishoz (mágneses nanorészecskékhez) való hatékony kötődésnek [74].

Kötő puffer (2,5 M NaCl; 10 mM tris-HCl pH 4,0; 1 mM EDTA; 20%w/v PEG 6000; 0,05%v/v Tween 20): A magas ionerősség árnyékolja a DNS foszfátgerincének negatív töltéseit, csökkenti az elektrosztatikus taszítást, és elősegíti a DNS felülethez közelítését és adszorpcióját [156]. A 4-es pH-jú tris-HCl-nak pufferelő hatása van, a savas pH fokozza az aminos csoportok protonáltságát a mágneses nanorészecske felületén, növelve a pozitív töltésű kötőhelyek arányát, ami kedvez az adszorpciónak [157]. A PEG 6000 jelenléte csökkenti a DNS oldatbeli kiterjedtségét, elősegíti annak kondenzációját, és ezáltal növeli a szilárd fázishoz történő kötődés hatékonyságát [127].

Elúciós puffer (5 mM tris-bázis pH 10,0): Fontos, hogy az elúciós puffer alacsony ionerősségű és detergens-mentes legyen, mivel a detergens-maradékok gátolhatják a downstream enzimes reakciókat (pl. PCR, qPCR). A magasabb pH csökkenti a nanorészecske-felület protonáltságát, ezáltal gyengíti az elektrosztatikus kölcsönhatásokat a DNS és MNP-k között, és elősegíti a DNS deszorpcióját a nanorészecskék felületéről [14].

4.12. RNS-izolálási protokoll kidolgozása MgFe₂O₄-NH₂ nanorészecskékkel

Kutatásaim során amino-funkcionalizált magnézium-ferrit MNP-eket alkalmaztam bakteriális sejtekből történő RNS-izolálására, mint a DNS mellett egy másik vizsgált nukleinsav-típus kinyerésére alkalmas szilárd fázis. Az extrakció lépéseit a kereskedelmi forgalomban lévő, *Mag-Bind Total RNA 96 Kit* (Omega Bio-tek) nevű készlet alapján dolgoztam ki, amelyet referenciaként alkalmaztam, és pozitív kontrollként használtam az izolálási hatékonyság értékeléséhez. A kit protokollja azonban a felhasznált pufferek receptjeit nem ismerteti, ezért a pufferösszetételek meghatározásához szakirodalmi

forrásokat vettem figyelembe, és azok alapján dolgoztam ki az oldatok összetételét [2,74,78,158–161]. A kidolgozott, részletes protokoll az alábbiakban olvasható, amelyet RNáz-mentesített eszközökkel és munkakörnyezetben végeztem:

- egy éjszakán át tenyésztett *E. coli* baktériumkultúrából 2 mL-t lecentrifugáltam (6000×g, 5 min);
- a pelletet 470 µL **lízis pufferben** (4 M guanidium-tiocianát (GTC); 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1%v/v Triton-X 100; 10 mM ditiotreitól (DTT)) szuszpendáltam, majd hozzáadtam 0,8 mg/mL proteináz K-t. Ebben a lépésben történik a baktériumsejtek membránjának megbontása és a fehérjék denaturálása;
- centrifugáltam a mintát (9000×g, 5 min), hogy a kicsapódott sejtalkotókat elkülönítsem a folyadékfázistól;
- 400 µL felülúszót óvatosan átpipettáztam egy tiszta Eppendorf csőbe úgy, hogy lehetőség szerint a felhőszerű pellet ne kerüljön átvitelre. A felülúszó tartalmazta az izolálni kívánt RNS-t;
- 300 µL abszolút etanolt és 127 µL 13 mg/mL koncentrációjú MNP diszperziót adtam a mintához, így a mágneses nanorészecskék végkoncentrációja 2 mg/mL lett. Az etanol dehidratáló hatású vegyszer, részben eltávolítja az RNS-t és MNP-felszín körülvevő hidrátburkot, amely lehetővé teszi a nemkovalens kölcsönhatások kialakulását a nukleinsav és a nanorészecske között [162];
- thermoblockban inkubáltam (20 °C, 5 min, 1500 rpm);
- mágneses tartóra helyeztem a mintát, és amint a nanorészecskék (a rajtuk adszorbeált nukleinsavval) a mágneshez rendeződtek, a felülúszó folyadék pedig kitisztult, pipetta segítségével eltávolítottam a folyadékot;
- 400 µL **1-es mosó puffert** (800 mM g-HCl; 50% etanol; 20 mM tris-HCl pH 7,5) adtam a pallethez, 20× szuszpendáltam, majd mágneses tartóra helyeztem. Ezen első mosási lépés során a g-HCl a kaotróp, alacsony hidratációs környezet fenntartásával biztosítja a nukleinsavak mágneses nanorészecskékhez való kötődésének megmaradását, és ezzel egyidejűleg denaturálja a visszamaradt fehérjéket, valamint inaktiválja az RNázokat. Az etanollal együtt lehetővé teszi a szennyező komponensek hatékony eltávolítását anélkül, hogy az RNS eluálódna [163];
- a felülúszót eltávolítottam, röviden lecentrifugáltam a mintát, hogy a maradék folyadékot is el tudjam távolítani, majd nyitott tetővel (de alufóliával letakarva az esetleges szennyezők miatt), szobahőmérsékleten hagytam kiszáradni a

nanorészecskéket (10 min). Ezen a ponton a nanorészecskék fajlagos felületére nemcsak RNS, hanem DNS molekulák is adszorbeálva vannak;

- 100 μ L **elúciós puffer**ben (gyártói puffer [164], amely helyettesíthető RNáz mentes vízzel vagy TE (tris-EDTA) pufferrel) szuszpendáltam az MNP-t. Ebben az elúciós lépésben a cél nem a nukleinsavak végleges leválasztása az MNP-ről, hanem a közöttük lévő nemkovalens kötések gyengítése egy ideiglenes deszorpcióhoz és a DNS hozzáférhetőségének elérése. A továbbiakban alkalmazott DNS-t emésztő enzim működéséhez ugyanis a DNS-nek részben oldatban kell lennie, hogy az enzim hatékonyan hozzáférhessen;
- inkubálás (rázó thermoblock, 20 °C, 5 min, 1500 rpm). Itt a DNS és RNS is részben deszorbeálódik a részecskékről;
- a mintához 50 μ L DNáz **emésztő puffert** (10 mM tris-HCl pH 7,6; 2,5 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂) és 2 μ L DNáz I enzimet adtam, majd szobahőmérsékleten inkubáltam (10 min);
- 150 μ L **2-es mosó puffert** (45% etanol; 10 mM tris-HCl pH 7,5; 3,24 M GTC) adtam a mintához és 1 percig alacsony fordulatszámon (kb. 5000 rpm) vortexeltem;
- hozzáadtam 300 μ L **3-as mosó puffert** (80% etanol) és 20 \times szuszpendáltam;
- inkubálás: thermoblock, szobahőmérséklet (20-22 °C), 10 min, 1500 rpm. A DNáz kezelést követő, GTC- és etanoltartalmú mosási lépés célja az RNS readszorpciója a nanorészecskék felületére, miközben az említett vegyszerek hatékonyan eltávolítják a DNáz enzimet, a divalens kationokat és a DNS-emésztés termékeit, előkészítve a tiszta, végső elúciót [163];
- mágneses tartóra helyeztem, a felülúszót eltávolítottam;
- 400 μ L 3-as mosó puffert adtam hozzá ismét, és 20 \times szuszpendáltam, majd mágneses szeparálás következett és újra a nanorészecskék kiszárítása;
- 100 μ L **elúciós puffer**ben szuszpendáltam az MNP-t, majd 5 percig 1500 rpm-en rázattam, 20 °C-on;
- az utolsó lépés ismét egy mágneses elválasztás, amelynek során megtörtént az RNS molekulák deszorpciója a nanorészecskék felületéről;
- az RNS-t tartalmazó elúciós frakciót tiszta csőbe pipettáztam, és további felhasználásig -76 °C-on tároltam.

4.12.1. Az alkalmazott vegyszerek szerepe a nanorészecskékkel történő RNS-izolálásban

Az RNS-izolálás során alkalmazott pufferek és komponensek működési elvei részben megegyeznek a DNS-izolálásnál ismertetett mechanizmusokkal (denaturáció, nukleáz-inaktiválás, szilárd fázisú kötés). Az alábbiakban ezért kizárólag az RNS-izolálás szempontjából kritikus, specifikus komponensek szerepét tárgyalom.

GTC és g-HCl: erősen denaturáló kaotróp szerek, amelyek azonnal denaturálják a fehérjéket, köztük az RNázokat, ezáltal védve a kinyerni kívánt RNS molekulákat [96]

Triton-X 100: polietilén-glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil-éter, nemionos detergens, amely oldja a bakteriális membrán lipidjeit, ezáltal növelve a lízis hatékonyságát

DTT: erős redukálószer, amely a fehérjék denaturációját idézi elő a diszulfid-hidak redukálásával (RNáz enzimekben is) [165]

Proteináz K: a fehérjeszennyeződés eliminálását segíti a fehérjék lebontásával; a proteináz K stabil molekula, GTC jelenlétében is aktív és intakt marad, ugyanígy a DTT jelenlétében, ugyanis az enzim kevés (pontosan két) diszulfid-hidat tartalmaz, amely a DTT célpontja [166]

DNáz I enzim: a dsDNS és ssDNS molekulák specifikus lebontó enzime

MgCl₂: a DNáz I kofaktora, az enzim Mg²⁺ ion nélkül inaktív [167]

CaCl₂: a DNáz I enzimnek Ca²⁺ ion kötőhelye is van, amely segít az enzim szerkezetét stabilizálni [167]

4.13. Az extrahált RNS minták RT-PCR folyamata

4.13.1. Reverz transzkripció (RT)

A saját fejlesztésű, MNP-alapú protokollal izolált RNS minták közül kettőt használtam fel (1. és 2. minta), illetve egy kereskedelmi készlettel izolált mintát, amely pozitív kontrollként (PC) szolgált. A pozitív kontrollal előzetesen elvégeztem egy RT-PCR-t, hogy megbizonyosodjak az izolálás sikerességéről.

1. A *TranscriptMe RNA Kit* komponenseit összemértem a gyártói utasítás alapján az alábbi sorrendben, egy steril nukleáz-mentes Eppendorf csőbe, melyet jégen tartottam:

- 10 µL 2× RT Master Mix
- 2 µL TranscriptME Enzyme Mix
- 8 µL RNS minta (ez a térfogat mindig egységesen ugyanennyi volt, ezért a benne lévő RNS mennyiség változó volt, a magnézium-ferrit nanorészecskékkel izolált minták esetében 0,10 – 0,14 µg, míg a kereskedelmi készlettel izolált mintánál ~2 µg)

2. Óvatosan összekevertem az elegyet, majd 25 °C-on inkubáltam (10 min).

3. Újabb inkubálás következett: 50 °C, 30 min.
4. Hozzáadtam 1 µL RNáz H-t (amely a keletkezett RNS-cDNS hibridek szétbontását katalizálta), majd 37 °C, 20 min.
5. A reakció leállításához 85 °C-on inkubáltam az elegyet (5 min), utána egyből jégre tettem.

4.13.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR reakciókhoz a 3. táblázatban lévő koncentrációk és térfogatok alapján mértem össze a komponenseket. Az 1. és 2. minták különböző RNS-izolálásból származó, reverz transzkripcióval átírt cDNS templátokat tartalmaztak, míg a pozitív kontroll (PC) reakcióba a kereskedelmi készlettel izolált RNS-ről származó komplementer DNS-t pipettáztam. A negatív kontrollok vagy cDNS templátot (NTC), vagy pedig primereket (NPC) nem tartalmaztak, melyek hiányában a reakció nem mehet végbe.

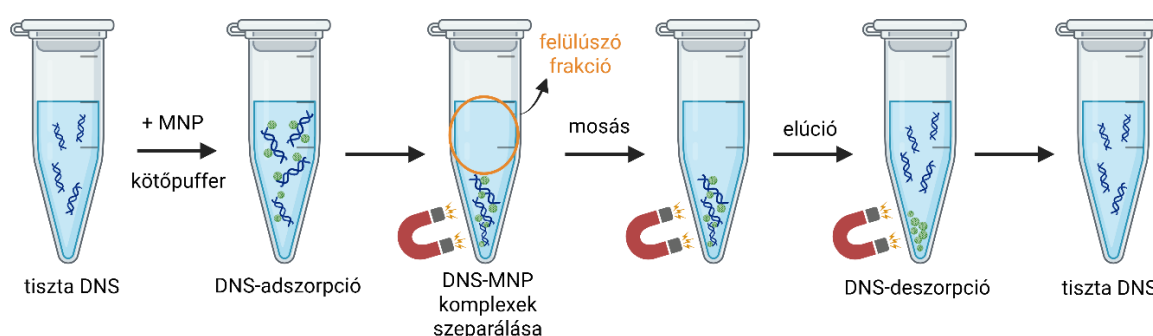
3. táblázat. A PCR reakció komponensei a nanorészecskékkel izolált RNS-ről származó komplementer DNS (cDNS) specifikus szekvenciájának amplifikálására

	PC	1. minta	2. minta	NTC	NPC
	végkoncentráció				
10× TaqNovaHS reakciópuffer	1×				
50 mM MgCl ₂	1,5 mM				
2 U/µL TaqNova DNS-polimeráz	1 U				
40 mM dNTP	0,8 mM				
10 µM <i>uidA</i> forward primer	0,2 µM				–
10 µM <i>uidA</i> reverse primer	0,2 µM				–
cDNS templát	2,5 µL térfogat			–	
PCR tisztaságú víz	50 µL-re kiegészítve				

5. Eredmények

5.1. A MnFe_2O_4 MNP reverzibilis DNS kötési tesztje

A kutatás kezdeti szakaszában szükséges volt a mangán-ferrit nanorészecskék felületén történő DNS-kötés reverzibilitását vizsgálni egy olyan egyszerű rendszerben, amely biztosan tiszta (kereskedelmi készlettel izolált) DNS oldatot tartalmaz. Ez azért volt fontos, mert lehetővé tette a nanorészecske-DNS kölcsönhatások alapvető jellemzését a komplex biológiai minták zavaró hatásai nélkül, és alapot teremtett az adott, valamint a továbbiakban tesztelt nanorészecskékkel végzett nukleinsav-izolálási vizsgálatokhoz.

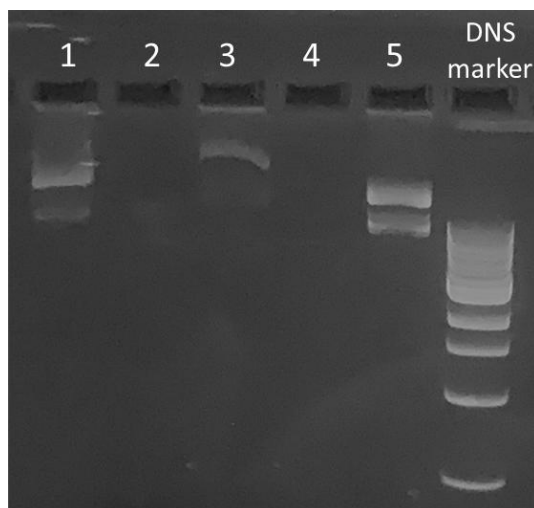


7. ábra. A mágneses nanorészecskék reverzibilis DNS-kötési tesztjének sémája

A mangán-ferrit DNS-sel való kölcsönhatásának meglétét a 4.3. alfejezetben ismertetett protokoll szerint végeztem (7. ábra). A vizsgálat megismételhetőségét legalább 3 párhuzamos kísérlettel ellenőriztem. Negatív kontrollként DNS-mentes tisztítási folyamatot végeztem, amely során a nanorészecskékhez DNS minta helyett desztillált vizet pipettáztam. A 8. ábra mutatja az elvégzett teszt eredményét. Az 1-es oszlop a kiindulási, tiszta DNS oldatra jellemző fluoreszcens sávokat mutatja, 2-es és 3-as oszlopok a reverzibilis megkötési teszt felülúszó frakcióit jelölik (7. ábra, narancssárgával jelölt frakciója). A víz-MNP reakciókból származó felülúszó mintánál nem volt fluoreszcens jel, míg a DNS tartalmú oldattal végzett reverzibilis kötési tesztből származó felülúszónál egy halvány fluoreszcens jel volt látható, amit némi, a felülúszó frakcióban visszamaradt (MNP-hez nem kötődött) DNS okoz. Ez egyrészt utalhat arra, hogy a mágneses nanorészecskék mennyisége kevés a kiindulási örökítőanyag megkötéséhez, másrészt arra is, hogy a kötő puffer összetétele (pl. sótartalma) nem teljesen megfelelő az adszorpcióhoz. A gélkép 4. oszlopa a víz-MNP elúciós frakciót mutatja, ahol továbbra sem volt kimutatható fluoreszcens jel. Ez igazolja, hogy a MnFe_2O_4 nanorészecskék önmagukban nem lépnek kölcsönhatásba a fluoreszcens festékekkel. Ennek alapján megállapítható, hogy az agaróz gélen megjelenő fluoreszcens sáv

(8. ábra, 5. oszlop) kizárólag a nanorészecskékhez reverzibilisen kötődött, majd az elúció során felszabadított DNS jelenlétére vezethető vissza.

Ezzel a teszttel sikerült az elsődlegesen kitűzött célokat elérnem, azaz bebizonyítani, hogy a DNS molekulák megfelelő körülmények között képesek kötődni a MnFe_2O_4 nanorészecskékhez, majd pedig a körülmények megváltoztatásával leválni azokról. Ezt követően a komplex (bakteriális) közegből való izolálási protokoll fejlesztésére koncentráltam.



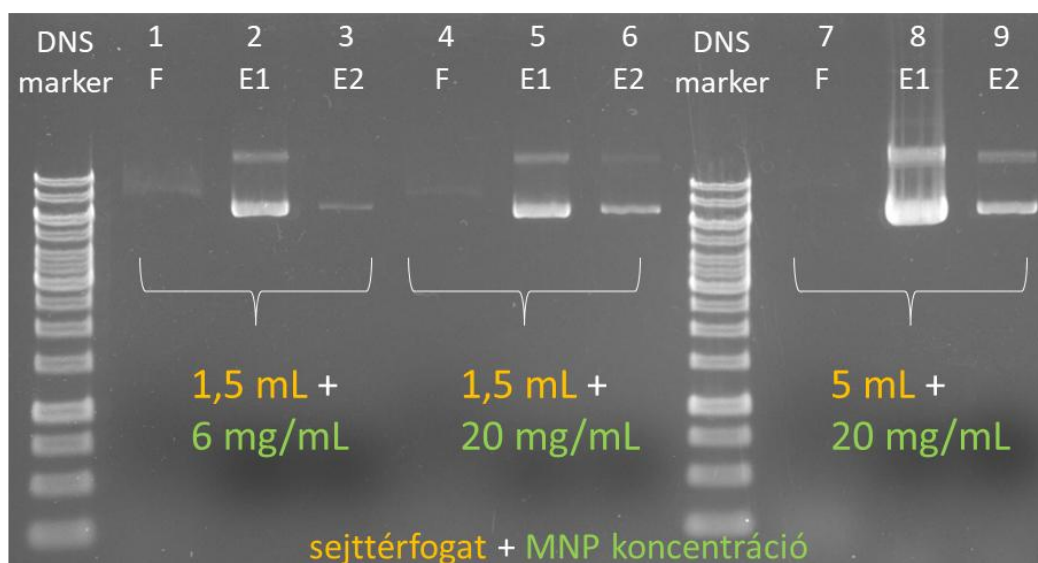
8. ábra. MnFe_2O_4 MNP-vel történő reverzibilis DNS kötési teszt eredménye. 1 – kiindulási DNS oldat, 2 – negatív kontroll felülúszója, 3 – MNP-DNS komplex felülúszója, 4 – negatív kontroll elúciója, 5 – DNS tisztítás elúciója, 1 kb DNS marker (Thermo Fisher Scientific)

5.2. A MnFe_2O_4 MNP-vel történő pDNS-izolálás és annak optimalizálása

A reverzibilis tesztek és az izolálás során többféle felülúszó frakció képződik. Ilyenek például az alkalmazott mosó puffer eltávolítása után kapott felülúszó frakciók, melyek nem kerülnek további felhasználásra, feldolgozásra. Az extrakciós protokoll első, kötő puffert tartalmazó felülúszóját azonban megtartom (7. ábra, narancssárgával jelölt frakció), hogy ellenőrizsem, elegendő-e az alkalmazott MNP mennyiség az éjszakán át növesztett, adott térfogatú *E. coli* sejtenyészetből kinyerhető teljes pDNS mennyiség extrakciójához. Ezt úgy lehet eldönteni, ha ennek a felülúszónak a DNS-tartalmát is ellenőrzöm gélelektroforézissel. A mangán-ferrit DNS-izoláló kapacitását 1,5 mL-es és 5 mL térfogatú sejtuszpenziókból, 6 mg/mL, illetve 20 mg/mL MNP koncentráció mellett teszteltem, ahol mind a térfogat, mind a nanorészecske koncentráció 3,33-szoros arányban változott. Az 1,5 mL-es térfogatot azért választottam, hogy beleférjen a leggyakrabban használt mikrocentrifuga csőbe, továbbá ez az a térfogat, amelyet a legtöbb kereskedelmi forgalomban elérhető DNS-izoláló készlet javasol [142,168]. A tesztek során minden MNP-DNS koncentrációnál két elúciós

lépést végeztem (E1 és E2), illetve megfuttattam az első, kötő puffert tartalmazó felülúszó frakciókat is.

