

Miskolci Egyetem

Kerpely Antal Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola



Ferrit-alapú mágneses nanorészecskék nukleinsav-izolálásban való alkalmazhatóságának vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Doktorjelölt:

Gerzsenyi Tímea

okleveles biotechnológus

Témavezető:

Dr. Szóri-Dorogházi Emma, PhD

A Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Mertinger Valéria, MTA doktora

Miskolc, 2026

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
2.	Célkitűzések	5
3.	Anyagok és módszertan.....	6
4.	Tézisek.....	8
5.	Összefoglaló	14
6.	Summary.....	16
7.	Saját publikációk listája.....	18
	7.1. Értekezés alapjául szolgáló közlemények	18
	7.2. További, referált folyóiratokban megjelenő közlemények	18
	7.3. További, nem referált folyóiratokban megjelenő közlemények	18
8.	Hivatkozások	19
9.	Szakirodalmi jegyzék	20

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 a sejtípustól és az anyagcsere-állapottól függ, miközben a teljes sejttömeghez képest csak kis arányt képvisel [1]. A sejt környezetet főként fehérjék, lipidek és egyéb makromolekulák alkotják, ezért a nukleinsavak tiszta kinyerése összetett feladat: meg kell őrizni a kis mennyiségű nukleinsavakat, miközben el kell távolítani a szennyező komponenseket. A kinyert nukleinsavak minősége és mennyisége közvetlenül befolyásolja a további analitikai eljárások megbízhatóságát, ezért a tiszta és koncentrált előkészítés kulcsfontosságú a molekuláris biológiai munkafolyamatokban.

A nukleinsav-izolálási módszerek fejlődése során számos klasszikus és korszerű technika vált elérhetővé. A hagyományos fenol–kloroform extrakció során a sejtízist követően szerves oldószeres fázisátválasztással választják el a nukleinsavakat a fehérjéktől, majd alkoholos kicsapással nagy hozammal nyerhetők ki, miközben a hosszú molekulák szerkezeti integritása is megmarad [2,3]. Ugyanakkor ez az eljárás jelentős egészségügyi és környezetvédelmi kockázatokkal jár, mivel a fenol toxikus és maró hatású, a kloroform pedig karcinogén. További hátránya, hogy nehezen automatizálható, ami korlátozza alkalmazását nagy áteresztőképességű technikákban [4,5].

A nukleinsav-tisztításban jelentős előrelépést hoztak az 1990-es évektől elterjedt szilika-alapú oszlopos extrakciós módszerek. A sejtfeltárást követően a nukleinsavak a kialakított kémiai környezet hatására a szilika membránhoz kötődnek, miközben a szennyezők eltávolíthatók, majd mosási és eluálási lépésekkel nagy tisztaságú DNS vagy RNS nyerhető vissza. A módszer gyors és egyszerű, ugyanakkor a kereskedelmi kitek költségesek lehetnek, kis méretű nukleinsavak esetén hozamveszteség fordulhat elő, és nagy mintaszám feldolgozásához speciális eszközök szükségesek [6,7].

A legkorszerűbb nukleinsav-izolálási módszerek közé tartoznak a mágneses részecskéken alapuló technikák, amelyek nukleinsav-megkötésre alkalmas bevonattal ellátott, paramágneses (többnyire vas-oxid alapú) nanorészecskéket használnak [8]. Megfelelő pufferoldatok jelenlétében a DNS és RNS a részecskék felszínéhez kötődik, majd külső mágneses térrel gyorsan elválasztható a folyadékfázistól. A centrifugálás elhagyása, a rövid feldolgozási idő és az egyszerű automatizálhatóság miatt ezek a módszerek széles körben elterjedtek, például a SARS-CoV-2 RNS nagyléptékű diagnosztikai vizsgálataiban is [9–11].

A mágneses nanorészecskék izolálási teljesítményét alapvetően a részecskék fizikai-kémiai tulajdonságai határozzák meg. A nukleinsavak megkötése jelentősen fokozható például a felület funkcionálásával, amelynek során a kötés erősségét és szelektivitását a jelenlévő funkciós 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 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 funkcionáltságú 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 bemutatott eredmények hozzájárulnak a mágneses nanorészecskéken alapuló nukleinsav-izolálási technikák mélyebb megértéséhez és továbbfejlesztéséhez.

2. 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 (mágneses nanorészecske) esetén összehasonlítani a funkciócsoporttal 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 rDNS-kinyerésére alkalmas protokoll kidolgozására, valamint a kinyert nukleinsavak molekuláris biológiai felhasználhatóságának kísérletes igazolását.