A 6 mg/mL koncentrációjú MNP-vel történő izolálás során jó tisztaságú és detektálható mennyiségű pDNS-t sikerült kinyerni (4. táblázat). Csak kevés mennyiségű cél DNS maradt kötetlenül a DNS-MNP együttes inkubációja után, melyet a 9. ábra 1. oszlopában látható, halvány fluoreszcens sáv jelöl. Ha a kiindulási sejtmennyiség változatlan maradt (1,5 mL), de az MNP mennyiségét megnöveltem (20 mg/mL) (9. ábra, 4-6. oszlopok), 1,7-szer több pDNS-t izoláltam (az első és második elúciós lépésekben együttesen kinyert DNS mennyiséget tekintve): 6 mg/mL MNP-nél 4,78 μg -ot, illetve 20 mg/mL MNP-nél 8,06 μg DNS-t. Mivel a pBAD24 egy alacsony kópiaszámú plazmid, az extrakciós tesztekhez nagyobb kiindulási sejtmennyiség javasolt [169], ezért teszteltem az 5 mL-es starter kiindulási térfogatot, amely nagyon jó DNS kihozataalt biztosított, 5,7-szer többet (45,56 μg -ot a két elúcióból összesen), mint amennyi az 1,5 mL-es térfogatból ugyanennyi MNP-vel kinyerhető. Fontos megjegyezni, hogy ez utóbbi mennyiségek használata esetén a DNS-MNP koinkubációs lépést követően nem volt DNS veszteség (a felülúszó frakcióban egyedül itt nincs fluoreszcens sáv (9. ábra, 7. oszlop)).

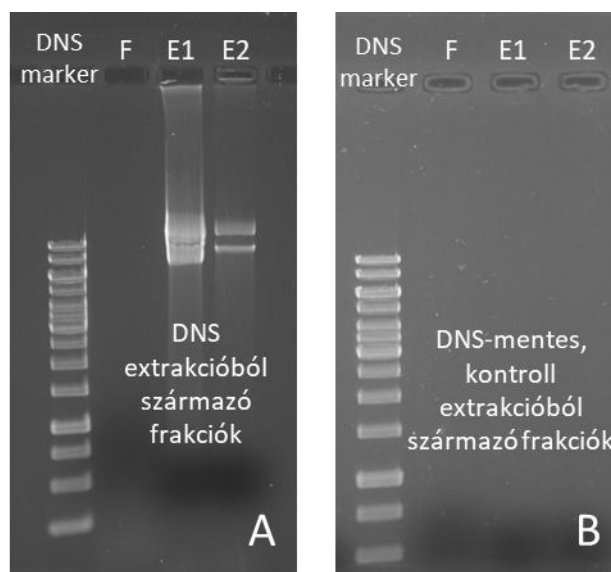


9. ábra. A MnFe_2O_4 DNS-kötő kapacitásának tesztjei. F = felülúszó, E1 = első elúció, E2 = második elúció

Ezekben a vizsgálatokban a marker elsősorban technikai kontrollként szolgál, amely az agaróz gél minőségét, valamint az elektroforézis beállításainak megfelelőségét igazolja, és nem a plazmidméret meghatározását célozza. Mivel a markersávokban nem volt megfigyelhető elmosódás vagy fogazott megjelenés, így megállapítható, hogy az alkalmazott agaróz gél homogén volt, és a futtatási paraméterek (feszültség, időtartam)

megfelelően kerültek megválasztásra, a géleképek technikai minősége alkalmas az ismertett kísérletek értelmezésére.

A pDNS-izolálási kísérletek *E. coli* sejtekből, a 4542 bp hosszúságú, cirkuláris pBAD24 plazmidmolekulák kinyerésével történtek [170]. A pDNS különböző topológiai formáinak köszönhetően a molekula eltérő pozíciókban jelenhet meg a gélen. Ennek megfelelően a pDNS gyakran a tényleges méretéhez tartozó sávnál magasabban fut, amint az a 10. ábra A részében is megfigyelhető. Itt az alsó sáv (10. ábra A rész E2 mintában lévő alsó sáv) vélhetően a plazmid szuperhelikális, szorosan zárt formája, mely egy kompaktabb szerkezetet jelent, ezért gyorsabban képes áthaladni az agaróz gél pórusain keresztül. A felső sáv lehet a plazmid multimer formája (pl. dimerek, trimerek), amely a gélen magasabban jelenik meg (10. ábra A rész, E2 mintában lévő felső sáv), mivel ez nagyobb, mint a monomer forma [171]. Ennek megfelelően, a pDNS-izolálás sikerességének igazolására bemutatott agaróz gélelektroforézis képek (8, 9, 10 és 11. ábrák) nem tartalmazzák a fluoreszcens markersávok pontos méretmegjelölését.



10. ábra. Agaróz gélelektroforézis kép a $MnFe_2O_4$ MNP-vel izolált pBAD24 pDNS-ről (A) és DNS-mentes negatív kontroll izolálási frakciók (B). F = felülúszó frakció, E1 és E2 = első és második elúciós frakciók

A 10. ábra alapján vizsgálataim azt mutatták, hogy 5 mL starter sejtszuszpenzióhoz 600 μ L 20 mg/mL kiindulási koncentrációjú MNP diszperzió elegendő és szükséges, hogy ne maradjon vissza kötetlen DNS. A tesztjeimhez alkalmazott *E. coli* sejtszuszpenzió átlagosan $3,8 \times 10^9$ sejt/mL sejtkoncentrációval rendelkezett.

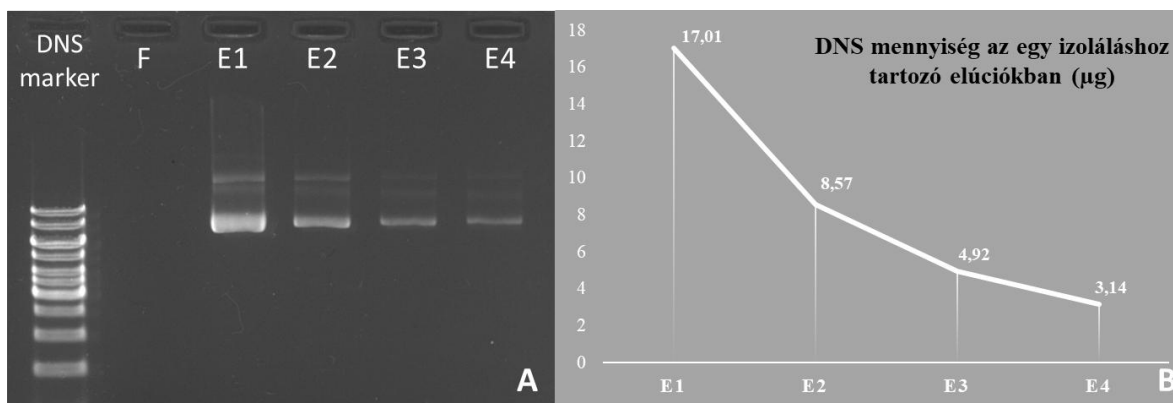
Az elúciók DNS koncentrációja az UV-Vis mérések alapján E1 esetén $390,6 \pm 41,55$ μ g/mL, és E2 esetén $178,77 \pm 16,06$ μ g/mL volt (4. táblázat). A DNS minta tisztasága (A_{260}/A_{280}) ebben az esetben $2,06 \pm 0,03$ (E1), illetve $2,09 \pm 0,05$ (E2) arányértékeket mutatott. Habár

ezek a számok minimálisan átlélik a tisztasági érték felső határát, az ide vonatkozó szakirodalom szerint ez nem jelent szignifikáns szennyeződést [172,173].

4. táblázat. A $MnFe_2O_4$ MNP-vel izolált pDNS minták koncentrációja [174]

Starter sejtusz- penzió térfogata (mL)	Kiindulási $MnFe_2O_4$ MNP konc. (mg/mL)	Az izolált pDNS koncentrációja az első elúcióban ($\mu\text{g/mL}$)	A_{260}/A_{280} (E1)	Az izolált pDNS koncentrációja a második elúcióban ($\mu\text{g/mL}$)	A_{260}/A_{280} (E2)
1,5	6	44,95 \pm 19,87	1,87 \pm 0,12	16,63 \pm 12,76	2,04 \pm 0,14
1,5	20	63,8 \pm 13,01	1,87 \pm 0,07	36,93 \pm 8,94	1,99 \pm 0,07
5	20	390,60 \pm 41,55	2,06 \pm 0,03	178,77 \pm 16,06	2,09 \pm 0,05

A következő vizsgálat az elúciós lépések számának meghatározására irányult, amellyel igazoltam, hogy bár még a második elúciós lépés után (E3, E4 frakciókban) is marad némi DNS a nanorészecskék felületéhez adszorbeálva, az első két lépésben olyan mennyiségű nukleinsavat sikerült kinyerni, hogy nem indokolt meghosszabbítani az extrakciós időt még két ismétlési lépéssel. Az első két eluálás során a tesztben összesen 25,58 μg tiszta DNS-t nyertem ki a bakteriális sejtekből (11. ábra, E1+E2), amely elegendő mennyiség minden általam végzett downstream molekuláris biológiai felhasználásra (pl. agaróz gélelektroforézis $\sim 0,5\text{--}1$ μg , qPCR $\sim 1\text{--}5$ ng, restrikciós endonukleázokkal történő emésztés $\sim 0,5$ μg DNS-t igényel), és azok többszöri megismétlésére is. A DNS koncentráció mérések, és az agaróz gélelektroforézis képek alapján megállapítható volt, hogy az extrakciós folyamat eredményeként kapott pDNS molekulák alkalmasak további, molekuláris biológiai folyamatokban való felhasználásra.



11. ábra. pDNS (pBAD24) izolálás $MnFe_2O_4$ MNP-vel, négy elúciós lépés beiktatásával (E1-E4), agaróz gélelektroforézisen ábrázolva (A), illetve DNS mennyiségekben ábrázolva (B). F = DNS adszorpció utáni felülúszó frakció

Az izolálási kísérletek során tapasztalt magas pDNS-hozam és jó tisztaság háttérében a mangán-ferrit nanorészecskék kedvező szerkezeti és felületi tulajdonságai állnak. Ezek megértése érdekében a következőkben bemutatom a $MnFe_2O_4$ nanorészecskék azon tulajdonságait, amelyek meghatározó szerepet játszanak a DNS-sel való kölcsönhatások kialakulásában. Fontos megjegyezni, hogy a nanorészecskék fizikai-kémiai jellemzését az együttműködő kutatócsoport végezte; az itt ismertetett adatok a velük közösen publikált, lektorált közleményből származnak, és a jelen doktori munka keretében a pDNS-izolálási eredmények értelmezését szolgálják.

Az XRD, TEM és HRTEM felvételei alapján a mangán-ferrit nanorészecskék átlagos mérete 11,2 nm, szerkezete egykristály, amely összhangban van az MNP szuperparamágneses viselkedésével. A kis részecskeméret nagy fajlagos felületet eredményez, ami elősegíti a DNS molekulákkal való hatékony kölcsönhatások kialakulását. A nanorészecskék további karakterizálása során kiderült, hogy a felületi hidroxil-csoportok (melyek jelenléte FTIR vizsgálattal igazolt) deprotonálódása miatt az elektrokinetikai potenciál negatív (-17 ± 6 mV). Ennek következtében a nanorészecskék vizes közegben elektrosztatikailag taszítják egymást, ami jó diszpergálhatóságot biztosít, és megakadályozza az aggregációt az izolálási lépések során [124].

Mivel a DNS és a nanorészecskék felülete egyaránt negatív töltésű, a DNS-kötés nem tisztán elektrosztatikus jellegű. A szakirodalom szerint a kölcsönhatást elsősorban a felületi hidroxil-csoportokon keresztül kialakuló hidrogénkötések és a hidratációs réteg közvetítette interakciók határozzák meg, amelyek hatékony, ugyanakkor reverzibilis DNS-adszorpciót tesznek lehetővé [71]. Ez a kölcsönhatási mechanizmus magyarázatot ad a kísérletek során tapasztalt magas pDNS-hozamra, a jó tisztaságra, és hogy a DNS hatékonyan eluálható

maradt a nanorészecskék felületéről anélkül, hogy jelentős mértékű nem specifikus szennyeződés társult volna hozzá.

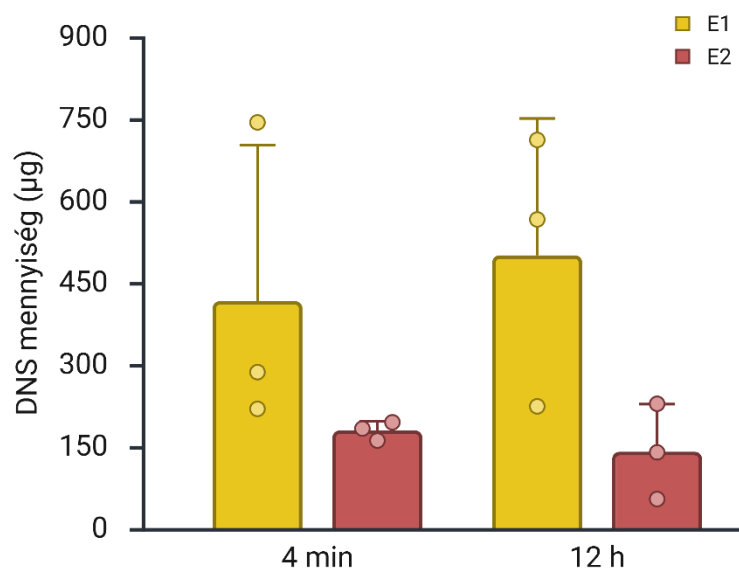
5.3. Bakteriális pDNS-izolálás $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel, és a különböző szintézismódszerrel készült MNP-k DNS-izoláló hatékonyságának összehasonlítása

A mangán-ferrit nanorészecskékkel végzett izolálási kísérletek alapján felmerült, hogy a nanorészecskék kémiai összetétele, felületkémiai módosítása és szintézismódszere jelentős hatással lehet a pDNS megkötésére és eluálására. Ennek vizsgálatára a következőkben $MgFe_2O_4-NH_2$ mágneses nanorészecskékkel végzett izolálási tesztek mutatnak be, valamint összehasonlítom a részben különböző szintézismódszerrel készült MNP-k DNS-izoláló hatékonyságát. A két, azonos kémiai összetételű ($MgFe_2O_4-NH_2$) MNP azonos koprecipitációs elven alapuló, szolvotermális szintézissel készült, Mg(II) és Fe(III) prekursorok felhasználásával, etanolamin jelenlétében, etilén-glikol oldószerben. Az egyik (konvencionális) módszer 12 órás reakcióidőt (felmelegítés és refluxálás, 12 h minta) alkalmazott, míg a másik, új típusú eljárás ezt a folyamatot egy 4 perces, mikrohullámmal kombinált szintézisre redukálta (4 min minta). A karakterizálás során a két nanorészecske hasonlóan bizonyult: átlagos részecskeméretük 37,8 nm (12 h) és 43,9 nm (4 min) volt [14], ami lehetővé tette a szintézismódszer DNS-izolálási hatékonyságára gyakorolt hatásának célzott vizsgálatát.

5. táblázat. A különböző szintézisidővel szintetizált $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-k DNS-izoláló hatékonysága

Elúciók	$MgFe_2O_4-NH_2$ (4 min)		12 h $MgFe_2O_4-NH_2$ (12 h)	
	DNS konc. ($\mu\text{g/mL}$)	A_{260}/A_{280}	DNS konc. ($\mu\text{g/mL}$)	A_{260}/A_{280}
E1	416,8 ± 285,35	1,92	500,83 ± 250,37	1,93
E2	180,13 ± 16,97	1,95	141,13 ± 87,21	1,83

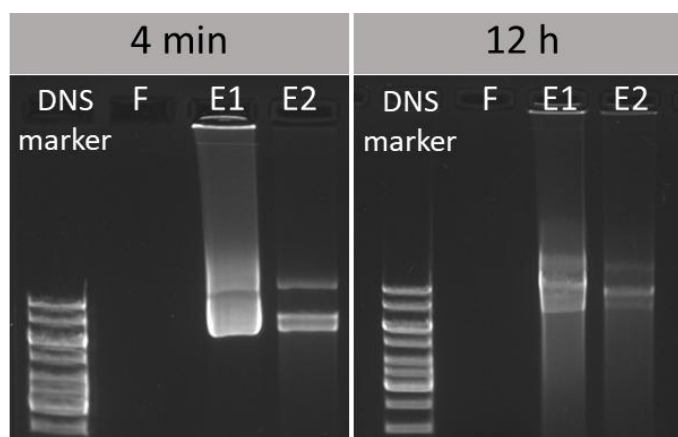
Az eredményekből az látható, hogy mindkét módon szintetizált nanorészecskével jó tisztaságú (A_{260}/A_{280} : 1,7 – 2,0 tartományba eső) és nagy mennyiségű pDNS nyerhető ki (5. táblázat, 12. ábra).



12. ábra. A különböző szintézisidejű (4 min, 12 h) $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskék DNS-izoláló hatékonyságának összehasonlítása a kinyert DNS mennyiségét tekintve. E1 = első elúciós frakció, E2 = második elúciós frakció

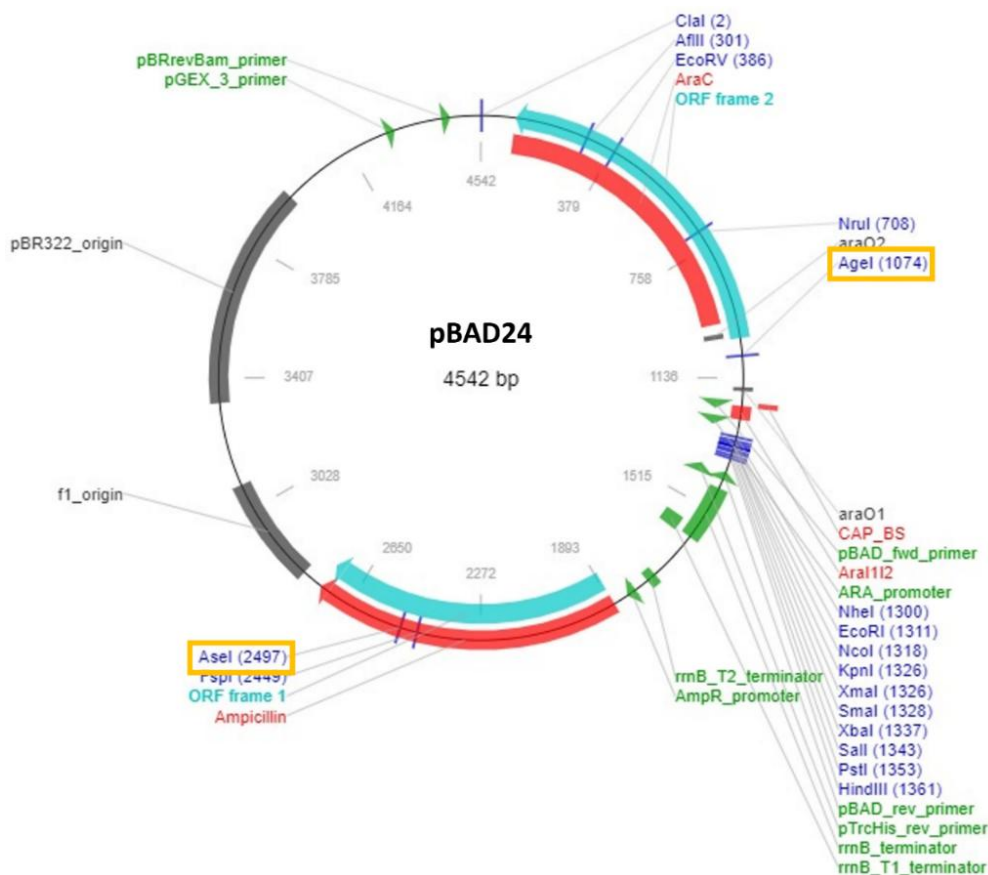
Ha az izolált DNS mennyiségét abszolút értékben (μg -ban kifejezve) vesszük figyelembe, vagyis az egyenként 80 μL térfogatú elúciós frakciókban található pDNS mennyiséget, akkor a 4 min mintával összesen átlagosan 47,75 μg pDNS-t sikerült kinyerni, míg a 12 h mintával 51,36 μg -ot (az E1 és E2 frakciókban mért DNS mennyiségek összege alapján, 12. ábra). A kereskedelmi forgalomban kapható, pozitív kontrollként alkalmazott, *Mag-Bind Ultra-Pure Plasmid DNA Kit* (Omega Bio-tek) nevű, mágneses nanorészecskéket alkalmazó plazmidizoláló készlet a gyártó szerint 50 μg magas kópiaszámú pDNS izolálására alkalmas 5 mL sejt kultúrából [131]. Ezzel összevetve az eredményeim azt igazolták, hogy az aminoszintetizált magnézium-ferrit MNP-vel kinyert pDNS-hozam összemérhető a kereskedelmi készlet maximális elméleti kihozatalával, még az alacsony kópiaszámú pBAD24 plazmid esetében is.

A kétféle MNP-vel kinyert pDNS agaróz gélelektroforézis képeit (egy-egy reprezentatív minta esetében) a 13. ábra mutatja. Az eredmények mind a DNS tisztasága, mind pedig mennyisége tekintetében nagyon hasonlóak, ami azt igazolja, hogy a magnézium-ferrit MNP-t érdemes a lényegesen rövidebb és egyszerűbb módszerrel szintetizálni, mivel DNS-izolálási hatékonysága összemérhető a 12 órás szintézisidejű, azonos összetételű nanorészecskéjével.



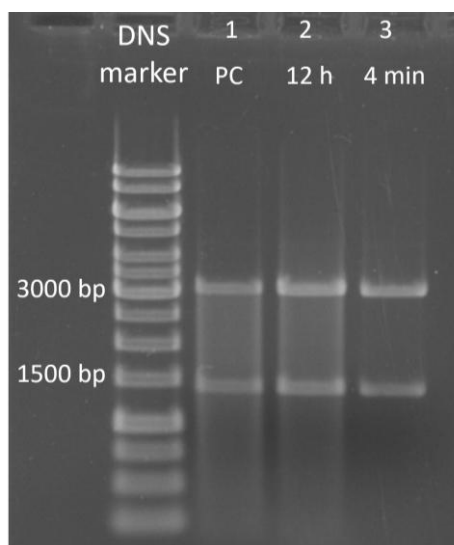
13. ábra. A különböző szintézisidejű $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP típusokkal (4 min, 12 h) végzett pDNS-izolálás egy-egy reprezentatív agaróz gélelektroforézis eredménye

Az izolált pDNS mennyiségi és tisztasági paramétereinek értékelését követően szükséges volt annak igazolása is, hogy a nanorészecskékkel kinyert DNS alkalmas további molekuláris biológiai alkalmazásokra. Ennek vizsgálatára emésztési kísérleteket végeztem restriktív endonukleázokkal. A restriktív endonukleázok által katalizált reakciókhoz két olyan enzimet használtam (AgeI és AseI), amelyek az *E. coli*-ból izolált pBAD24 plazmid duplaszálú DNS-ének cukor-foszfát gerincében található foszfodiészter kötést egy-egy specifikus hasítóhelyen hidrolizálják (14. ábra). Az AgeI endonukleáz a pDNS 1074. bázispárjánál hasít, míg az AseI a 2497. bázispárnál. A két enzim együttes alkalmazása a cirkuláris plazmid DNS-t két, jól definiált méretű fragmentumra hasítja: egy 1423 bp és egy 3119 bp hosszúságú szakaszra (15. ábra).



14. ábra. A 4542 bp hosszúságú pBAD24 cirkuláris plazmid restrikciós térképe az AgeI (1074 bp) és AseI (2497 bp) hasítóhelyeivel (narancssárga kerettel jelölve)

A 15. ábra 1. oszlopában látható a pozitív kontroll, amely egy kereskedelmi forgalomban kapható, MNP-alapú készlettel izolált pBAD24 szintén AgeI és AseI-gyel hasított formáját tartalmazza, majd pedig a 2. és 3. oszlopokban a 12 h és a 4 min minták emésztett formája látható.



15. ábra. A $MgFe_2O_4-NH_2$ (12 h) és $MgFe_2O_4-NH_2$ (4 min) MNP-vel izolált DNS minták alkalmazása restrikciós endonukleázok (AgeI és AseI) által katalizált reakcióban. PC = pozitív kontroll

A 15. ábra gélelektroforézis képén jelöltem a 3000 bp és 1500 bp méretű DNS fragmentumokat a DNS marker esetén. Jól látható, hogy a pozitív kontroll (PC) és a két, saját fejlesztésű protokollal izolált pBAD24 minták (12 h, 4 min) azonosan viselkedtek a restriktációs endonukleázok katalizálta reakcióban, továbbá a sávok a várt mérettartományban jelentek meg. Ez azt jelenti, hogy az extrahált pDNS minták megfelelő tisztaságúak és szerkezetileg épek voltak, így alkalmasak további molekuláris biológiai alkalmazásokra. Az eredmények alapján továbbá megállapítható, hogy a 12 h és 4 min szintézisidejű $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-k azonos hatékonysággal alkalmazhatók bakteriális DNS tisztításra, ezért költség- és energiahatékonysági szempontból célszerű a 4 min szintézisidejű nanorészecskék alkalmazása, amennyiben azokat DNS-kinyerésre és további vizsgálat elvégzésére használjuk.

A $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel kapcsolatos, a jelen alfejezetben leírt eredményeket nemzetközi folyóiratban publikáltuk, ezzel a szakirodalomban elsőként mutattuk be a magnézium-ferrit DNS-izolálásra való alkalmazhatóságát [14].

5.4. A 6 tesztelt mágneses nanorészecskével (MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$) történő pDNS-izolálás és a protokolloptimalizálás eredményei

A mangán- és magnézium-ferrit alapú mágneses nanorészecskékkel végzett pDNS-izolálási kísérletek eredményei igazolták, hogy a ferrit típusú MNP-k alkalmasak bakteriális plazmid hatékony kinyerésére, ugyanakkor rávilágítottak arra is, hogy az izolálás hatékonyságát az alkalmazott protokoll paraméterei befolyásolják. Ennek megfelelően ebben a fejezetben hat különböző ferrit-alapú mágneses nanorészecske (MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$) pDNS-izolálási teljesítményét hasonlítom össze több izolálási protokoll alkalmazásával, majd egy előre meghatározott kritériumrendszer alapján azonosítom a legkedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező MNP-protokoll kombinációt. Az alkalmazott protokollok elnevezése és leírása a 4.7. alfejezetben került összefoglalásra, röviden pedig a 6. táblázat leírásában. Az egyes nanorészecskékkel elvégzett pDNS-izolálást akkor tekintettem elfogadhatónak, ha az adott izolálási módszer háromszori ismétlés során a 4.8. alfejezetben részletezett kritériumoknak megfelelő eredményeket adott. A 6. táblázatban az X-szel jelölt cellák azt jelzik, hogy az MNP-protokoll kombináció estében az eredmények nem feleltek meg az előírt kritériumoknak, vagy az adott módszert nem alkalmaztam, mivel a döntési fa (4.8. fejezet, döntési fa 6. ábra) alapján a megelőző tesztek eredményei nem tettek eleget a meghatározott elvárásoknak. A

6. táblázat utolsó oszlopa összefoglaló jellegű, és minden egyes tesztelt mágneses nanorészecskére vonatkozóan jelzi, hogy a lehetséges 15 kritériumból (3 protokoll \times 5 kritérium) összesen hány teljesült.

6. táblázat. A pDNS-izoláláshoz társított hatékonysági kritériumok összegzése a 4.8. alfejezetben leírtak alapján (Konc. = koncentráció, AGE = agaróz gélelektroforézis, REáz = restrikciós endonukleáz). 1: Tris-HCl alapprotokoll; 2: foszfát pufferes eluálást alkalmazó protokoll (PB); 3: NaCl-mentes kötő pufferrel és NaCl-ot tartalmazó elúciós pufferrel végzett protokoll (Tris-HCl, NaCl).

DNS-izolálás MNP-vel	Protokoll száma	Mennyiség		Minőség		Integritás		A hatékonyság összegzése	
		Konc.	Tisztaság	AGE	REáz reakció	qPCR			
MnFe ₂ O ₄	1	✓	X	✓	✓	✓	4/5	11/15	
	2	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
	3	X	X	✓	X	✓	2/5		
MnFe ₂ O ₄ -NH ₂	1	✓	✓	✓	X	✓	4/5	9/15	
	2	X	X	X	X	X	0/5		
	3	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
NiFe ₂ O ₄	1	✓	✓	✓	X	✓	4/5	9/15	
	2	X	X	X	X	X	0/5		
	3	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
NiFe ₂ O ₄ -NH ₂	1	✓	✓	✓	✓	✓	5/5	10/15	
	2	X	X	X	X	X	0/5		
	3	✓	✓	✓	X	✓	4/5		
MgFe ₂ O ₄	1	✓	✓	✓	X	✓	4/5	14/15	
	2	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
	3	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂	1	✓	✓	✓	✓	✓	5/5	15/15	
	2	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		
	3	✓	✓	✓	✓	✓	5/5		

Ezen összefoglaló táblázat alapján minden egyes MNP esetében legalább egy olyan protokollt ki lehetett választani (6. táblázat, zöld kiemelés), amellyel hatékonyan, nagy mennyiségű és jó minőségű pDNS-kinyerése valósítható meg *Escherichia coli*-ből, és amely a további molekuláris biológiai folyamatokban is felhasználható. A MnFe₂O₄ MNP esetében a **2. számú protokoll (PB)** bizonyult a legmegfelelőbbnek. Ezzel szemben a MnFe₂O₄-NH₂ és NiFe₂O₄ MNP-k esetében a **3. protokoll (Tris-HCl, NaCl)** adta a legjobb eredményeket, míg a NiFe₂O₄-NH₂-nél az **1. protokoll (Tris-HCl)** volt optimális. A MgFe₂O₄ a vizsgált protokollok közül kettővel (**2. és 3.**) is alkalmazható, míg a MgFe₂O₄-NH₂ esetén **mindhárom protokollal** izolált pDNS minta eleget tett a minőségre és mennyiségre vonatkozó követelményeknek. Ebből arra következtettem, hogy a vizsgált mágneses nanorészecskék közül ez utóbbi (MgFe₂O₄-NH₂) a leghatékonyabb bakteriális pDNS-izolálásában.

Mivel a vizsgált MNP-k és izolálási protokollok közül több is megfelelt a pDNS-kinyerésére vonatkozó minőségi és mennyiségi kritériumoknak, a továbbiakban szükségessé vált azok gyakorlati alkalmazhatóságának értékelése is. Ennek egyik meghatározó szempontja az izolálási eljárások költségigénye, különösen nagyobb mintaszám esetén. Ennek megfelelően a következőkben a kifejlesztett izolálási protokollok költségigényét számszerűsítettem, és összevettem a laboratóriumi gyakorlatban alkalmazott alternatív módszerekkel. A tesztekhez felhasznált nanorészecskék előállítási költségeit, illetve az izolálás során szükséges vegyszerek mennyiségének az árait 96 pDNS-izolálási reakcióra vonatkoztatva számoltam ki, és ezt mindhárom kifejlesztett protokoll esetén elvégeztem. A költségeket összehasonlítottam a hagyományos alkáli lízises izolálás, illetve a laboratóriumunkban megtalálható és alkalmazott, kereskedelmi forgalomban kapható izoláló készletek költségeivel, szintén 96 extrakcióra vetítve, melyeket a 7. táblázat szemléltet. Az izolálás további, laboratóriumi eszközigényeit (pl. centrifuga, vortex stb.) a számítások során nem vettem figyelembe. Jól látható, hogy az intézetünkben szintetizált nanorészecskékkel (mivel mind a hat MNP-típus szintézisének költsége azonos) kifejlesztett protokollok megközelítőleg fele akkora költséget jelentenek, mint a hagyományos extrakció, továbbá 7-9-szer alacsonyabb költségigényűek, mint az MNP-alapú kitek. Az affinitás oszlop-alapú készletek ára pedig 36-72-szer magasabb 96 pDNS-izolálásra vetítve, mint a saját protokollokkal történő kinyerés. Ezen összehasonlítás alapján egyértelműen megállapítható, hogy a kutatás során pDNS-izolálásra kifejlesztett protokollok jelentősen költséghatékonyabbak, mint a vizsgált alternatív izolálási módszerek.

7. táblázat. A kifejlesztett protokollok anyagköltségei a hagyományos izolálással [175] és kereskedelmi forgalomban kapható izoláló készletekkel összehasonlítva. A költségeket a VWR International Hungary honlapján szereplő árak alapján számoltam ki (<https://hu.vwr.com/store>), a 2025 januárjában érvényes árak figyelembevételével, összhangban a vonatkozó közleményben bemutatott számításokkal [6]

Protokoll/kit neve		96 DNS-izolálás ára (HUF)
Kifejlesztett, MNP-alapú protokollok	1. Tris-HCl	7031,32
	2. PB	7028,73
	3. Tris-HCl, NaCl	6986,08
Hagyományos DNS-izolálás		13 795,74
MNP-alapú izoláló kit	Omega Bio-tek	47 555,64
	Zymo Research	66 199,61
Oszlop-alapú izoláló kit	Omega Bio-tek	248 511,24
	QIAGEN	504 954,43

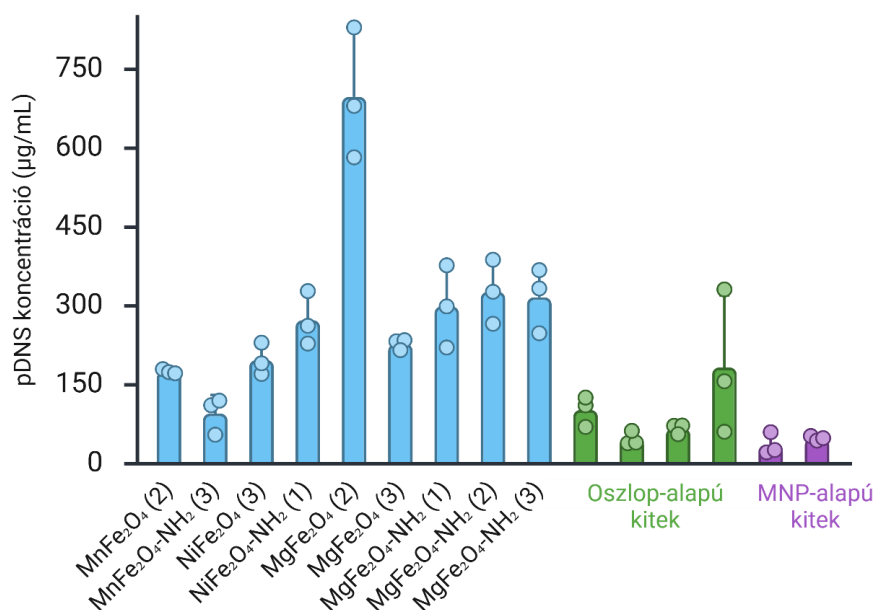
5.5. A kiválasztott MNP-protokoll kombinációkból származó pDNS részletes kvantitatív és kvalitatív jellemzése

Az előző fejezetekben bemutatott összehasonlító elemzés alapján azonosított, pDNS-izolálásra alkalmas és költséghatékony MNP-protokoll kombinációk esetében a következőkben részletesen bemutatom a kinyert DNS kvantitatív és kvalitatív jellemzését. Ezeket a vizsgálatokat már csak az alábbi MNP-protokoll kombinációkból származó DNS mintákkal végeztem el: MnFe_2O_4 – (2), $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ – (3), NiFe_2O_4 – (3), $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ – (1), MgFe_2O_4 – (2) és (3), $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ – (1), (2) és (3) protokollok (6. táblázat zölddel kiemelt sorai).

Az izolált DNS minták koncentrációjának UV-Vis spektrofotométeren való méréséből származó eredményeket a 16. ábra szemlélteti, míg a mérésekhez tartozó konkrét számadatokat a Mellékletek *MI.* táblázata foglalja össze. A diagram kék oszlopai a kiválasztott nanorészecske-protokoll kombinációk relatív extrakciós hatékonyságát mutatják. Ebben az összehasonlításban a DNS-hozam szempontjából a leghatékonyabbnak a MgFe_2O_4 MNP bizonyult a 2. PB protokollt használva, míg a $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ a 3. Tris-HCl, NaCl protokollal a legkevésbé hatékony. Bár a 3-as protokollal és $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ részecskével kaptam a legalacsonyabb pDNS mennyiséget ($93,7 \pm 35,2 \mu\text{g/mL}$), ez még mindig figyelemre méltóan jó eredménynek számít, hiszen például He és munkatársai csupán $55 \mu\text{g/mL}$, magas kópiaszámú plazmid DNS-t extraháltak az általuk elkészített amino-funkcionalizált mágneses nanorészecskékkel [176].

Fontos megjegyezni, hogy a $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel és a 3-as protokollal kapott, a többi vizsgálathoz képest alacsonyabb DNS koncentráció részben annak tulajdonítható, hogy a nanorészecskék aggregálódtak az izolálási folyamat során, amelyet a tesztek elvégzésekor vizuálisan is megfigyeltem. A részecskék aggregálódása pedig csökkentette az effektív fajlagos felületet és így az adott MNP DNS-kötő kapacitását.

Eredményeim további értékelése előtt fontosnak tartom megjegyezni, hogy a következőkben bemutatott értelmezések során kizárólag azokat a részecske-jellemzőket emelem ki, amelyek közvetlenül hozzájárulnak a pDNS-izolálási eredmények magyarázatához. Az MNP-k részletes fizikai-kémiai jellemzése a velünk együttműködő kutatócsoport munkája volt; az itt hivatkozott adatok a közös, lektorált publikációkban, valamint a kulcsfontosságú paraméterekre korlátozva a Mellékletek *M2.* táblázatában található meg.



16. ábra. A nanorészecskékkel izolált pDNS minták koncentrációja. Az X tengely az egyes izolálásokhoz használt MNP-eket és protokoll számát jelöli. Az ábrán bemutatott pDNS minták tisztasági értékei (A_{260}/A_{280}) minden esetben a várt 1,6-2,0 közötti tartományba estek. A mérésekhez tartozó pontos koncentráció- és A_{260}/A_{280} értékeket a Mellékletek M1. táblázata foglalja össze.

A 16. ábra kék oszlopai által bemutatott eredmények háttérében egyrészt az áll, hogy a DNS molekula összetöltése negatívnak tekinthető a DNS láncot alkotó foszfátcsoportoknak köszönhetően, ezért elektrosztatikus kölcsönhatás kialakításával a DNS képes a pozitív töltésű mágneses nanorészecskék felületére adszorbeálni. Az NH₂-funkcionalizált mágneses nanorészecskék az aminocsoportoknak köszönhetően megnövekedett pozitív felületi töltéssel rendelkeznek, ami erősebb elektrosztatikus kölcsönhatás kialakulását és ebből adódóan fokozott DNS kötődést tehet lehetővé [14]. Az említett tendencia azonban nem minden általam tesztelt NH₂-funkcionalizált részecske esetén igazolódott. Vizsgálataimnál ez a nikkelferritrel történő izolálásoknál, illetve bizonyos körülmények között a magnézium-ferritnél volt megfigyelhető (lásd a MgFe₂O₄ (3) és MgFe₂O₄-NH₂ (3) eredmények összehasonlítását a 16. ábra szerint).

A módosítatlan mangán-ferrit MNP-vel magasabb DNS-hozam volt elérhető az NH₂-funkcionalizált változathoz képest, ami összefüggésbe hozható azzal, hogy előbbi esetében a mágneses szaturáció értéke (M_s) nagyobb (73 emu/g), mint az utóbbié (38 emu/g) [6]. A nagyobb mágneses szaturáció pedig fokozhatja a DNS és a mágneses nanorészecskék közötti vonzó kölcsönhatásokat [177].

A nikkelferrit mágneses nanorészecskék esetében az NH₂-csoporttal rendelkező részecskék jobb hatékonyságát az -NH₂ csoportoknak köszönhetően megnövekedett pozitív felületi töltés mellett egyéb fizikai paraméterek is alátámaszthatják. A funkciócsoporttal rendelkező változat nagyobb mágnessétséggel rendelkezik, mint a funkciócsoport nélküli

($39 \text{ emu/g} > 26,7 \text{ emu/g}$), továbbá kisebb átlagos méreteloszlással bír (NiFe_2O_4 : $12 \pm 3 \text{ nm}$, $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$: $6 \pm 2 \text{ nm}$) [6]. A kisebb részecskék nagyobb fajlagos felülettel rendelkeznek, ami szintén kedvez a DNS molekulák adszorpciójának.

A magnézium-ferrit nanorészecskék esetében a különböző protokollokkal extrahált DNS mennyiségek közötti különbség adódhat abból, hogy a nukleinsav molekulák a különböző sókoncentrációjú pufferekben eltérő konformációt vesznek fel. Ugyanis vizes oldatban a DNS molekulákban a negatív töltésű foszfátcsoportok között erős taszítás alakul ki, és emiatt a molekula elongálódott, kitekeredett szerkezetet vesz fel [178,179]. Egy pDNS hossza ilyen kitekeredett formában akár több száz nanométer is lehet, míg egy nanorészecske átmérője legfeljebb 100 nm. Következésképpen, amikor a pDNS molekulákat nanorészecskékkel keverjük össze, a szabad DNS körbetekeredhet a részecske felületén. Ez azt eredményezheti, hogy egyetlen pDNS molekula a nanorészecske felületi kötőhelyeinek nagy részét lefoglalhatja, sőt a DNS hossza és a foszfátgerinc mentén található negatív töltések révén a DNS egyidejűleg több részecskéhez is adszorbeálódhat [127]. Ennek eredményeként a nanorészecskék effektív DNS-adszorpciós kapacitása csökken.