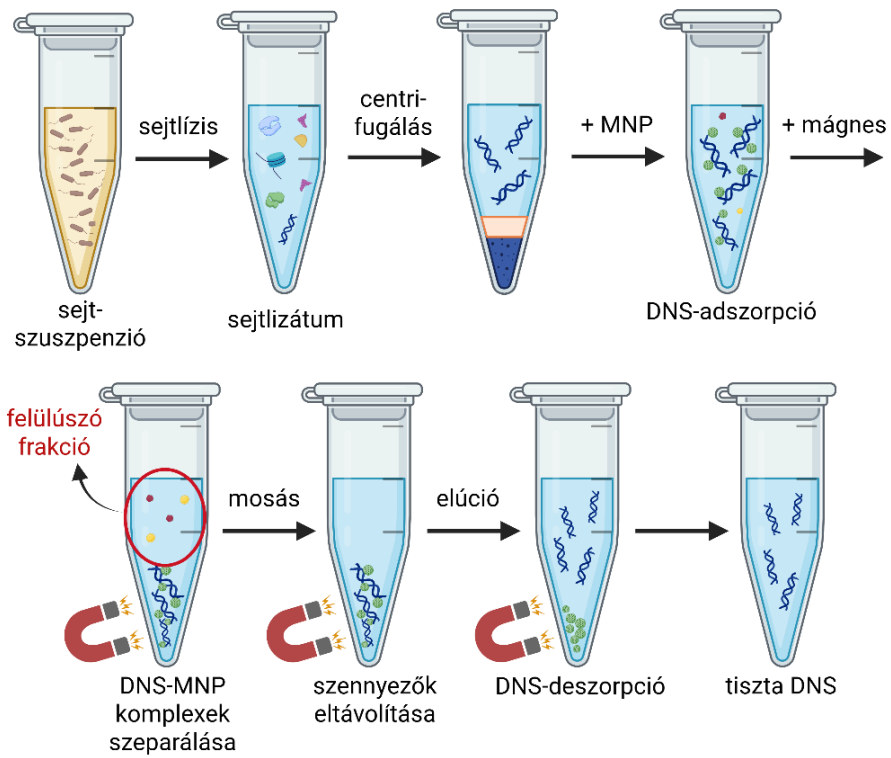
3. Anyagok és módszertan

A bakteriális sejt kultúrák tenyésztéséhez standard LB-alapú 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 proteináz, RNáz és DNáz enzimeket alkalmaztam.

A kísérleteim során alkalmazott módszerek célja a kinyert nukleinsavak mennyiségi, minőségi és funkcionális jellemzése volt. A nukleinsav-izolálási eljárások hatékonyságát több, egymást kiegészítő analitikai módszerrel értékeltem. Ezek közé tartozott az agaróz gélelektroforézis (*Bio-Rad PowerPac Basic elektroforézis rendszer*), UV-Vis spektrofotometria (*NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotométer*), valamint PCR- és qPCR-alapú eljárások (*Azure Cielo™ Real-Time PCR*, *Biometra TAdvanced PCR*). 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 még többek között centrifugák (*Mega Star 1.6R*), inkubátorok (*Multi-Therm Cool-Heat-Shake thermoblock*, *N-Biotek rázó fűthető/hűthető inkubátor*) és egy géldokumentációs rendszer (*UVITEC Cambridge géldokumentációs készülék*). Az adatok feldolgozásához és az ábrák készítéséhez általánosan használt bioinformatikai és grafikai szoftvereket alkalmaztam (*GSL Biotech SnapGene*, *Google Colab*, *BioRender*).



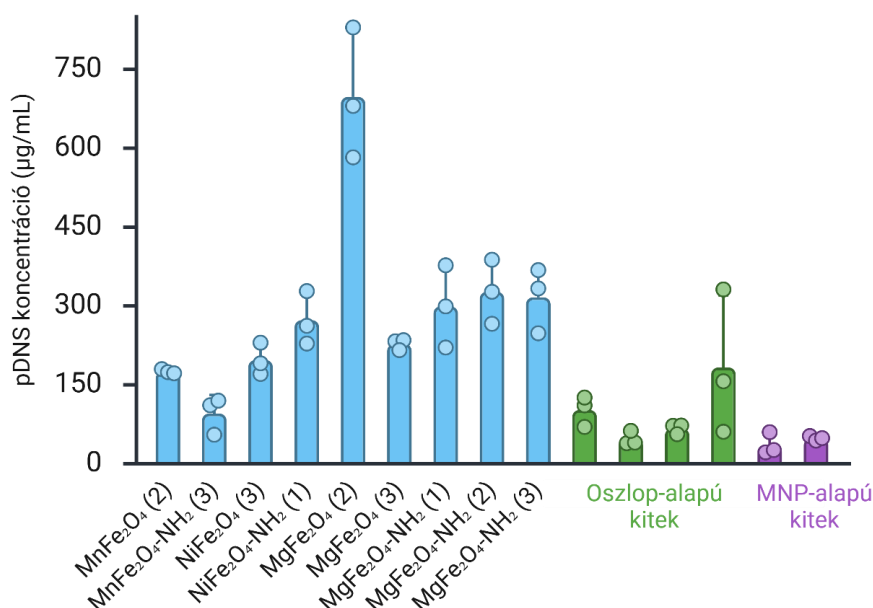
1. ábra. A kutatás során kifejlesztett pDNS-izoláló protokoll sémája, amely mindegyik vizsgált nanorészecskére, és mindegyik optimalizált protokollra általánosan érvényes

4. 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.