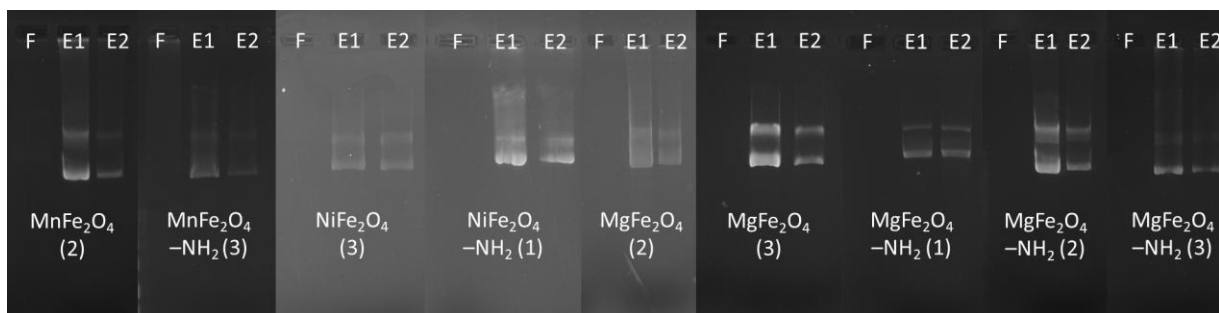
Ezzel szemben magas sókoncentrációjú oldatban (például NaCl-tartalmú pufferben) a DNS megnyúlt konformációból kompaktabb, globuláris szerkezetbe rendeződik [127,180]. Ebben a feltekeredett állapotban a DNS gerincét alkotó foszfátcsoportok egy része leárnyékolódik, ami csökkenti a hozzáférhetőségüket a pozitív töltésű nanorészecskékhez. Ennek következtében egy adott DNS molekula kisebb felületet foglal el a nanorészecske felszínén, lehetővé téve több DNS molekula egyidejű adszorpcióját. Valamilyen kondenzálószer (pl. polietilén-glikol) hozzáadása a nátrium-klorid tartalmú pufferhez tovább fokozza a DNS kondenzációját, és ezáltal növeli annak adszorpcióját a nanorészecskék felületén [127].

A 16. ábra összehasonlítja az általam tesztelt MNP-protokoll kombinációk pDNS-izoláló hatékonyságát kereskedelmi forgalomban kapható extrakciós készletek hatékonyságával. Ezek közül négy olyat teszteltem, amelyekkel affinitás oszlop-alapú izolálás valósult meg (zöld oszlopok, 16. ábra), kettővel pedig mágneses nanorészecske-alapú (lila oszlopok, 16. ábra). Jól látható, hogy a mágneses nanorészecskéket használó izoláló kitek nem közelítik meg a Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport által szintetizált MNP-k és a velük fejlesztett eljárások pDNS-kinyerési hatékonyságát. Ezeknél ugyanis a legkevésbé hatékony eredmény ($\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (3)) is többszörösen meghaladja az Omega Bio-tek ($34,2 \pm 21 \text{ } \mu\text{g/mL}$) és a Zymo Research ($49,3 \pm 7,9 \text{ } \mu\text{g/mL}$) által forgalmazott készletekkel kapott hozamot. A bevonatolt oszlopokat alkalmazó pDNS-extrakciós készletek is (melyek közül a legjobb

eljárás $181,3 \pm 137,2 \mu\text{g/mL}$ pDNS-t eredményezett) csak két, saját fejlesztésű MNP-protokoll kombináció (MnFe_2O_4 (2) és $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (3)) hatékonyságát előzték meg.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, van-e szignifikáns különbség a DNS koncentrációk között, a kis elemszám és a normáeloszlás feltételezhetőségének hiánya miatt Kruskal-Wallis H-próbát végeztem, amely kimutatta, hogy a kilenc kísérleti csoportban (amelyek az MNP-protokoll különböző kombinációit képviselik) a DNS koncentrációk statisztikai szempontból, nagyon alacsony szignifikanciaszint mellett is különböznek ($H(8) = 75,52$; $p < 0,0001$).

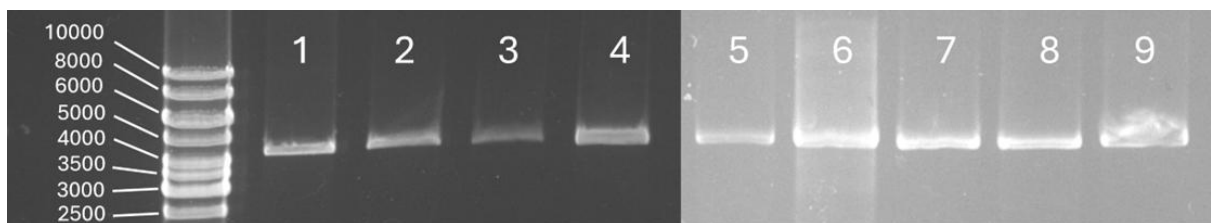
Az UV-Vis spektrofotometriás méréseket követően agaróz gélelektroforézist alkalmaztam a pDNS minőségének további értékelésére. Abban az esetben, ha az agaróz gélelektroforézissel kedvező, azaz a döntési fa (6. ábra) által megfogalmazott kritériumoknak megfelelő eredményeket kaptam (17. ábra), a pDNS további, funkcionális jellegű vizsgálatait restrikciós endonukleáz- és qPCR reakciókkal végeztem el.



17. ábra. Agaróz gélelektroforézis kép a nanorészecskékkel kinyert pDNS mintákról. F = felülúzó, E1 = első elúciós frakció, E2 = második elúciós frakció

5.6. A kinyert pDNS integritásvizsgálata restrikciós endonukleáz reakciók és qPCR alkalmazásával

A kinyert pDNS integritásának vizsgálatát restrikciós endonukleáz emésztéssel valósítottam meg, amely alkalmas a DNS szerkezeti épségének és emészthetőségének ellenőrzésére. A restrikciós emésztéseket az AseI endonukleáz enzimmel végeztem az egyes nanorészecskékkel izolált pBAD24 DNS-re. Az így kezelt minták agaróz gélelektroforézissel nyert eredményei az integritásvizsgálat reprezentatív példáiként láthatók a 18. ábra gélképein.

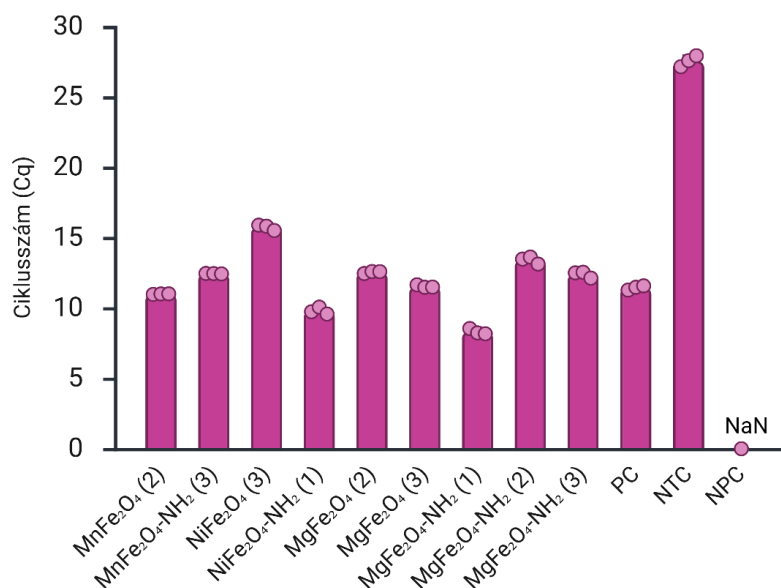


18. ábra. Az *AseI* enzimmel hasított *pBAD24* minták, amelyek izolálása a következő nanorészecskével (és protokollal) történt: **1.** $MnFe_2O_4$ (2), **2.** $MnFe_2O_4-NH_2$ (3), **3.** $NiFe_2O_4$ (3), **4.** $NiFe_2O_4-NH_2$ (1) **5.** $MgFe_2O_4$ (2), **6.** $MgFe_2O_4$ (3), **7.** $MgFe_2O_4-NH_2$ (1), **8.** $MgFe_2O_4-NH_2$ (2), **9.** $MgFe_2O_4-NH_2$ (3). Az *AseI* enzimnek egy hasítási helye van a *pBAD24* molekulán, ezáltal linearizálja a cirkuláris plazmidot, így a fluoreszcens DNS sáv a gélképen a plazmid méretének megfelelő magasságnál jelenik meg (4542 bp). Az 1 kb-os DNS marker sávjai bp-ban értendők.

Az általam vizsgált pDNS-nek a 4000 és 5000 bp-t jelentő markersávok között kellett elhelyezkednie. Amint azt a gélkép is mutatja, pozitív eredmény esetén a megfelelő mérettartományban megjelenő, éles fluoreszcens sáv jelzi, hogy a restrikciós emésztés sikeres volt, mivel a cirkuláris pDNS egyetlen hasítási helyen történő vágása lineáris DNS molekula kialakulásához vezet. A lineáris forma a plazmid egy konformációja, amely kevésbé kompakt, mint a szuperfelcsavarodott állapot, és amelynek vándorlása a gélben a DNS méretétől függő sebességű [171].

Az, hogy a hasítás a megfelelő helyen végbemehetett, arra utal, hogy a DNS minta nem tartalmazott olyan szennyező komponenseket, amelyek a restrikciós endonukleáz működését gátolták volna. Emellett a gélen elmosódott sávok, azaz diffúz fluoreszcencia, valamint nagy molekulatömegű, genomi DNS-re utaló jelek hiánya azt jelzi, hogy a pDNS izolálása során nem következett be mechanikai vagy kémiai eredetű töredezés, illetve nem történt aspecifikus hasítás.

Ezek az eredmények megerősítették, hogy a nanorészecskékkel izolált pDNS szerkezetileg ép és a további molekuláris biológiai felhasználáshoz szükséges tisztasággal rendelkezik.



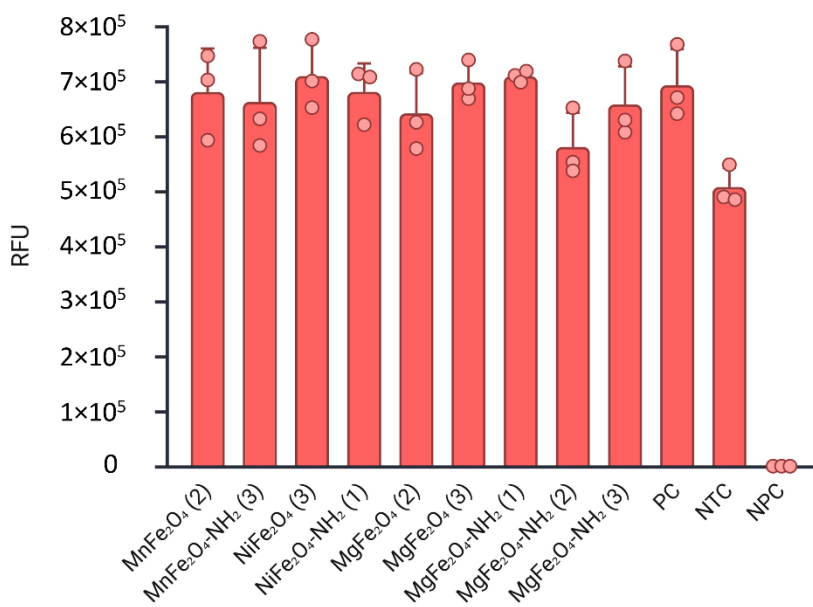
19. ábra. A qPCR reakciókat azon pDNS templátokkal végeztem, amelyeket az X tengelyen feltüntetett MNP-protokoll kombináció szerint izoláltam. PC = pozitív kontroll (GenElute Plasmid Miniprep Kit-tel (Sigma Aldrich) kinyert minta), NTC = templát nélküli kontroll, NPC = primer nélküli kontroll, NaN = nem értékelhető adat

A qPCR módszerét a részecskékkel kinyert pDNS minták további felhasználhatóságának kimutatására alkalmaztam. Az összes DNS mintánál már a 8-15. ciklusok között volt detektálható fluoreszcens jel. A 3 párhuzamos mérés eredményéből származó Cq átlagértéke MgFe₂O₄-NH₂ esetében volt a legkisebb (8,32), míg legkésőbb a NiFe₂O₄-nél jelent meg a fluoreszcens jel, átlagosan a 15,74. ciklusban (19. ábra). Ez az elvárt kritériumoknak megfelelő eredménynek számít. A megfelelőség alatt azt értem, hogy minden érték jelentősen a 35-ös Cq küszöbérték alatt van, továbbá minden esetben a detektált fluoreszcens jel megjelenése a pozitív kontrollnál (PC) tapasztalt értékhez közeli volt. A pozitív kontroll ebben a tesztben egy kereskedelmi forgalomban kapható, affinitás oszlop-alapú izoláló készlettel (Sigma Aldrich) kinyert pDNS minta volt. Ezen kívül a tapasztalt alacsony Cq értékek arra utalnak, hogy az egyes reakciókban felhasznált 5 ng DNS-ből már kis számú (8-15) ciklus alatt akkora mennyiségű amplifikált termék keletkezett, mely képes volt detektálható fluoreszcens jelet generálni. A sikeres amplifikáció akkor valósul meg, ha a primerek templáthoz való hibridizációja nem akadályozott (az izolált DNS minta nem sérült) és a DNS-polimeráz is hatékonyan képes működni (a reakcióelegybe nem került szennyeződés, pl. tökéletlen izolálás esetén maradék fém nanorészecske).

A templátot nem tartalmazó kontroll (NTC) magas Cq értéke arra utal, hogy a primer dimerek egymással kapcsolódtak a reakcióban, kettős szálú DNS-t alkotva, amihez a fluoreszcens PCR festék kötődni, majd gerjesztődni tud. Azonban a primer dimerek nem teljesen komplementerei egymásnak, így kapcsolódásuk nem tökéletes, ami miatt csak kevés

festék tud interkalálódni közéjük. Így csak sok ciklus után és csak kis mértékű fluoreszcens jel generálódik ezen mintákban.

A primer nélküli kontrollnak (NPC) nincs amplifikációs görbéje, hiszen a reakcióhoz hozzáadott minimális mennyiségű pDNS nem elegendő ahhoz, hogy az kimutatható fluoreszcens emissziót generáljon, primer hiányában pedig a DNS-polimeráz nem tud a templát DNS-hez hozzákapcsolódni, hogy véghez vigye a szintézist.



20. ábra. A jelzett MNP-protokoll kombinációval izolált pDNS mintákkal végzett qPCR eredmények RFU (relatív fluoreszcencia egység) értékei

A qPCR mérések során meghatározott RFU értékek átlagát bemutató oszlopdiagram (20. ábra) célja annak szemléltetése, hogy az egyes MNP-protokoll kombinációkból származó pDNS minták hasonló fluoreszcencia-intenzitást eredményeztek, és így a qPCR reakcióban egységes minőségű templátként viselkedtek. Az RFU értékek nagysága és szórása minden esetben összemérhető volt a pozitív kontrollként alkalmazott, kereskedelmi izoláló készlettel nyert pDNS mintáéval, ami alátámasztja az alkalmazott MNP-alapú izolálási módszerek PCR-kompatibilitását.

A C_q értékek statisztikai összehasonlítása Kruskal-Wallis próbával szignifikáns eltéréseket mutatott az egyes MNP-protokoll kombinációk között ($H(8) = 85,81$; $p < 0,0001$), ami arra utal, hogy bár az amplifikáció minden esetben alacsony ciklusszámon indult meg, az izolálási körülmények a qPCR amplifikáció kezdetének időzítését eltérő mértékben befolyásolták.

A qPCR eredményben megfigyelhető C_q értékek minden tesztelt MNP esetében hasonlóan alacsonyak voltak, ami arra utal, hogy a vizsgált ferrit-alapú nanorészecske a vele optimalizált protokoll(ok)kal sikeres, jó minőségű DNS-kinyerést tesz lehetővé. Ezáltal az

izolált DNS templátként alkalmazható amplifikációs reakciókban. Mindez megerősíti a tesztelt részecskék azon potenciálját, hogy megbízható alternatívaként szolgáljanak a pDNS-izolálásában, bővítve a kutatók számára a kinyerésre alkalmazható lehetőségek körét.

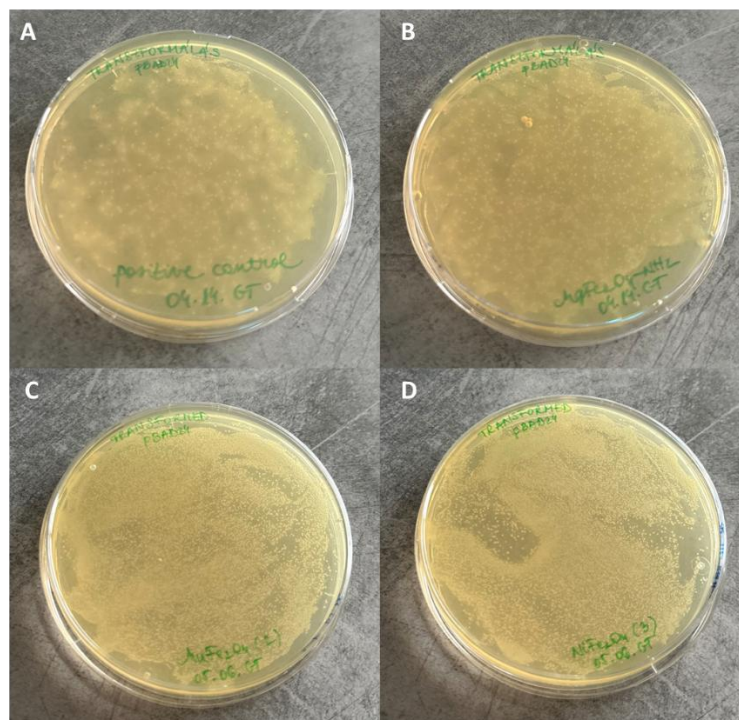
5.7. Az MNP-vel izolált pDNS bakteriális transzformálása

Az izolált pDNS integritásának és amplifikációs alkalmasságának igazolását követően a következő lépésben azt vizsgáltam, hogy az MNP-alapú módszerekkel kinyert DNS biológiai értelemben is funkcionálisan aktív maradt-e. Ennek igazolására bakteriális transzformálási kísérleteket végeztem.

A transzformálást mindhárom típusú (magnézium-, mangán- és nikkelferrit-alapú) mágneses nanorészecskével kinyert pDNS mintával elvégeztem. A transzformálásra kiválasztott templátok esetében az volt a szempont, hogy a korábban optimálisnak bizonyult MNP-protokoll kombinációk közül mindhárom MNP-típus és mindhárom izolálási protokoll reprezentálva legyen. Ennek megfelelően a pDNS templátok a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (1. protokoll), MnFe_2O_4 (2. protokoll) és NiFe_2O_4 (3. protokoll) kombinációkból származtak.

Az *E. coli* JM109 kompetens sejt transzformálását követően, ampicillin-tartalmú szelektív táptalajon történő tenyésztés során minden esetben baktériumkolóniák jelentek meg (21. ábra), ami igazolja, hogy mindhárom MNP-protokoll kombinációból származó pBAD24 templát bejutott a baktériumsejtbe. A kolóniák megjelenése egyben a plazmidon kódolt szelektív marker működését is alátámasztja, mivel a korábban ampicillinre érzékeny baktériumok a bejuttatott pDNS jelenlétében képessé váltak az antibiotikumot tartalmazó közegben történő növekedésre.

Ezután a transzformált sejtekből a pBAD24 plazmidot újraizoláltam, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem annak jelenlétét, amely megerősítette a transzformálás sikerességét.

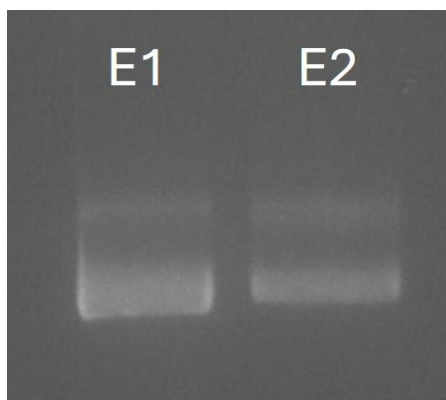


21. ábra. A kinyert pBAD24 transzformálását követő ampicillin-szelekció LB táptalajon, pozitív kontroll (A) esetén, illetve a különböző MNP-protokoll kombinációkkal: $MgFe_2O_4-NH_2$ – 1. protokoll (B), $MnFe_2O_4$ – 2. protokoll (C) és $NiFe_2O_4$ – 3. protokoll (D)

5.8. pDNS-izolálás baktériumsejtekkel fertőzött humán vérszérum mintából

A nukleinsav-izolálási módszerek validálása során elengedhetetlen annak vizsgálata, hogy az alkalmazott eljárás mennyire hatékony komplex biológiai mátrixokban, ahol a cél-DNS számos potenciálisan zavaró komponens jelenlétében található. A vérszérum – különösen enyhe vörösvértest-szennyezettség esetén – fehérjéket, lipideket, sejtörmeléket tartalmazhat, amelyek jelentősen befolyásolhatják a DNS-adszorpciót, az izolálás hatékonyságát és a downstream analitikai módszerek megbízhatóságát. Mivel a plazmid DNS extrakciója szempontjából a legkedvezőbb eredményeket az amino-funkcionalizált magnézium-ferrittel értem el, annak hatékonyságát tovább vizsgáltam vérszérummal terhelt (spike-olt) mátrixból történő pDNS-kinyerésre. A kísérlet során *E. coli* pBAD24 baktériumtenyészetet adtam hozzá vérszérumhoz, majd a kialakított, komplex közegből végeztem el a pDNS izolálását az 1. protokollal.

5 mL, $1,57 \times 10^9$ CFU/mL sejtsűrűségű, vérszérummal spike-olt *E. coli* pBAD24 baktériumtenyészetből sikeresen izoláltam pDNS-t, amelynek koncentrációja 303,1 $\mu\text{g/mL}$ volt az első eluátumban (E1) és 93,7 $\mu\text{g/mL}$ a másodikban (E2). Az extrahált DNS minták tisztasága az A_{260}/A_{280} arány alapján 1,92 (E1) és 1,84 (E2) értékeket mutattak. Az agaróz gélelektroforézis eredménye (22. ábra) az izolálás első és második elúciós frakcióiból származó pBAD24 molekulák jelenlétét mutatja.