Alátámasztás: Három, az adszorpciós és deszorpciós környezet kémiai összetételében eltérő pDNS-izoláló protokollt alkalmaztam hat különböző mágneses nanorészecskére (összesen $3 \times 6 = 18$ protokoll-MNP kombináció). A felállított kritériumok (DNS koncentráció, DNS tisztaság, agaróz gélelektroforézis kép, restriktív endonukleázokkal történő emésztés, qPCR) alapján mindegyik vizsgált MNP esetében legalább egy protokoll alkalmasnak bizonyult hatékony pDNS extrakcióra, ami igazolja a reverzibilis megkötés megvalósíthatóságát.

A mágneses nanorészecskékkel izolált DNS minták koncentrációját UV-Vis spektrofotométeriával határoztam meg, az eredményeket a 2. ábra szemlélteti. A diagram két oszlopai az előzetesen meghatározott kritériumoknak megfelelő nanorészecske-protokoll kombinációk relatív extrakciós hatékonyságát mutatják. A legmagasabb DNS-hozamot a MgFe_2O_4 részecske adta a 2. (PB) protokoll alkalmazásával, míg a legalacsonyabb hatékonyságot a $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ részecske mutatta a 3. (Tris-HCl, NaCl) protokoll esetében. Ugyanakkor még ez utóbbi esetben is $93,7 \pm 35,2 \mu\text{g/mL}$ pDNS-t sikerült izolálni, ami 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 [12].



2. 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 2. ábra továbbá összehasonlítja az általam fejlesztett MNP-protokoll kombinációk pDNS-izoláló hatékonyságát kereskedelmi forgalomban kapható extrakciós készletek teljesítményével. Négy esetben affinitás oszlop-alapú (zöld oszlopok), míg két esetben mágneses nanorészecske-alapú (lila oszlopok) izolálás valósult meg. Az eredmények alapján látható, hogy a legtöbb kereskedelmi kit nem éri el az általam fejlesztett MNP-alapú eljárások pDNS-kinyerési hatékonyságát.

2. tézis: Megállapítottam, hogy a MnFe₂O₄, MnFe₂O₄-NH₂, NiFe₂O₄, NiFe₂O₄-NH₂, MgFe₂O₄ és MgFe₂O₄-NH₂ mágneses nanorészecskékkel kifejlesztett bakteriális pDNS-extrakciós protokollokkal izolált plazmidminták enzimatikus és amplifikációs molekuláris biológiai eljárásokban felhasználhatók.

3. tézis: Bebizonyítottam, hogy a hat vizsgált mágneses nanorészecske (MnFe₂O₄, MnFe₂O₄-NH₂, NiFe₂O₄, NiFe₂O₄-NH₂, MgFe₂O₄ és MgFe₂O₄-NH₂) 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.

Alátámasztás a 2-3. tézisekhez: Minden MNP esetben legalább egy olyan protokollt ki lehetett választani (1. táblázat, zöld kiemelés), amellyel hatékonyan, nagy mennyiségű és jó minőségű pDNS-kinyerése valósítható meg *Escherichia coli*-ból, és amely a további molekuláris biológiai folyamatokban is felhasználható. Az alkalmas protokoll-MNP kombinációkkal történő

extrakciókban a pDNS koncentráció a meghatározott 10 µg/mL küszöbértéket minden esetben meghaladta (1. kritérium), a DNS tisztasága a szakirodalomban meghatározott értéktartományba ($A_{260}/A_{280} = 1,6 - 2,0$) esett (2. kritérium), az agaróz gélelektroforézis vizuális igazolást adott a kinyert molekulák megfelelőségéről (3. kritérium), továbbá a restrikciós emésztés sikeresen végbement (4. kritérium), valamint a qPCR esetében a minták ciklusszám értékei a felső határérték (35 ciklusszám) alatt megfelelőnek minősültek (5. kritérium).