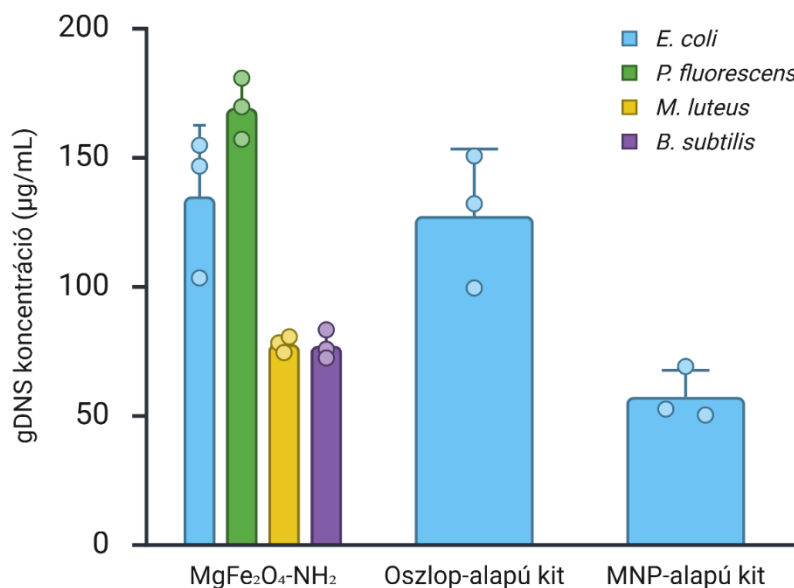
22. ábra. A $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskékkel (1. Tris-HCl protokoll) vérszérum és bakteriális sejtszuszpenzió keverékéből izolált pBAD24 DNS agaróz gélelektroforézis képe. E1 = első elúciós frakció, E2 = második elúciós frakció

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az amino-funkcionalizált magnézium-ferrit alapú mágneses nanorészecskék nemcsak tiszta bakteriális tenyészetből, hanem vérszérummal terhelt, komplex biológiai mátrixból is hatékonyan alkalmazhatók pDNS izolálására. A kapott DNS mennyisége és tisztasága, valamint a gélelektroforézises ellenőrzés eredményei együttesen igazolják, hogy az izolálási módszer ilyen körülmények között is megőrzi hatékonyságát. Ez arra utal, hogy ez az MNP-protokoll ($MgFe_2O_4-NH_2$ – 1. Tris-HCl) kombináció potenciálisan alkalmas összetett minták feldolgozására is. Ez a megközelítés nemcsak az izolálási eljárás robusztusságát igazolja, hanem modellezi azokat a körülményeket is, amelyekkel a módszer potenciális diagnosztikai, biotechnológiai vagy környezetanalitikai alkalmazások során találkozhat.

5.9. gDNS-izolálás eredményei: négy baktériumfajból származó extrakció $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskével

A pDNS-izolálására irányuló kísérletek eredményeit követően a vizsgálatokat kiterjesztettem genomi DNS (gDNS) kinyerésére is, annak érdekében, hogy megítéljem az amino-funkcionalizált magnézium-ferrit alapú mágneses nanorészecskék alkalmazhatóságát eltérő sejtfalszerkezetű baktériumok esetében.

A gDNS-izolálás forrása két Gram-negatív (*E. coli*, *P. fluorescens*) és két Gram-pozitív (*M. luteus*, *B. subtilis*) baktériumfaj volt. Az amino-funkcionalizált magnézium-ferrit nanorészecskékkel kinyert gDNS koncentrációk a 23. ábrán láthatók.



23. ábra. A MgFe₂O₄-NH₂ alapú gDNS-izolálási protokoll teljesítményének összehasonlítása kereskedelmi izoláló kitékkel, az izolált gDNS koncentrációja alapján. Az azonos színű oszlopok azonos baktériumfajokból izolált gDNS mintákat jelölnek.

A 23. ábra két utolsó oszlopa jelöli a kereskedelmi forgalomból származó izoláló készletekkel kinyert DNS koncentrációját. Az affinitás oszlop-alapú készlet az Omega Bio-tek gyártótól származik, míg az MNP-alapú kité a Zymo Research készíti, és érdemi összehasonlítás szempontjából ez utóbbi áll közelebb a saját fejlesztésű protokollhoz tartozó eredményekhez. A Zymo Research készlete azonban nem ismerteti, hogy milyen típusú nanorészecskéket tartalmaz. Az összehasonlító ábrán az jól látható, hogy egyforma kiindulási sejtszuszpenzió-térfogat alkalmazásakor a magnézium-ferrit alapú gDNS-izoláló protokollal mind a négy baktériumfajból nagyobb mennyiségű genomi DNS kinyerése valósítható meg, mint az MNP-alapú készlettel (23. ábra).

Ha összehasonlítjuk az aminocsoporttal rendelkező magnézium-ferrittel különböző modellorganizmusokból izolált gDNS mennyiségeket, az látható, hogy a két G⁻ baktériumból (*E. coli* és *P. fluorescens*) több DNS-t nyertem ki, mint a G⁺ baktériumokból (*M. luteus* és *B. subtilis*) (23. ábra). Ez egyrészt annak köszönhető, hogy az éjszakán át rázatott baktériumszuszpenziók kiindulási sejtsűrűsége eltérő volt. Ezt alátámasztják az izolálás megkezdése előtt 600 nm-en elvégzett optikai denzitás mérések is:

E. coli: OD₆₀₀ = 5,63 (ez hozzávetőlegesen $4,5 \times 10^9$ sejt/mL sejtsűrűségnek felel meg [181])

P. fluorescens: OD₆₀₀ = 6,08

M. luteus: OD₆₀₀ = 4,5

B. subtilis: OD₆₀₀ = 3,9

Mivel az optikai denzitás jó közelítéssel arányos a sejtkoncentrációval, a magasabb OD₆₀₀ érték nagyobb kiindulási sejtszámot jelent térfogategységenként, ami potenciálisan nagyobb mennyiségű izolálható genomi DNS-t eredményez. Másrészt, mivel a baktériumok sejtmembránjában lévő peptidoglikán réteg a két típusú baktériumcsoportban különbözik (G– baktériumokban ez a réteg vékonyabb, mint a G+ esetén), emiatt a kémiai sejtfeltárás is könnyebben mehetett végbe az *E. coli* és a *P. fluorescens* esetében [182], ami szintén befolyásolhatta a sejtekből kinyerhető DNS mennyiségét.

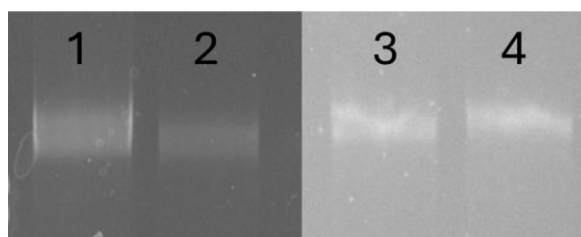
A kinyert gDNS minták tisztaságát az A₂₆₀/A₂₈₀ arány jellemzi, mely a szakirodalom szerint 1,6 – 2,0 között tekinthető jónak. Eredményeim azt mutatták, hogy a különböző forrásból izolált gDNS tisztasága megfelelt ennek a kritériumnak (8. táblázat).

8. táblázat. A MgFe₂O₄-NH₂ MNP gDNS-izoláló hatékonyságának összehasonlítása kereskedelmi forgalomban kapható kitek hatékonyságával, DNS tisztaság szempontjából (A₂₆₀/A₂₈₀)

gDNS forrás (baktérium)	Felhasznált MNP/kit	Kinyert gDNS A ₂₆₀ /A ₂₈₀
<i>E. coli</i>	MgFe ₂ O ₄ -NH ₂	1,69 ± 0,02
<i>P. fluorescens</i>		1,79 ± 0,08
<i>M. luteus</i>		1,62 ± 0,02
<i>B. subtilis</i>		1,71 ± 0,08
<i>E. coli</i>	Omega Bio-tek	1,79 ± 0,01
	Zymo Research	1,73 ± 0,06

Hasonló kutatásokban, melyekben szintén (vas-oxid) mágneses nanorészecskék DNS adszorpciós képességét és hatékonyságát tesztelték, azt kapták eredményül, hogy az *E. coli* sejtekből kinyerhető maximális, tiszta DNS mennyiség 18-20 µg/mL [8], míg az általam tesztelt magnézium-ferrit esetében ez átlagosan 113,9 µg/mL.

A sejtekből extrahált gDNS épségét és jelenlétét agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztem. A jól elkülöníthető, fluoreszcens sávokat a 24. ábra mutatja. A kapott jelekre nem volt jellemző a nagymértékű elmosódás, ami arra utal, hogy a DNS minták nem bomlottak le vagy darabolódtak fel az izolálási folyamat során.

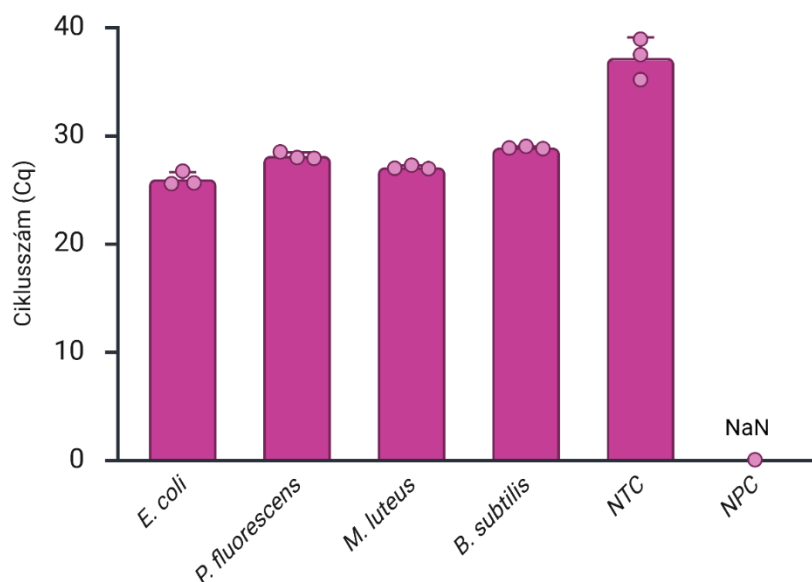


24. ábra. A különböző, G– és G+ baktériumfajokból, MgFe₂O₄-NH₂ MNP-vel kinyert gDNS minták agaróz gélelektroforézis képe (1. *Escherichia coli*, 2. *Pseudomonas fluorescens*, 3. *Micrococcus luteus*, 4. *Bacillus subtilis*).

A kifejlesztett protokoll tehát sikeresen volt alkalmazható különböző baktériumfajokból való gDNS-izolálásra, ezzel bizonyítva a protokollban szereplő magnézium-ferrit széleskörű felhasználhatóságát. A kapott eredmények biztatóak további baktériumokból, élesztő vagy akár növényi sejtekből történő extrakcióra nézve is. Emellett, az itt megfigyelt hatékonyság összhangban van az előbbieken bemutatott, plazmid DNS-re irányuló izolálások során kapott jó eredményekkel, ami megerősíti a $MgFe_2O_4-NH_2$ alkalmasságát szélesebb körű izolálási célokra, különböző biológiai kontextusokban.

5.9.1. Az extrahált gDNS integritásának vizsgálata qPCR-rel

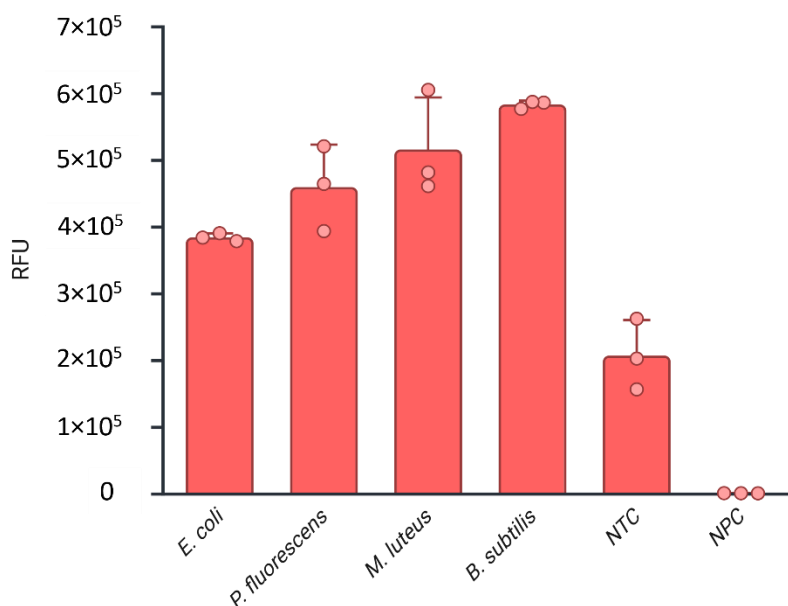
Míg a DNS mennyiségét és minőségét leggyakrabban UV spektrofotometriával vizsgálják, az integritását gyakran qPCR-rel is ellenőrzik [136]. A qPCR módszer ilyen célú alkalmazását pDNS minták esetében korábban részleteztem, a következőkben a módszert a genomi DNS integritásának értékelésére alkalmazva mutatom be. Erre azért van szükség, mert a gDNS integritásának ellenőrzése nemcsak alapkutatói folyamatokban fontos, hanem különösen indokolt az összetett, idő- és erőforrás-igényes gDNS alapú alkalmazások (pl. genomikai vizsgálatok, DNS-biobankok készítése, teljes genomszekvenálás, metilációs vizsgálatok) megkezdése előtt is.



25. ábra. A $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-kel izolált, különböző baktériumfajokból származó gDNS minták qPCR vizsgálatának Cq értékei. Az oszlopok három független qPCR reakció Cq átlagértékeit, a pontok az egyedi méréseket jelölik. NTC = templát nélküli kontroll, NPC = primer nélküli kontroll, NaN = nem értékelhető adat

A qPCR vizsgálatok során megfigyelhető volt, hogy nagyobb kiindulási DNS mennyiség esetén kevesebb PCR ciklus szükséges ahhoz, hogy a fluoreszcencia intenzitása a küszöbértéket meghaladó intenzitását elérje. Ez a fordított arányosság pedig jól látható az

oszlopdiaagramon (25. ábra) is. Az NTC mintánál a magasabb Cq érték és az alacsonyabb RFU (26. ábra) háttérében az áll, hogy a reakcióban jelenlévő primerek egymással hibridizálva primer dimereket képeznek, melyek alacsony intenzitású jelet adnak. A qPCR reakciókat akkor tekintettem sikeresnek, ha a Cq érték 35 alatt jelentkezett. A 25. ábra azt mutatja, hogy a gDNS templátok esetén a Cq értékek 22,66 és 26,29 közé estek, ami hatékony felsokszorosításra és a templátok megfelelő integritására utal.



26. ábra. A magnézium-ferrit MNP-vel izolált gDNS minták qPCR reakcióinak eredménye RFU (relatív fluoreszcens egység) tekintetében. A diagram az RFU értékek triplikátumokból származó átlagait mutatja.

A 26. ábra diagramján látható eredmények reprezentatívnak tekinthetők, mivel a négy vizsgált baktériumfajból izolált gDNS minták szignifikánsan magasabb fluoreszcencia-intenzitást mutattak, mint a templátot nem tartalmazó kontroll (NTC), ami arra utal, hogy a detektált jel valóban az amplifikált DNS-hez köthető. A primer nélküli kontroll (NPC) minták esetében nem volt kimutatható fluoreszcencia, ami megfelel annak az elvárásnak, hogy primer hiányában amplifikálás nem megy végbe.

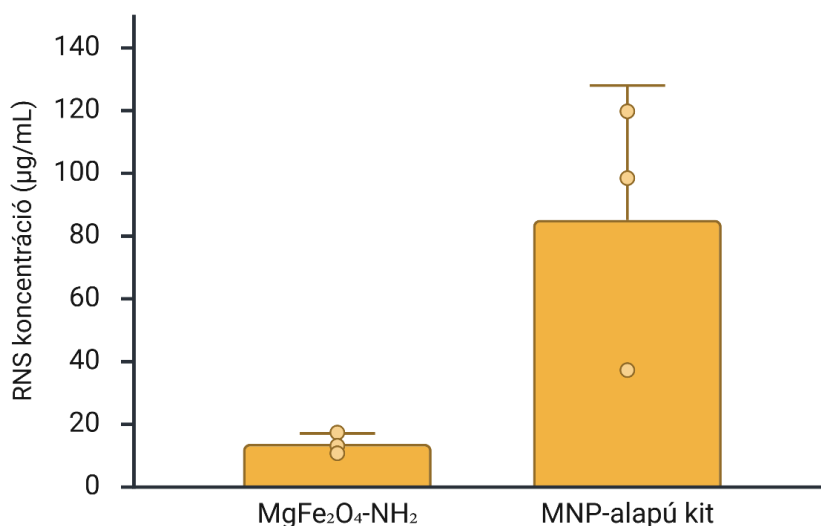
Összességében, noha az abszolút RFU értékek készülékfüggők, az azonos kísérleti feltételek mellett mért relatív különbségek jól tükrözik a felsokszorosítás hatékonyságát és specificitását, így a diagramon megfigyelhető tendencia megbízhatóan igazolja a PCR reakciók sikerességét és biológiai relevanciáját (26. ábra).

5.10. A MgFe₂O₄-NH₂ MNP-vel végzett RNS-izolálás és RT-PCR eredményei

Míg a fenti vizsgálatok a gDNS izolálásának sikerességét és a templát integritását igazolták, a nukleinsav-izolálási módszer alkalmazhatóságának teljes körű értékeléséhez szükséges

volt a sejt aktuális transzkripciós állapotát tükröző RNS kinyerésének és felhasználhatóságának vizsgálata is.

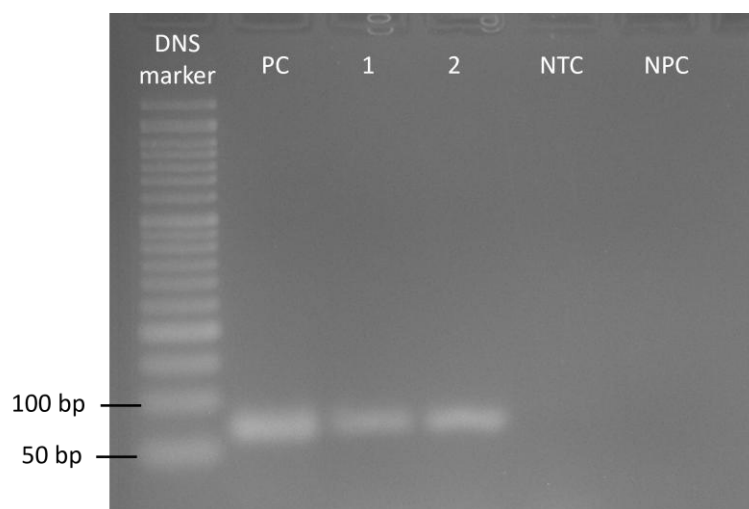
Első lépésként az RNS-izolálás hatékonyságát a kinyert nukleinsav mennyisége alapján hasonlítottam össze, amelyet UV-Vis spektrofotometriával, 260 nm-en határoztam meg. A saját fejlesztésű protokollal és a kereskedelmi készlettel, ugyanolyan *E. coli* sejttérfigatból kinyert RNS koncentrációját összehasonlítva a 27. ábra mutatja.



27. ábra. A MgFe₂O₄-NH₂ MNP-vel és az Omega Bio-tek gyártótól származó RNS-izoláló kittel kinyert RNS minták átlagos koncentrációja

A nukleinsav mennyiségét tekintve az Omega Bio-tek kit láthatóan szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult. A saját fejlesztésű módszerrel átlagosan kinyerhető 10,72 ± 4,52 µg/mL koncentrációjú RNS mintákat ezután RT-PCR módszerrel vizsgáltam tovább. Ehhez egy olyan gén kiválasztása volt szükséges, amelynek expressziója a környezeti és sejt anyagcsere állapotától nagyrészt független. *E. coli* esetében az egyik ilyen gén (ún. háztartási gén) az *uidA*, amely a β-glükuronidáz enzimet kódolja [183]. Az *uidA* stabil expressziója miatt megbízható célgénként alkalmazható az RNS minták minőségének és RT-PCR-ben való felhasználhatóságának igazolására. Jelen munkában ezért ennek a génnek az RNS-alapú kimutatását céloztam meg.

Az RT-PCR folyamat első lépéseként reverz transzkripciót végeztem a 4.13.1. alfejezetben leírtak alapján. Ennek során az izolált RNS a reverz transzkriptáz enzim templátjaként szolgált, amely egy egyszálú, az RNS-sel komplementer DNS-t (cDNS) szintetizált. Ezt a cDNS-t pedig az eljárás második lépésében, a PCR reakcióban templátként használtam. A módszer során az *uidA* gén egy 70 bp hosszúságú szakaszát specifikus primerekkel amplifikáltam, majd a reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.



28. ábra. A 70 bp hosszúságú RT-PCR termék agaróz gélelektroforézis képe. Az 1. és 2. minták a $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel kinyert RNS-ről származnak.

A 28. ábra alapján megállapítható, hogy a kereskedelmi RNS-izoláló készlettel kinyert minta pozitív kontrollként (PC) megfelelő amplifikációt mutatott, és ezzel azonos módon a $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskékkel izolált RNS minták (1. és 2. párhuzamos izolálás) esetében is jól látható PCR termék jelent meg. Ez igazolja, hogy a reverz transzkripció sikeres volt. Bár az izolált RNS koncentrációja elmarad a kereskedelmi forgalomban kapható készlettel elérhető kihozattal, az izolátum RT-PCR reakcióban sikeresen szolgált templátként. A negatív kontrollok (NTC, NPC) esetében nem volt megfigyelhető fluoreszcens sáv, ami a reakciók specificitását támasztja alá.

6. Tézisek

1. tézis: Igazoltam, hogy a MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 és $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ mágneses nanorészecskék alkalmasak bakteriális eredetű plazmid DNS reverzibilis megkötésére, és ezek felhasználásával hatékony, szilárd fázisú pDNS-izolálási eljárásokat fejlesztettem ki.

2. tézis: Megállapítottam, hogy a MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 és $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ mágneses nanorészecskékkel kifejlesztett bakteriális pDNS-extrakciós protokollokkal izolált plazmidminták enzimatis és amplifikációs molekuláris biológiai eljárásokban felhasználhatók.

3. tézis: Bebizonyítottam, hogy a hat vizsgált mágneses nanorészecske (MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 és $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$) közül az aminocsoporttal ellátott magnézium-ferrit a legkevésbé érzékeny a környezeti hatások megváltoztatására DNS-izolálás során, ezáltal pedig a legszélesebb körben alkalmazható bakteriális nukleinsav kinyerésére.

4. tézis: Igazoltam a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanorészecskék alkalmazhatóságát bakteriális sejtekből történő genomi DNS-izolálásra, és kidolgoztam egy szilárd fázisú izolálási protokollt, amely qPCR-alapú downstream felhasználásra alkalmas nukleinsavat eredményez.

5. tézis: A $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanorészecskék alkalmazásával kidolgoztam egy szilárd fázisú RNS-izoláló protokollt bakteriális sejtekből, amellyel a kinyert RNS RT-PCR alapú molekuláris biológiai analízisekben felhasználható.

7. Összefoglaló

A mágneses nanorészecskék forradalmát éljük. Ezek a változatos, specifikus kémiai és fizikai tulajdonságokkal rendelkező anyagok számos területen alkalmazhatók. A különféle szenzorok készítésétől kezdve, a mezőgazdasági alkalmazáson át egészen az orvostudományig, széles körben használják őket. Ipari felhasználásban, kutatásban és a hétköznapi életben egyaránt jelentős szerepet játszanak. Az MNP-k olyan nagy fajlagos felülettel rendelkeznek, amely lehetővé teszi különböző molekulák hatékony adszorpcióját. Ezen tulajdonságukat kihasználva olyan bakteriális nukleinsav-izolálási protokollokat fejlesztettem ki plazmid DNS, genomi DNS és RNS molekulák extrakciójára, amelyek felveszik a versenyt a már jól működő hagyományos módszerekkel, és kereskedelmi forgalomban kapható készletekkel egyaránt.

A doktori kutatásom során ferrit-alapú mágneses nanorészecskék nukleinsav-adszorpciós és -izoláló képességét vizsgáltam, majd hatékonyságukat összehasonlítottam. Plazmid DNS-izolálásra az összes, rendelkezésemre álló nanorészecskét leteszteltem: MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$. A mangán-ferrit példáján meghatároztam az optimális kiindulási sejtmennyiséget, a nanorészecske koncentrációt és az elúciós lépések számát az extrakcióhoz. A szintézis során különböző ideig hőkezelt $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ részecskék pDNS-izoláló hatékonyságát is összehasonlítottam, és megállapítottam, hogy a 4 perces mikrohullámú kezeléssel előállított MNP hasonlóan jó hatékonysággal rendelkezik, mint a 12 órán át kezelt változat. Mivel összetételüket tekintve azonosak, költség- és időhatékonysági szempontból a 4 perces kezeléssel előállított minta előnyösebbnek bizonyult. Ezt követően a kinyerési hatékonyság és tisztaság alapján az eredetileg MnFe_2O_4 -re kidolgozott eljárást a többi részecskére is optimalizáltam, amely a kötő- és elúciós pufferek összetételének megváltoztatását jelentette. Mindegyik MNP esetben sikerült legalább egy olyan pufferösszetételt (1. Tris-HCl; 2. PB; vagy 3. Tris-HCl, NaCl) és ezáltal protokollt meghatározni, amely nagy mennyiségű, további felhasználásra alkalmas és jó tisztaságú, *E. coli* baktériumból származó pDNS kinyerését tette lehetővé. Az MNP-protokoll kombinációk hatékonyságát agaróz gélelektroforézissel, UV-Vis spektrofotometriás méréssel, restriktív endonukleázok által katalizált reakciókkal, qPCR vizsgálatokkal és transzformálással ellenőriztem, továbbá összehasonlítottam kereskedelmi forgalomban kapható, affinitásoszlop- és MNP-alapú kitek hatékonyságával. A hat vizsgált nanorészecske-típus közül kizárólag az amino-funkciós csoporttal ellátott magnézium-ferrit működött mindegyik kidolgozott protokollal, így ez bizonyult a legkevésbé érzékenynek a

kémiai körülmények változására. Ennek alapján a további nukleinsavtípusokra irányuló izolálási protokollokat a $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-vel kísérleteztem ki, valamint ugyanezen mágneses nanorészecskét alkalmaztam komplexebb forrásból (humán vérszérum és *E. coli* sejtszuszpenzió keverékére) történő pDNS-izolálásra is. A genomi DNS-izolálási módszert több kereskedelmi forgalomban kapható készlet, illetve szakirodalomban megjelent publikáció protokollja alapján fejlesztettem ki, és Gram-negatív (*E. coli*, *P. fluorescens*), illetve Gram-pozitív (*M. luteus*, *B. subtilis*) baktériumokra egyaránt teszteltem. Az eredmények összességében kedvezőbbek voltak, mint az MNP-alapú készlettel végzett kísérletek esetében, bár nagy mennyiségű genomi DNS kizárólag az affinitás oszlop-alapú készlettel volt kinyerhető. Az extrahált nukleinsav tiszta volt, és további molekuláris biológiai felhasználásokra (spektrofotometriás mérés, agaróz gélelektroforézis és qPCR) alkalmasnak bizonyult. Az amino-funkciós csoporttal rendelkező magnézium-ferritről elmondható, hogy bakteriális (*E. coli*) RNS-izolálásra is alkalmazható. Bár az MNP-alapú RNS-izoláló készlettel összehasonlítva kisebb mennyiségű ribonukleinsav nyerhető ki, a kutatás során kifejlesztett módszer mind kvantitatív, mind pedig kvalitatív szempontból megfelelő ribonukleinsavat eredményezett, amely RT-PCR vizsgálatban kiváló templátként szolgált.

Összességében elmondható, hogy az anyagtudomány és molekuláris biológia határterületén elhelyezkedő kutatásom elsősorban a bakteriális plazmid DNS-re terjedt ki részletesen, hiszen ez az a molekula, amelyet a biotechnológiai kutatás leggyakrabban alkalmaz kis mérete, egyszerű hozzáférhetősége és könnyű manipulálhatósága miatt. Erre a cirkuláris, főleg baktériumokban előforduló, dsDNS molekulára olyan protokollokat fejlesztettem ki, amelyek nemcsak sokkal költséghatékonyabbak a hagyományos vagy kereskedelmi forgalomban kapható módszereknél, hanem teljes mértékben mellőzik a felhasználó számára toxikus vegyszerek használatát is. Ezen túlmenően az eljárások minimális laboratóriumi infrastruktúrát igényelnek, így korlátozottabb anyagi forrásokkal rendelkező laborokban is könnyen alkalmazhatók. A nanorészecskék szintézise és a kidolgozott protokollok egyaránt megtalálhatók a doktori értekezés alapjául szolgáló nyílt hozzáférésű publikációkban, ezzel is elősegítve más kutatók munkáját. Abból adódóan, hogy a kidolgozott módszerek (a sejtlízist követően) már nem igényelnek centrifugálási lépéseket, a folyamatok könnyen automatizálhatók: mágneses modulával ellátott pipettázó robot segítségével akár 96 minta párhuzamos preparálása is megvalósítható. Ezáltal a diagnosztikai célú nukleinsav-izolációs folyamatok is egyszerűsíthetők, lehetővé téve a gyorsabb, hatékonyabb betegségfelismerést, valamint a megfelelő terápia mielőbbi megkezdését.

8. Summary

We are living through the revolution of magnetic nanoparticles. These inorganic materials, characterized by highly diverse and specific chemical and physical properties, can be applied extremely broadly. They are widely used in fields ranging from sensor fabrication and agricultural applications to medicine, and they play a significant role in industrial use, research and everyday life alike. Due to their nanoscale dimensions, these materials possess a very high specific surface area, making them suitable for the adsorption of large amounts of various molecules. Exploiting this property, I developed bacterial nucleic acid isolation protocols for the extraction of plasmid DNA (pDNA), genomic DNA (gDNA), and RNA molecules that are competitive with both well-established traditional methods and commercially available kits.

During my PhD research, I investigated the nucleic acid adsorption and isolation capabilities of ferrite-based magnetic nanoparticles and compared their efficiencies. For pDNA isolation, I tested all magnetic nanoparticles available in our laboratory: MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, NiFe_2O_4 , $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, MgFe_2O_4 , $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$. Using manganese ferrite as a model system, I determined the optimal starter cell amount, nanoparticle concentration and number of elution steps required for efficient extraction. I compared the pDNA isolation efficiency of amino-functionalized magnesium ferrite particles subjected to different heat treatment durations during synthesis and found that magnetic nanoparticles produced by 4 minutes of microwave treatment exhibited as good performance as those treated for 12 hours. Since their compositions are identical, the 4-minute treatment proved more advantageous in terms of both cost and time efficiency. Subsequently, based on extraction efficiency and purity, I optimized the procedure originally developed for MnFe_2O_4 for the other nanoparticles as well, which involved modifying the compositions of the binding and elution buffers. For each MNP, I identified at least one buffer composition (1. Tris-HCl; 2. PB; or 3. Tris-HCl, NaCl) and corresponding protocol that enabled the extraction of large amounts of high-purity pDNA from *E. coli* suitable for downstream applications. The efficiency of the MNP-protocol combinations was evaluated using agarose gel electrophoresis, UV-Vis spectrophotometry, restriction endonuclease-catalyzed reactions, qPCR analyses and transformation experiments. The results were compared with those obtained using commercially available affinity column- and MNP-based kits. Among the six nanoparticle types examined, only amino-functionalized magnesium ferrite performed successfully with all developed protocols, making it the least sensitive to changes in chemical conditions.

Based on these findings, $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNPs were used for subsequent nucleic acid isolation experiments and were also applied to pDNA isolation from more complex sources, such as mixtures of human blood serum and *E. coli* cell suspensions.

The genomic DNA isolation method was developed based on several commercially available kits and protocols published in the literature and was tested on both Gram-negative (*E. coli*, *P. fluorescens*) and Gram-positive (*M. luteus*, *B. subtilis*) bacteria. Overall, the results were more favorable than those obtained using an MNP-based commercial kit, although larger amounts of gDNA could only be extracted using an affinity column-based kit. The isolated nucleic acids were of high purity and proved suitable for further molecular biological applications, including spectrophotometric measurements, agarose gel electrophoresis and qPCR.

Amino-functionalized magnesium ferrite was also shown to be suitable for bacterial (*E. coli*) RNA isolation. Although this method yielded lower amounts of RNA than a commercial MNP-based RNA extraction kit, the protocol developed during this research produced ribonucleic acid of adequate quantity and quality, which served as an excellent template for RT-PCR analyses.

Overall, this research – situated at the interface of materials science and molecular biology – focused most extensively on bacterial plasmid DNA, as this molecule is most frequently used in biotechnological research due to its small size, easy accessibility and simple manipulability. For this circular, double-stranded DNA molecule, primarily found in bacteria, I developed protocols that are not only significantly more cost-effective than traditional or commercially available methods but also completely eliminate the use of chemicals toxic to laboratory personnel. Furthermore, these procedures require minimal laboratory infrastructure, making them easily applicable in laboratories with limited financial resources. Both the nanoparticle synthesis procedures and the developed protocols are described in open-access publications forming the basis of this doctoral thesis, thereby facilitating the work of other researchers. Since the developed methods do not require centrifugation steps following cell lysis, the workflows are easily automatable, enabling the parallel preparation of up to 96 samples using a pipetting robot equipped with a magnetic module. As a result, diagnostic nucleic acid isolation processes can also be simplified, allowing faster and more efficient disease detection and the earlier initiation of appropriate therapy.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném őszinte köszönetemet kifejezni a témavezetőmnek, Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, aki szakmai tudásával, türelmével, segítőkészségével és kedves, emberi hozzáállásával végig kísért a doktori képzésen. Ajtaja **mindig** nyitva áll, mellyel példát mutat a hallgatóinak, kollégáinak, és példaképpé válik sokak számára, köztük számomra is.

Köszönettel tartozom a Kémiai Intézet és a FIEK igazgatójának, egy személyben Prof. Dr. Viskolcz Bélának, aki megteremtette az infrastrukturális lehetőséget a doktori kutatásom kivitelezéséhez. Köszönöm, hogy részt vehettem projekteken, amelyek tovább mélyítették a szakmai tudásom a PhD-m témakörében. Öröm olyan kutatóintézet tagja lenni, ahol a vezető és a kollégák támogatják a fejlődést, a konferenciárészvételeket és a külföldi kapcsolatteremtés lehetőségeit.

Köszönöm Dr. Vanyorek László habilitált egyetemi docensnek és Állné Ilosvai Ágnes doktorjelöltnek, hogy a mágneses nanorészecskéket elkészítették és karakterizálták. Hálás köszönetem a hallgatótársaimnak, különösképpen a kutatócsoportunk tagjainak, Karinának, Anikónak és Orsinak, akik mindig segítőkészen fordultak hozzám, és akik nélkül nem telt volna olyan jól ez a négy év. Köszönöm Dalmának, hogy mindent nevetve és együtt csináltunk végig, nélküle ez az utazás sokkal unalmasabb lett volna. Köszönettel tartozom a KI és a FIEK munkatársainak is, az oktatóknak, a kutatóknak és az adminisztrációs dolgozóknak egyaránt.

Nagyon köszönöm a Doktori Iskola támogatását. A Doktori Tanácsban való részvétel megerősített abban, hogy olyan közegben folytattam a tanulmányaimat, ahol a hallgatók érdeke mindig az első helyen áll. Köszönöm a Doktori Iskola adminisztratív dolgozóinak is a rengeteg segítséget, és a töretlenül kedves hozzáállásukat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a vőlegényem, a családom és a barátaim támogatását, akik mindig szurkoltak nekem, és mindig kíváncsian hallgatták a legújabb tudományos kísérletem sikerességét vagy éppen sikertelenségét, még azok is, akik nem értették, hogy miről beszélek. Köszönöm, hogy hisztek bennem.

10. Szakirodalmi közlemények

10.1. Értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tímea B. Gerzsenyi**, Ágnes M. Ilosvai, Ferenc Kristály, Lajos Daróczi, Michael C. Owen, Béla Viskolcz, László Vanyorek, Emma Szőri-Dorogházi. Investigation and optimization of DNA isolation efficiency using ferrite-based magnetic nanoparticles. *Biotechnology Reports* 2025, Volume 47, e00904; <https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00904> (SJR indikátor: Q1, IF: 6,7)
2. **Tímea B. Gerzsenyi**, Ágnes M. Ilosvai, Gergely Szilágyi, Milán Szőri, Csaba Váradi, Béla Viskolcz, László Vanyorek, Emma Szőri-Dorogházi. A Simplified and Efficient Method for Production of Manganese Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Isolation. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(3), 2156; <https://doi.org/10.3390/ijms24032156> (SJR indikátor: D1, IF: 5,6)
3. Ágnes M. Ilosvai, **Tímea B. Gerzsenyi**, Emőke Sikora, Lajos Harasztosi, Ferenc Kristály, Béla Viskolcz, Csaba Váradi, Emma Szőri-Dorogházi, László Vanyorek. Simplified Synthesis of the Amine-Functionalized Magnesium Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Purification Method. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(18), 14190; <https://doi.org/10.3390/ijms241814190> (SJR indikátor: D1, IF: 5,6)

10.2. További, referált folyóiratokban megjelenő közlemények

1. Mohammed Ahmed Shehab, Emma Szőri-Dorogházi, **Tímea B. Gerzsenyi**, Munaf Al-lami, Andrea Valsesia, Tamás Szabó, Khalid T. Rashid, Adnan A. AbdulRazak, Anett K. Leskó, Haidar Hasan Mohammed, Zoltán Németh. Utilization of semiconductor-decorated tungsten trioxide nanowire membranes for the elimination of microorganisms from potable water. *RSC Advances*, 2025, 15, 28613-28625; <https://doi.org/10.1039/D5RA04826E> (SJR indikátor: Q1, IF: 4,6)
2. Pal Boto, **Tímea Beatrix Gerzsenyi**, Adel Lengyel, Balint Szunyog, Istvan Szatmari. Zbtb46-Dependent Altered Developmental Program in Embryonic Stem Cell-Derived Blood Cell Progenitors. *Stem Cells* 2021, Volume 39, Issue 10, Pages 1322–1334, <https://doi.org/10.1002/stem.3424> (SJR indikátor: Q1, IF: 5,845)

10.3. További, nem referált folyóiratokban megjelenő közlemények

1. **Tímea Gerzsenyi**, Viktória Papp, Emma Szőri-Dorogházi. From Soil to Sequence: Magnetic Nanoparticles as Enablers of Metagenomic Monitoring in Remediation.

- Symposium on Polymer(s) Innovation & Soil Innovation for Regenerative Agriculture booklet (SPI-SIRA) 2025* pp. 32-39, ISBN: 9789633584057 (2025)
2. **Gerzsenyi Tímea**, Papp Viktória, Szőri-Dorogházi Emma. Bakteriális DNS-izolálása talajmintából, különös tekintettel a nanorészecskékkel történő extrakcióra – szakirodalmi áttekintés. *Doktorandusz Almanach* (2939-7294): 2025 (1) pp 63-68 (2025)
 3. Dalma Dojcsák, Csaba Váradi, **Tímea B. Gerzsenyi**, Emma Szőri-Dorogházi. The Use of Automated Liquid Handling in Combination with Magnetic Nanoparticles for Robotic DNA Isolation and PCR Setup. *Symposium on Polymer(s) Innovation 2024 & Energy, Mitigation, Storage: Conference booklet*, (1) Miskolc-Egyetemváros: Miskolci Egyetem, Felsőoktatási és Ipari Együttműködési Központ, pp 61-76 (2024)
 4. **Tímea Gerzsenyi**, Emőke Bartók, Orsolya Alberti, Emma Szőri-Dorogházi. Mágneses nanorészecskék adszorpciós és antibakteriális hatásának vizsgálata. *XXX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár: Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság Absztraktkötet*, pp 23-23 (Nemzetközi Vegyészkonf. 1843-6293 2734-7109; 30) (2024)
 5. **Gerzsenyi Tímea**, Szőri-Dorogházi Emma. Hazai gyártású SYBR Green és STYO9 fluoreszcens festékanalógok kvalitatív tesztelése qPCR reakciókban. *Doktorandusz Almanach* (2939-7294): 1 pp 231-238 (2024)
 6. **Gerzsenyi Tímea**, Szőri-Dorogházi Emma. Amin-csoporttal ellátott mangán-ferrit mágneses nanorészecskék tesztelése pDNS-izolálásra bakteriális sejtekből. *Doktorandusz Almanach* (2939-7294): 2023 (1) pp 138-142 (2023)
 7. **Gerzsenyi Tímea**, Varga Lilla, Szőri-Dorogházi Emma, Vanyorek László. Antibakteriális hatóanyagú nano ezüst PUR kompozitok fejlesztése. *Symposium on Polyurethane Innovation - SPI 2022, Conference publications*, Miskolc-Egyetemváros: Miskolci Egyetem, Felsőoktatási és Ipari Együttműködési Központ, Miskolci Egyetem, Kémiai Intézet, pp 174-181 (2022)
 8. **Gerzsenyi Tímea B.**, Szőri-Dorogházi Emma. DNS-izolálási módszerek és kvantitatív eljárások áttekintése. *Doktorandusz Almanach* (2939-7294): 1 pp 109-115 (2022)

11. Hivatkozások

Összes hivatkozás száma: 34

Független hivatkozások száma: 23

h-index: 3

12. Szakirodalmi jegyzék

- [1] Milo R, Phillips R. Cell biology by the numbers. Garland Science; 2015.
- [2] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th 2012;448.
- [3] Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Biomed Res Int 2009;2009:574398.
- [4] Toxicological Profile for Phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry n.d.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of chloroform (CAS No. 67-66-3) 2001.
- [6] Gerzsényi TB, Ilosvai ÁM, Kristály F, Daróczy L, Owen MC, Viskolcz B, Vanyorek L, Szőri-Dorogházi E. Investigation and Optimization of DNA Isolation Efficiency Using Ferrite-Based Magnetic Nanoparticles. Biotechnology Reports 2025:e00904.
- [7] Shin JH. Nucleic Acid Extraction Techniques. In: Tang Y-W, Stratton CW, editors. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Boston, MA: Springer US; 2013, p. 209–25.
- [8] Bandyopadhyay A, Chatterjee S, Sarkar K. Rapid isolation of genomic DNA from *E. coli* XL1 Blue strain approaching bare magnetic nanoparticles. Curr Sci 2011;210–4.
- [9] Xu J, Chen D, Yang Y, Gong H, Gao W, Xiao H. A one step method for isolation of genomic DNA using multi-amino modified magnetic nanoparticles. RSC Adv 2021;11:3324–32.
- [10] Inoue J, Huber N, Fendel R, Held J. Automated total nucleic acid extraction with magnetic beads for the detection of *Plasmodium falciparum* in large study cohorts. Malar J 2024;23:398.
- [11] Cui H, Song W, Ru X, Fu W, Ji L, Zhou W, Zhao Z, Qu G, Yu X-F, Jiang G. A simplified viral RNA extraction method based on magnetic nanoparticles for fast and high-throughput detection of SARS-CoV-2. Talanta 2023;258:124479.
- [12] Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson JJJ. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J Phys D Appl Phys 2003;36:R167.
- [13] Tang C, He Z, Liu H, Xu Y, Huang H, Yang G, Xiao Z, Li S, Liu H, Deng Y. Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection. J Nanobiotechnology 2020;18:62.
- [14] Ilosvai ÁM, Gerzsényi TB, Sikora E, Harasztosi L, Kristály F, Viskolcz B, Váradi C, Szőri-Dorogházi E, Vanyorek L. Simplified Synthesis of the Amine-Functionalized Magnesium Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Purification Method. Int J Mol Sci 2023;24:14190.

- [15] Fathi Karkan S, Mohammadhosseini M, Panahi Y, Milani M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Abasi E, Hosseini A, Davaran S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017;45:1–5.
- [16] Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, Lammers T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;138:302–25.
- [17] Li D, Pan D, Li S, Zhang Z. Recent developments of rare-earth-free hard-magnetic materials. *Sci China Phys Mech Astron* 2016;59:617501.
- [18] Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, AlSalhi MS, Alrokayan SA. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* 2011;283:101–8.
- [19] Ditta A, Khan MA, Junaid M, Khalil RMA, Warsi MF. Structural, magnetic and spectral properties of Gd and Dy co-doped dielectrically modified Co-Ni (Ni_{0.4}Co_{0.6}Fe₂O₄) ferrites. *Physica B Condens Matter* 2017;507:27–34.
- [20] Jalaiah K, Babu KV. Structural, magnetic and electrical properties of nickel doped Mn-Zn spinel ferrite synthesized by sol-gel method. *J Magn Magn Mater* 2017;423:275–80.
- [21] Parodi F. 19 - Physics and Chemistry of Microwave Processing. In: Allen G, Bevington JC, editors. *Comprehensive Polymer Science and Supplements*, Amsterdam: Pergamon; 1989, p. 669–728.
- [22] Issa B, Obaidat IM, Albiss BA, Haik Y. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci* 2013;14:21266–305.
- [23] Ho DON, Sun X, Sun S. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Res* 2011;44:875–82.
- [24] Lluís M. Martínez. Reversible and irreversible aggregation of magnetic particles. *SEPMAG Smart & Scalable Magnetic Bead Separators* 2016.
- [25] Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev* 2012;112:5818–78.
- [26] Raeisi Shahraki R, Ebrahimi M, Seyyed Ebrahimi SA, Masoudpanah SM. Structural characterization and magnetic properties of superparamagnetic zinc ferrite nanoparticles synthesized by the coprecipitation method. *J Magn Magn Mater* 2012;324:3762–5.
- [27] Răcuciu M, Oancea S, Barbu-Tudoran L, Drăghici O, Agavriloaei A, Creangă D. A Study of Hyaluronic Acid's Theoretical Reactivity and of Magnetic Nanoparticles Capped with Hyaluronic Acid. *Materials* 2024;17:1229.

- [28] Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Multifunctional iron oxide nanoparticles as promising magnetic biomaterials in drug delivery: a review. *J Funct Biomater* 2024;15:227.
- [29] Faaliyan K, Abdoos H, Borhani E, Afghahi SSS. Magnetite-silica nanoparticles with core-shell structure: Single-step synthesis, characterization and magnetic behavior. *J Solgel Sci Technol* 2018;88:609–17.
- [30] Garrett RH, Grisham CM. *Biochemistry*. Brooks. Cole, Cengage Learning 2010:321–3.
- [31] Kasyanenko N, Khansetsen B, Baryshev A, Sokolov P. DNA Persistent Length in Solutions of Different pH. *Int J Mol Sci* 2025;27:316.
- [32] Vandeventer PE, Lin JS, Zwang TJ, Nadim A, Johal MS, Niemz A. Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions. *J Phys Chem B* 2012;116:5661–70.
- [33] Li H, Jin H, Li R, Hua J, Zhang Z, Li R. Magnetic Fe₃O₄@ SiO₂ study on adsorption of methyl orange on nanoparticles. *Sci Rep* 2024;14:1217.
- [34] Mohammed L, Gomaa HG, Ragab D, Zhu J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* 2017;30:1–14.
- [35] Liu J, Zhao Z, Jiang G. Coating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. *Environ Sci Technol* 2008;42:6949–54.
- [36] Dojcsák D, Ilosvai ÁM, Vanyorek L, Gilányi I, Oláh C, Horváth L, Váradi C. NH₂-Functionalized magnetic nanoparticles for the N-Glycomic analysis of patients with multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2022;23:9095.
- [37] Dippong T, Levei EA, Cadar O. Recent advances in synthesis and applications of MFe₂O₄ (M= Co, Cu, Mn, Ni, Zn) nanoparticles. *Nanomaterials* 2021;11:1560.
- [38] Murugesan C, Aroutchelvane J, Okrasa L, Chandrasekaran G. Synthesis and characterisation of superparamagnetic MgFe₂O₄ nanoferrite. *J Supercond Nov Magn* 2018;31:3255–62.
- [39] Mondal DK, Borgohain C, Paul N, Borah JP. Tuning hyperthermia efficiency of MnFe₂O₄/ZnS nanocomposites by controlled ZnS concentration. *Journal of Materials Research and Technology* 2019;8:5659–70.
- [40] Huang W-H, Wu R-M, Chang J-S, Juang S-Y, Lee D-J. Manganese ferrite modified agricultural waste-derived biochars for copper ions adsorption. *Bioresour Technol* 2023;367:128303.
- [41] Asghar K, Qasim M, Das D. Preparation and characterization of mesoporous magnetic MnFe₂O₄@ mSiO₂ nanocomposite for drug delivery application. *Mater Today Proc* 2020;26:87–93.

- [42] Kalaiselvan CR, Thorat ND, Sahu NK. Carboxylated PEG-functionalized MnFe₂O₄ nanocubes synthesized in a mixed solvent: morphology, magnetic properties, and biomedical applications. *ACS Omega* 2021;6:5266–75.
- [43] Islam K, Haque M, Kumar A, Hoq A, Hyder F, Hoque SM. Manganese ferrite nanoparticles (MnFe₂O₄): size dependence for hyperthermia and negative/positive contrast enhancement in MRI. *Nanomaterials* 2020;10:2297.
- [44] Tiwari I, Singh M, Pandey CM, Sumana G. Electrochemical detection of a pathogenic *Escherichia coli* specific DNA sequence based on a graphene oxide–chitosan composite decorated with nickel ferrite nanoparticles. *RSC Adv* 2015;5:67115–24.
- [45] Topkaya SN, Açarı İK, Kaya HO, Özcan İ, Köytepe S, Cetin AE. Interaction of nickel ferrite nanoparticles with nucleic acids. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2022;211:112282.
- [46] Zhang Q, Cao J, Zhao P, Zhang Y, Li Y, Xu S, Ye J, Qian C. Green synthesis of nickel ferrite nanoparticles for efficient enhancement of lignocellulosic hydrolysate-based biohydrogen production. *Biochem Eng J* 2023;194:108885.
- [47] Li F, Xia A, Guo X, Huang Y, Zhu X, Zhu X, Liao Q. Immobilization of fatty acid photodecarboxylase in magnetic nickel ferrite nanoparticle. *Bioresour Technol* 2023;385:129374.
- [48] Debnath S, Das R. Strong adsorption of CV dye by Ni ferrite nanoparticles for waste water purification: Fits well the pseudo second order kinetic and Freundlich isotherm model. *Ceram Int* 2023;49:16199–215.
- [49] Rodrigues ARO, Gomes IT, Almeida BG, Araújo JP, Castanheira EMS, Coutinho PJG. Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2015;17:18011–21.
- [50] Alijani HQ, Irvani S, Pourseyedi S, Torkzadeh-Mahani M, Barani M, Khatami M. Biosynthesis of spinel nickel ferrite nanowhiskers and their biomedical applications. *Sci Rep* 2021;11:17431.
- [51] Hyder F, Manjura Hoque S. Brain tumor diagnostics and therapeutics with superparamagnetic ferrite nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging* 2017;2017:6387217.
- [52] Martínez-Rodríguez NL, Tavárez S, González-Sánchez ZI. In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. *Toxicology in Vitro* 2019;57:54–61.
- [53] Khan MS, Buzdar SA, Hussain R, Afzal G, Jabeen G, Javid MA, Iqbal R, Iqbal Z, Mudassir KB, Saeed S. Hematobiochemical, oxidative stress, and histopathological mediated toxicity induced by nickel ferrite (NiFe₂O₄) nanoparticles in rabbits. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022:5066167.

- [54] Ahamed M, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Khan MAM, Alrokayan SA. Comparative cytotoxic response of nickel ferrite nanoparticles in human liver HepG2 and breast MFC-7 cancer cells. *Chemosphere* 2015;135:278–88.
- [55] Al-Qubaisi MS, Rasedee A, Flaifel MH, Ahmad SH, Hussein-Al-Ali S, Hussein MZ, Zainal Z, Alhassan FH, Taufiq-Yap YH, Eid EEM. Induction of apoptosis in cancer cells by NiZn ferrite nanoparticles through mitochondrial cytochrome C release. *Int J Nanomedicine* 2013:4115–30.
- [56] Al-Qubaisi MS, Rasedee A, Flaifel MH, Ahmad SHJ, Hussein-Al-Ali S, Hussein MZ, Eid EEM, Zainal Z, Saeed M, Ilowefah M. Cytotoxicity of nickel zinc ferrite nanoparticles on cancer cells of epithelial origin. *Int J Nanomedicine* 2013:2497–508.
- [57] Ubhi MK, Kaur M, Grewal JK, Oliveira AC, Garg VK, Sharma VK. Correction: Insight into photocatalytic behavior of magnesium ferrite–bentonite nanocomposite for the degradation of organic contaminants. *J Mater Res* 2024;39:1594–6.
- [58] Ehi-Eromosele CO, Olugbuyirozz JAO, Taiwo OS, Baboye OA, Ango CE. Synthesis and evaluation of the antimicrobial potentials of cobalt doped-and magnesium ferrite spinel nanoparticles. *Bull Chem Soc Ethiop* 2018;32:451–8.
- [59] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 2012;30:499–511.
- [60] Alghamdi N, Stroud J, Przybylski M, Żukrowski J, Hernandez AC, Brown JM, Hankiewicz JH, Celinski Z. Structural, magnetic and toxicity studies of ferrite particles employed as contrast agents for magnetic resonance imaging thermometry. *J Magn Magn Mater* 2020;497:165981.
- [61] Nonkumwong J, Pakawanit P, Wipatanawin A, Jantaratana P, Ananta S, Srisombat L. Synthesis and cytotoxicity study of magnesium ferrite-gold core-shell nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* 2016;61:123–32.
- [62] Yang G, Li X, Zhao Z, Wang W. Preparation, characterization, in vivo and in vitro studies of arsenic trioxide Mg-Fe ferrite magnetic nanoparticles. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:1688–93.
- [63] Kanagesan S, Hashim M, Tamilselvan S, Alitheen NB, Ismail I, Bahmanrokh G. Cytotoxic effect of nanocrystalline MgFe₂O₄ particles for cancer cure. *J Nanomater* 2013;2013:865024.
- [64] Symons MCR, Gutteridge JMC. Free radicals and iron: chemistry, biology, and medicine. Oxford University Press; 1998.
- [65] Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350:569–73.
- [66] Wang X, Llopis PM, Rudner DZ. Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet* 2013;14:191–203.

- [67] Clark DP, Pazdernik NJ. Chapter e20 - Plasmids. In: Clark DP, Pazdernik NJ, editors. *Molecular Biology (Second Edition)*, Boston: Academic Press; 2013, p. e473–8.
- [68] Singh S, Naik J, Pandey A. Genetics of plant organelles: plastid and mitochondrial genomes. *Plant genomics for sustainable agriculture*, Springer; 2022, p. 313–30.
- [69] Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953;171:737–8.
- [70] Crick FHC, Watson JD. The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci* 1954;223:80–96.
- [71] Pershina AG, Sazonov AE, Filimonov VD. Magnetic nanoparticles–DNA interactions: design and applications of nanobiohybrid systems. *Russian Chemical Reviews* 2014;83:299.
- [72] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;362:709–15.
- [73] Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3741–51.
- [74] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495–503.
- [75] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 1961;3:208-IN1.
- [76] Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2008;2:187–200.
- [77] Rhee S-K, Liu X, Wu L, Chong SC, Wan X, Zhou J. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4303–17.
- [78] Ali N, Rampazzo R de CP, Costa ADT, Krieger MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Res Int* 2017;2017:9306564.
- [79] Salje J, Gayathri P, Löwe J. The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:683–92.
- [80] Cervantes-Rivera R, Pedraza-López F, Pérez-Segura G, Cevallos MA. The replication origin of a repABC plasmid. *BMC Microbiol* 2011;11:158.
- [81] Ádám V, Dux L, Faragó A, Fésüs L, Machovich R, Mandl J, Sümegei B. *Orvosi biokémia*. vol. 3. Medicina Könyvkiadó; 2006.

- [82] Svára F, Rankin DJ. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. *BMC Evol Biol* 2011;11:130.
- [83] Baranello L, Levens D, Gupta A, Kouzine F. The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 2012;1819:632–8.
- [84] Viret JF, Bravo A, Alonso JC. Recombination-dependent concatemeric plasmid replication. *Microbiol Rev* 1991;55:675–83.
- [85] Hintermann G, Fischer H-M, Cramer R, Hütter R. Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* 1981;5:371–3.
- [86] Promega Corporation. *Protocols and applications guide*. Madison, WI: Promega; 1996.
- [87] Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:495–504.
- [88] Miao Z, Westhof E. RNA structure: advances and assessment of 3D structure prediction. *Annu Rev Biophys* 2017;46:483–503.
- [89] Cui Y, Zhang Y, Zhou K, Sun J, Zhou ZH. Conservative transcription in three steps visualized in a double-stranded RNA virus. *Nat Struct Mol Biol* 2019;26:1023–34.
- [90] Borkhardt A, Novosel A. RNA Interference (RNAi) – siRNA. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008, p. 1091–4.
- [91] Kornienko I V, Aramova OY, Tishchenko AA, Rudoy D V, Chikindas ML. RNA stability: a review of the role of structural features and environmental conditions. *Molecules* 2024;29:5978.
- [92] Schaeffer D, Van Hoof A. Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:2366–71.
- [93] Maurer M, Klassert TE, Löffler B, Slevogt H, Tuchscher L. Extraction of High-Quality RNA from *S. aureus* Internalized by Endothelial Cells. *Microorganisms* 2023;11:1020.
- [94] Strider W, Camien MN, Warner RC. Renaturation of denatured, covalently closed circular DNA. *Journal of Biological Chemistry* 1981;256:7820–9.
- [95] Park D. Genomic DNA Isolation From Different Biological Materials. In: Hilario E, Mackay J, editors. *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, Totowa, NJ: Humana Press; 2007, p. 3–13.

- [96] Pei Y, Mamtimin T, Ji J, Khan A, Kakade A, Zhou T, Yu Z, Zain H, Yang W, Ling Z. The guanidine thiocyanate-high EDTA method for total microbial RNA extraction from severely heavy metal-contaminated soils. *Microb Biotechnol* 2021;14:465–78.
- [97] Bardwell VJ, Wickens M. Purification of RNA and RNA-protein complexes by an R17 coat protein affinity method. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6587–94.
- [98] Sosa-Acosta JR, Silva JA, Fernández-Izquierdo L, Díaz-Castañón S, Ortiz M, Zuaznabar-Gardona JC, Díaz-García AM. Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2018;545:167–78.
- [99] Ernst C, Bartel A, Elferink JW, Huhn J, Eschbach E, Schönfeld K, Feßler AT, Oberheitmann B, Schwarz S. Improved DNA extraction and purification with magnetic nanoparticles for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2019;230:45–8.
- [100] Shabatina TI, Vernaya OI, Shabatin VP, Melnikov MY. Magnetic nanoparticles for biomedical purposes: Modern trends and prospects. *Magnetochemistry* 2020;6:30.
- [101] Pročkalová J, Rittich B, Španová A, Petrová K, Beneš MJ. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *J Chromatogr A* 2004;1056:43–8.
- [102] Rittich B, Španová A, Horák D, Beneš MJ, Klesnilová L, Petrová K, Rybníkář A. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;52:143–8.
- [103] Chiang C-L, Sung C-S, Wu T-F, Chen C-Y, Hsu C-Y. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B* 2005;822:54–60.
- [104] Min JH, Woo M-K, Yoon HY, Jang JW, Wu JH, Lim C-S, Kim YK. Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. *Anal Biochem* 2014;447:114–8.
- [105] Wu H-X, Wang T-J, Jin Y. Effects of –OH groups on Fe₃O₄ particles on the heterogeneous coating in a hydrous alumina coating process. *Ind Eng Chem Res* 2007;46:761–6.
- [106] Saiyed ZM, Ramchand CN, Telang SD. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2008;20:204153.
- [107] Basu S, Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Potential application of superparamagnetic nanoparticles for extraction of bacterial genomic DNA from contaminated food and environmental samples. *J Sci Food Agric* 2013;93:788–93.

- [108] Firoozeh F, Neshan A, Khaledi A, Zibaei M, Amiri A, Sobhani A, Badmasti F, Nikbin VS. Evaluation of the effect of magnetic nanoparticles on extraction of genomic DNA of *Escherichia coli*. *Polymer Bulletin* 2023;80:3153–63.
- [109] Rombouts S, Nollmann M. RNA imaging in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2021;45:fuaa051.
- [110] Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE. What are housekeeping genes? *PLoS Comput Biol* 2022;18:e1010295.
- [111] Capriotti N, Morales LCA, de Sousa E, Juncal L, Pidre ML, Traverso L, López MF, Ferelli ML, Lavorato G, Lillo C. Silica-coated magnetic particles for efficient RNA extraction for SARS-CoV-2 detection. *Heliyon* 2024;10.
- [112] Wang J, Ali Z, Si J, Wang N, He N, Li Z. Simultaneous extraction of DNA and RNA from hepatocellular carcinoma (Hep G2) based on silica-coated magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2017;17:802–6.
- [113] Wang J, Ali Z, Wang N, Liang W, Liu H, Li F, Yang H, He L, Nie L, He N. Simultaneous extraction of DNA and RNA from *Escherichia coli* BL 21 based on silica-coated magnetic nanoparticles. *Sci China Chem* 2015;58:1774–8.
- [114] Oberacker P, Stepper P, Bond DM, Höhn S, Focken J, Meyer V, Schelle L, Sugrue VJ, Jeunen G-J, Moser T. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS Biol* 2019;17:e3000107.
- [115] Gessner I, Yu X, Jüngst C, Klimpel A, Wang L, Fischer T, Neundorf I, Schauss AC, Odenthal M, Mathur S. Selective capture and purification of micRNAs and intracellular proteins through antisense-vectorized magnetic nanobeads. *Sci Rep* 2019;9:2069.
- [116] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169–93.
- [117] Munna MSA, Islam MM, Rabbi MA, Mefford OT, Malaj A, Islam MS, Ahmad H, Rahman MM. Synthesis and characterization of fluorescent magnetic nanoparticles: a dual-function platform for DNA separation and real-time visualization. *RSC Adv* 2025;15:37226–44.
- [118] Zapotoczny B, Dudek MR, Koziół JJ, Mleczko J. Nanobuffering property of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in aqueous solution. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* 2013;392:1493–9.
- [119] Wang J, Li K, Li F, Li X, Zhou J, Yang M, Zhang X, Wang M, Li L. Interaction of Nanomaterials with Nucleic Acids and Their Applications in Nucleic Acid Analysis. *Int J Biol Sci* 2025;21:4051.
- [120] Donnarumma G, Buommino E, Fusco A, Paoletti I, Auricchio L, Tufano MA. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental

- microorganism to a potential human pathogen. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:227–34.
- [121] Tuttle AR, Trahan ND, Son MS. Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Curr Protoc* 2021;1:e20.
- [122] Errington J, Aart LT van der. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (N Y)* 2020;166:425–7.
- [123] Mukamolova G V, Yanopolskaya ND, Kell DB, Kaprelyants AS. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:237–43.
- [124] Gerzsenyi TB, Ilosvai ÁM, Szilágyi G, Szőri M, Váradi C, Viskolcz B, Vanyorek L, Szőri-Dorogházi E. A simplified and efficient method for production of manganese ferrite magnetic nanoparticles and their application in DNA isolation. *Int J Mol Sci* 2023;24:2156.
- [125] QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. 2021.
- [126] Treitli SC. BOMB plasmid DNA extraction using Sera-Mag carboxylated beads. *Bomb.bio*, 2019; #5.3 <https://bomb.bio/protocols/>
- [127] Shan Z, Jiang Y, Guo M, Bennett JC, Li X, Tian H, Oakes K, Zhang X, Zhou Y, Huang Q. Promoting DNA loading on magnetic nanoparticles using a DNA condensation strategy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;125:247–54.
- [128] Tanaka T, Sakai R, Kobayashi R, Hatakeyama K, Matsunaga T. Contributions of phosphate to DNA adsorption/desorption behaviors on aminosilane-modified magnetic nanoparticles. *Langmuir* 2009;25:2956–61.
- [129] Boesenberg-Smith KA, Pessaraki MM, Wolk DM. Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clin Microbiol Newsl* 2012;34:1–6.
- [130] Samuel M, Lu M, Pachuk CJ, Satishchandran C. A spectrophotometric method to quantify linear DNA. *Anal Biochem* 2003;313:301–6.
- [131] Omega Bio-tek. Mag-Bind® Ultra-Pure Plasmid DNA 96 Kit 2019:9–12.
- [132] Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv Biobank* 2016;14:264–70.
- [133] Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* 2012:3923.

- [134] Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005;62:685.
- [135] Roberts RJ, Murray K. Restriction endonuclease. *CRC Crit Rev Biochem* 1976;4:123–64.
- [136] Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:162–70.
- [137] Dang J, Mendez P, Lee S, Kim JW, Yoon J-H, Kim TW, Sailey CJ, Jablons DM, Kim I-J. Development of a robust DNA quality and quantity assessment qPCR assay for targeted next-generation sequencing library preparation. *Int J Oncol* 2016;49:1755–65.
- [138] Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and misuse of Cq in qPCR data analysis and reporting 2021;11:496.
- [139] Haas C, Hanson E, Banemann R, Bento AM, Berti A, Carracedo Á, Courts C, De Cock G, Drobic K, Fleming R. RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces—results of a sixth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2015;16:139–47.
- [140] Koetsier G, Cantor E. *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers*. New England Biolabs 2019.
- [141] Surzycki S. Agarose gel electrophoresis of DNA. *Basic techniques in molecular biology*, Springer; 2000, p. 163–91.
- [142] GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Saint Louis, MO, USA: 2018.
- [143] Qiagen. *Genomic DNA Handbook*. 2015.
- [144] Zymo Research. *Quick DNA MagBead Plus Kit*. 2023.
- [145] Omega Bio-tek. *E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit*. 2019.
- [146] Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci* 2017;24:1465–9.
- [147] Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)* 2017;8:83.
- [148] Hou Y, Han X, Chen J, Li Z, Chen X, Gai L. Isolation of PCR-ready genomic DNA from *Aspergillus niger* cells with Fe₃O₄/SiO₂ microspheres. *Sep Purif Technol* 2013;116:101–6.

- [149] Konečná J, Romanovská D, Horák D, Trachtová Š. Optimization of deoxyribonucleic acid extraction using various types of magnetic particles. *Chemical Papers* 2019;73:1247–55.
- [150] Bai Y, Roncancio D, Suo Y, Shao Y, Zhang D, Zhou C. A method based on amino-modified magnetic nanoparticles to extract DNA for PCR-based analysis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;179:87–93.
- [151] Andreou L-V. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Methods Enzymol.*, vol. 529, Elsevier; 2013, p. 143–51.
- [152] Reith J, Berking A, Mayer C. Characterization of an N-acetylmuramic acid/N-acetylglucosamine kinase of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 2011;193:5386–92.
- [153] Tan A. “What Is The Function Of A Tris Buffer In DNA Extraction?” *sciencing.com*. vol. 5. 2018.
- [154] Barra GB, Santa Rita TH, de Almeida Vasques J, Chianca CF, Nery LFA, Costa SSS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem* 2015;48:976–81.
- [155] Manzer K, Mubasher DAR, Anabela BG. *Nucleic Acid Purification Method*, 2008.
- [156] Sahoo SL, Liu C-H. Adsorption behaviors of DNA by modified magnetic nanoparticles: effect of spacer and salt. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2015;482:184–94.
- [157] Yıldırım E, Arıkan B, Yücel O, Çakır O, Kara NT, İyim TB, Gürdağ G, Emik S. Synthesis and characterization of amino functional poly (acrylamide) coated Fe₃O₄ nanoparticles and investigation of their potential usage in DNA isolation. *Chemical Papers* 2022;76:5747–59.
- [158] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [159] Yoshino K, Nishijima R, Kawakatsu T. Low-cost RNA extraction method for highly scalable transcriptome studies. *Breed Sci* 2020;70:481–6.
- [160] He H, Li R, Chen Y, Pan P, Tong W, Dong X, Chen Y, Yu D. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Sci Rep* 2017;7:45199.
- [161] Possebon FS, Ullmann LS, Malossi CD, Miodutzki GT, da Silva EC, Machado EF, Braga IS, Pelaquim IF, Araujo Jr JP. A fast and cheap in-house magnetic bead RNA extraction method for COVID-19 diagnosis. *J Virol Methods* 2022;300:114414.
- [162] Abarca-Cabrera L, Fraga-García P, Berensmeier S. Bio-nano interactions: binding proteins, polysaccharides, lipids and nucleic acids onto magnetic nanoparticles. *Biomater Res* 2021;25:12.

- [163] Hu W-P, Chen Y-C, Chen W-Y. Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane. *Sci Rep* 2020;10:21132.
- [164] Omega Bio-tek. Mag-Bind Total RNA 96 Kit Product Manual 2024;v5.2:12–7.
- [165] Bender AT, Sullivan BP, Lillis L, Posner JD. Enzymatic and chemical-based methods to inactivate endogenous blood ribonucleases for nucleic acid diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2020;22:1030–40.
- [166] Betzel C, Pal GP, Saenger W. Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *Eur J Biochem* 1988;178:155–71.
- [167] Gueroult M, Picot D, Abi-Ghanem J, Hartmann B, Baaden M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol* 2010;6:e1001000.
- [168] Mag Bind Ultra-Pure Plasmid DNA Kit (Omega Bio-tek). Norcross, GA, USA: 2014.
- [169] Wood WN, Smith KD, Ream JA, Lewis LK. Enhancing yields of low and single copy number plasmid DNAs from *Escherichia coli* cells. *J Microbiol Methods* 2017;133:46–51.
- [170] Addgene Vector Database n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608087> (accessed January 30, 2026).
- [171] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513–23.
- [172] Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 2017;13:1.
- [173] Pervaiz ZH, Turi NA, Khaliq I, Rabbani MA, Malik SA. Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. *Genet Mol Res* 2011;10:1669–73.
- [174] Gerzsenyi TB, Ilosvai ÁM, Szilágyi G, Szőri M, Váradi C, Viskolcz B, Vanyorek L, Szőri-Dorogházi E. A simplified and efficient method for production of manganese ferrite magnetic nanoparticles and their application in DNA isolation. *Int J Mol Sci* 2023;24:2156.
- [175] Ehrt S, Schnappinger D. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*, Springer; 2003, p. 75–8.
- [176] He X, Huo H, Wang K, Tan W, Gong P, Ge J. Plasmid DNA isolation using amino-silica coated magnetic nanoparticles (ASMNPs). *Talanta* 2007;73:764–9.
- [177] Ang D, Tay CY, Tan LP, Preiser PR, Ramanujan R V. In vitro studies of magnetically enhanced transfection in COS-7 cells. *Materials Science and Engineering: C* 2011;31:1445–57.

- [178] Yoshikawa K, Yoshikawa Y, Koyama Y, Kanbe T. Highly effective compaction of long duplex DNA induced by polyethylene glycol with pendant amino groups. *J Am Chem Soc* 1997;119:6473–7.
- [179] Savelyev A. Do monovalent mobile ions affect DNA's flexibility at high salt content? *Physical Chemistry Chemical Physics* 2012;14:2250–4.
- [180] Schlick T, Li B, Olson WK. The influence of salt on the structure and energetics of supercoiled DNA. *Biophys J* 1994;67:2146–66.
- [181] Padmesh S, Singh A, Chopra S, Sen M, Habib S, Shrivastava D, Johri P. Isolation and characterization of novel lytic bacteriophages that infect multi drug resistant clinical strains of *Escherichia coli*. *Environmental Science and Pollution Research* 2024;31:57327–37.
- [182] Mahalanabis M, Al-Muayad H, Kulinski MD, Altman D, Klapperich CM. Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram-negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip. *Lab Chip* 2009;9:2811–7.
- [183] Chern EC, Siefring S, Paar J, Doolittle M, Haugland RA. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett Appl Microbiol* 2011;52:298–306.

Mellékletek

1. Rövidítések jegyzéke

A = adenin

AGE = agaróz gélelektroforézis

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

bp = bázispár

C = citozin

CFU = telepképző egység (colony forming unit)

Cq = ciklusszám (quantification cycle)

DNáz = dezoxiribonukleáz

DNS = dezoxiribonukleinsav

- **cDNS** = komplementer DNS (complementary DNA)
- **dsDNS** = duplaszálú DNS
- **gDNS** = genomi DNS
- **ssDNS** = egyszálú DNS (simple stranded DNA)
- **pDNS** = plazmid DNS

dNTP = dezoxiribonukleozid-trifoszfát

DTT = ditioneitol

E. coli = *Escherichia coli*

E1, E2, E3, E4 = első, második, harmadik, negyedik elúciós frakció

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

F = felülúszó frakció

FTIR = Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier transform infrared spectroscopy)

G = guanin

G⁻ = Gram-negatív

G⁺ = Gram-pozitív

g-HCl = guanidin-hidroklorid

GTC = guanidinium-tiocianát

HRTEM = nagy felbontású transzmissziós elektronmikroszkópia (high-resolution transmission electron microscopy)

kb = kilobázispár

konc. = koncentráció

LB = Luria-Bertani

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MNP = mágneses nanorészecske (magnetic nanoparticle)

MRI = mágneses magrezonancia képalkotás ((nuclear) magnetic resonance imaging)

Ms = mágneses szaturáció

NPC = primereket nem tartalmazó kontroll (no primer control)

NTC = templátot nem tartalmazó kontroll (no template control)

OD = optikai denzitás

P. fluorescens = *Pseudomonas fluorescens*

PB = foszfát puffer (phosphate buffer)

PC = pozitív kontroll

PCR = polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)

PEG = polietilén-glikol

qPCR = kvantitatív PCR (quantitative PCR)

REáz = restrikciós endonukleáz

RFU = relatív fluoreszcencia egység (relative fluorescence unit)

RNáz = ribonukleáz

RNS = ribonukleinsav

- **miRNS** = mikro RNS
- **mRNS** = hírvivő RNS (messenger RNA)
- **rRNS** = riboszomális RNS
- **siRNS** = kis interferáló RNS (small interfering RNA)
- **sRNS** = kis RNS (small RNA)
- **ssRNS** = szimplaszálú/egyszálú RNS
- **tRNS** = transzfer RNS

RT = reverz transzkripció

SARS-CoV-2 = súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SDS = nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)

SPION = szuperparamágneses vas-oxid nanorészecske (superparamagnetic iron oxide nanoparticle)

T = timin

TAE = tris-ecetsav-EDTA (tris-acetate-EDTA)

TE = tris-EDTA

TEM = transzmissziós elektronmikroszkópia (transmission electron microscopy)

tris-bázis = tris-hidroximetil-aminometán

tris-HCl = tris-hidroklorid

U = uracil

UV-Vis = ultraibolya-látható (ultraviolet-visible)

VSM = vibráló minta magnetométer (vibrating-sample magnetometer)

XRD = Röntgen diffrakció (X-ray diffraction)

2. Felhasznált anyagok és eszközök

A bakteriális sejt kultúrák tenyésztéséhez felhasznált anyagok:

- tripton, élesztőkivonat (*Neogen Culture Media, Lansing, MI, USA*)
- nátrium-klorid, bakteriológiai agar (*VWR International, Leuven, Belgium*)
- ampicillin-nátriumsó (*Alfa Aesar, Kandel, Németország*)

A mágneses nanorészecskékkel történő reverzibilis DNS-kötési tesztekhez, illetve nukleinsav-izolálásokhoz (pDNS, gDNS, RNS) felhasznált anyagok:

- polietilén-glikol 6000, nátrium-klorid, kálium-acetát, nátrium-hidroxid, nátrium-dodecil-szulfát, Triton-X 100 (*VWR International, Leuven, Belgium*)
- tris-hidroklorid só (*VWR International, Solon, OH, USA*)
- etilén-diamin-tetraecetsav dinátriumsó, ditiotritol (*Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA*)
- 96% etanol (*VWR International, Fontenay-sous-Bois, Franciaország*)
- Tween 20 (*Merck Millipore, Billerica, MA, USA*)
- tris-(hidroximetil)-aminometán (Molar Chemicals, Halásztelek, Magyarország)
- ecetsav (*Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA*)
- RNáz A, proteináz K (*Apollo Scientific, Manchester, Egyesült Királyság*)
- lizozim (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA*)
- guanidin-hidroklorid (*MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA*)
- guanidinium-tiocianát, DNáz I (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)
- RNS elúciós puffer (*Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA*)
- magnézium-klorid (*Alfa Aesar, Kandel, Németország*)
- kalcium-klorid (*SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország*)

Az agaróz gélelektroforézishez felhasznált anyagok:

- brómfenolkék nátriumsó, tris-hidroklorid só (*VWR International, Solon, OH, USA*)
- etilén-diamin-tetraecetsav dinátriumsó (*Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA*)
- glicerol (*VWR International, Fontenay-sous-Bois, Franciaország*)
- ecetsav (*Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA*)
- GelRed[®] nukleinsav gélfesték, agaróz (*Merck Millipore, Billerica, MA, USA*)
- 50 bp DNA Ladder (*BioSystems, Barcelona, Spanyolország*)
- GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)

A restriktív emésztésekhez felhasznált anyagok:

- AgeI és AseI FastDigest[™] restriktív endonukleáz enzimek, 10× FastDigest[™] puffer (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)

A qPCR-hez és PCR-hez felhasznált anyagok:

- forward és reverse primerek (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)
 - Escherichia coli* (az *uidA* gén 70 bp kódoló régiója):**
 - *uidA* (forward): 5' – CGGAAGCAACGCGTAAACTC – 3'
 - *uidA* (reverse): 5' – TGAGCGTCGCAGAACATTACA – 3'
 - Pseudomonas fluorescens* (az *rpoB* gén 100 bp kódoló régiója):**
 - *rpoB* (forward): 5' – TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT – 3'
 - *rpoB* (reverse): 5' – AGATCTTGCGGCATCAGGCCTT – 3'
 - Micrococcus luteus* (a *16S rRNS* 177 bp kódoló régiója):**
 - *Miclut16S* (forward): 5' – ACTCCTACGGGAGGCAGCAG – 3'
 - *Miclut16S* (reverse): 5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'
 - Bacillus subtilis* (*Bacillus spp.* specifikus primerek):**
 - *BacF* (forward): 5' – GCTGGTTAGAGCGCACGCCTGATA – 3'
 - *BacR* (reverse): 5' – CATCCACCGTGCGCCCTTTCTAAC – 3'
 - pBAD24 plazmidspecifikus primerek:**
 - Ampicillin promoter primer (forward):
5' – TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT – 3'
 - Ampicillin reverse primer (reverse):
5' – ATAATACCGCGCCACATAGC – 3'
- Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*)
- fluoreszcens SYTO9 PCR festék (*Bioxol, Budapest, Magyarország*)
- 10× TaqNovaHS Reaction Buffer, PCR-grade water, 50 mM MgCl₂, TaqNova thermostable DNA polymerase 500 U (*Blirt, Gdańsk, Lengyelország*)
- dNTP Mix 40 mM – 10 mM each (*VWR International, Darmstadt, Németország*)

A kutatás során felhasznált, kereskedelmi forgalomban kapható készletek:

- *Mag-Bind Ultra Pure Plasmid DNA Kit* pDNS-izoláláshoz (*M1258-00, Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA*)
- *GenElute Plasmid Miniprep Kit* pDNS-izoláláshoz (*PLN70-1KT, Sigma Aldrich, Louis, MO, USA*)
- *E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit* gDNS-izoláláshoz (*D3350-01, Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA*)
- *Quick DNA MagBead Plus Kit* gDNS-izoláláshoz (*D4081, Zymo Research, Irvine, CA, USA*)

- *Mag-Bind Total RNA 96 Kit* RNS-izoláláshoz (M6731-00S, Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA)
- *TranscriptMe RNA Kit* RT-PCR-hez (RT31-020, Blirt, Gdańsk, Lengyelország)

A doktori kutatás során használt laboratóriumi eszközök:

- fűthető vízfürdő, Mega Star 1.6R nagy teljesítményű centrifuga, analitikai mérleg (*VWR International, Radnor, PA, USA*)
- Multi Bio 3D Mini-Shaker kevertető/billegtető készülék, V-1plus Vortex, Labaqua Bio ultratiszta vízszűrő berendezés (*Biosan, Riga, Lettország*)
- Multi-Therm Cool-Heat-Shake thermoblock (*Benchmark, Sayreville, NJ, USA*)
- UVITEC Cambridge géldokumentációs készülék (*UVITEC, Cambridge, Egyesült Királyság*)
- Biometra TAdvanced PCR készülék (*Analytik Jena, Jena, Németország*)
- táramérleg (*OHAUS Europe, Nänikon, Svájc*)
- fűthető mágneses keverő (*VELP Scientifica, Usmate, Olaszország*)
- NanoDrop™ One Microvolume UV–Vis spektrofotométer, Orion Star A211 pH mérő (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)
- rázó fűthető/hűthető inkubátor (*N-Biotek, Bucheon, Dél-Korea*)
- Azure Cielo™ Real-Time PCR (*Azure Biosystems, Dublin, CA, USA*)
- PowerPac Basic elektroforézis rendszer (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*)
- Safemate EZ 1.2 steril fülke (*BioAir, Siziano, Olaszország*)
- Mini Tube rotátor (*Boekel Scientific, Feasterville-Treose, PA, USA*)
- Brand Transferpipette® S pipettaszett (*Brand, Wertheim, Németország*)
- MagnaRack™ mágneses Eppendorf tartó (*invitrogen, Waltham, MA, USA*)
- hűthető-fűthető inkubátor (*POL-EKO, Wodzisław Śląski, Lengyelország*)
- horizontális gőzsterilizátor (*Biobase, Shandong, Kína*)
- mikrohullámú sütő
- AF 80 jégkészítő berendezés (*Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA*)

Felhasznált szoftverek és platformok:

- SnapGene (*GSL Biotech, Chicago, IL, USA*)
- Google Colab (*Google, Mountain View, CA, USA*)
- Biorender (*BioRender, Torontó, Kanada*)

M1. táblázat. Az MNP-protokoll kombinációval izolált pDNS minták, illetve a kereskedelmi forgalomban kapható, affinitás oszlop-alapú, és MNP-alapú pDNS-izolálások koncentrációi és tisztasági értékei

Izolálás módja	Alkalmazott protokoll/gyártó	DNS konc. ($\mu\text{g/mL}$)	A_{260}/A_{280}
MnFe ₂ O ₄	2. PB	178,2	1,82
		172,4	1,82
		170,3	1,81
MnFe ₂ O ₄ -NH ₂	3. Tris-HCl, NaCl	109,5	1,76
		118,2	1,80
		53,4	1,71
NiFe ₂ O ₄	3. Tris-HCl, NaCl	228,5	1,72
		169	1,69
		189,3	1,71
NiFe ₂ O ₄ -NH ₂	1. Tris-HCl	326,6	1,92
		226,8	1,93
		260,6	1,94
MgFe ₂ O ₄	2. PB	828,1	1,93
		678,9	1,89
		581	1,86
	3. Tris-HCl, NaCl	231,1	1,72
		214,3	1,69
		233,3	1,71
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂	1. Tris-HCl	341	1,81
		327,3	1,84
		437,1	1,93
	2. PB	386,3	1,95
		325,4	1,99
		264,5	1,96
	3. Tris-HCl, NaCl	331,7	1,75
		366,5	1,80
		246,4	1,76
Oszlop-alapú kit	Sigma (mini)	109,2	1,85
		124,1	1,83
		68,2	1,91
	Omega Bio-tek (mini)	37,2	1,91
		38,5	1,94
		60,8	1,84
	Omega Bio-tek (midi)	70,4	1,86
		54,4	1,87
		71	1,86
	Qiagen (midi)	329,7	1,91
		155,1	1,85
		59,1	1,81
MNP-alapú kit	Omega Bio-tek	58,3	1,89
		19,9	1,74
		24,3	1,59
	Zymo Research	51	2,00
		42,3	1,92
		47	1,86

M2. táblázat. A nukleinsav-kinyerésre alkalmazott mágneses nanorészecskék átlagos méreteloszlása és mágneses szaturációja

MNP	Átlagos kristályméret-eloszlás (nm)	Mágneses szaturáció (emu/g)	Hivatkozás
MnFe ₂ O ₄	8 ± 3 és 11,2 ± 2,6	73 és 72	[6,124]
MnFe ₂ O ₄ -NH ₂	5 ± 2	38	[6]
MgFe ₂ O ₄	10 ± 2	51	
MgFe ₂ O ₄ -NH ₂	7 ± 2	36	
NiFe ₂ O ₄	12 ± 3	26,7	
NiFe ₂ O ₄ -NH ₂	6 ± 2	39	