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

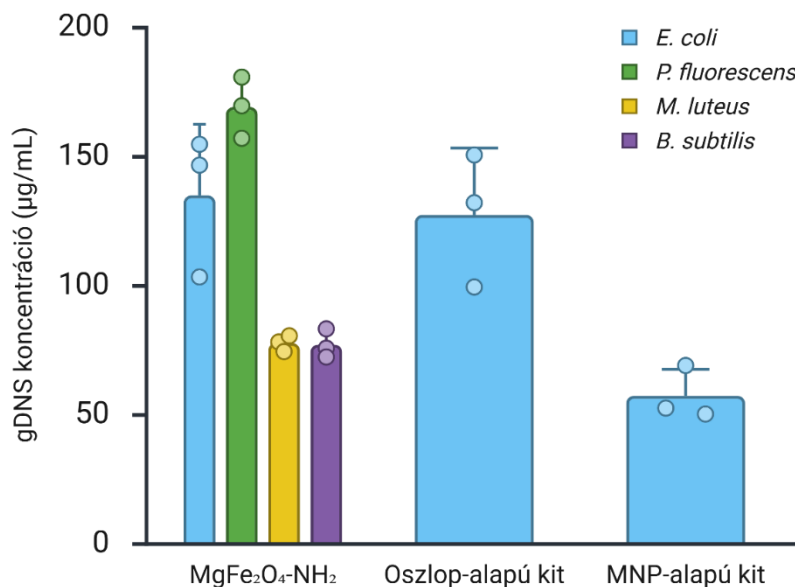
DNS-izolálás MNP-vel	Protokoll száma	Mennyiség			Integritás		A hatékonyság összegzése	
		Konc.	Tisztaság	AGE	REáz reakció	qPCR		
MnFe ₂ O ₄	1	✓	X	✓	✓	✓	4/5	11/15
	2	✓	✓	✓	✓	✓	5/5	
	3	X	X	✓	X	✓	2/5	
MnFe ₂ O ₄ -NH ₂	1	✓	✓	✓	X	✓	4/5	9/15
	2	X	X	X	X	X	0/5	
	3	✓	✓	✓	✓	✓	5/5	
NiFe ₂ O ₄	1	✓	✓	✓	X	✓	4/5	9/15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

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. A MgFe₂O₄-NH₂ részecske széles körű felhasználhatóságát igazolja az is, hogy komplex közegből (vérszérummal összekevert baktériumtenyészet) is alkalmasnak bizonyult hatékony DNS-kinyerésre.

4. tézis: Igazoltam a MgFe₂O₄-NH₂ nanorészecskék alkalmazhatóságát bakteriális sejtekből történő genomi DNS-izolálásra, és kidolgoztam egy szilárd fázisú izolálási

protokollt, amely qPCR-alapú downstream felhasználásra alkalmas nukleinsavat eredményez.

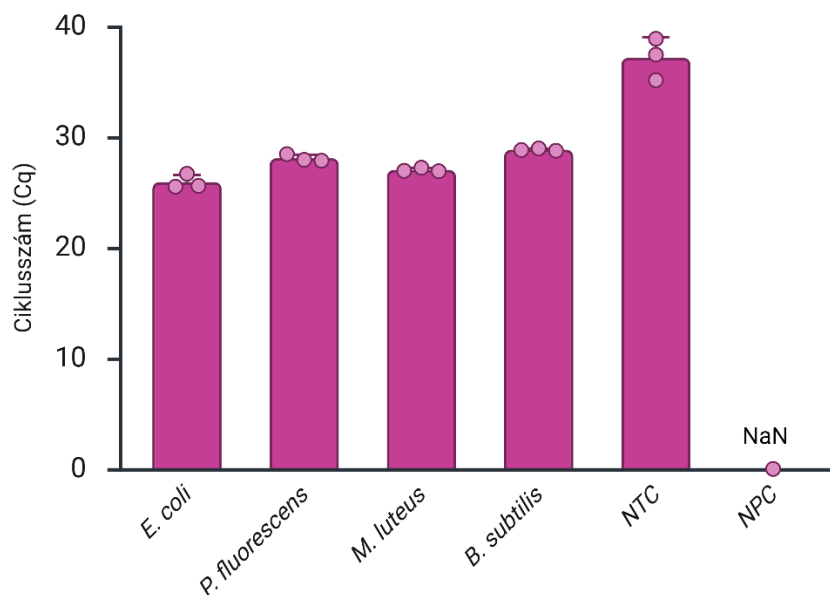
Alátámasztás: A gDNS-izolálás forrása két Gram-negatív (*E. coli*, *P. fluorescens*) és két Gram-pozitív (*M. luteus*, *B. subtilis*) baktériumfaj volt. Az amino-funkcionalizált magnézium-ferrit nanorészecskékkel kinyert gDNS koncentrációk a 3. ábrán láthatók.



3. 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 3. ábra két utolsó oszlopa jelöli a kereskedelmi forgalomból származó izoláló készletekkel kinyert DNS koncentrációját. Érdemi összehasonlítás szempontjából az MNP-alapú izoláló kit áll közelebb a saját fejlesztésű protokollhoz tartozó eredményekhez. Az összehasonlító ábrán 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.

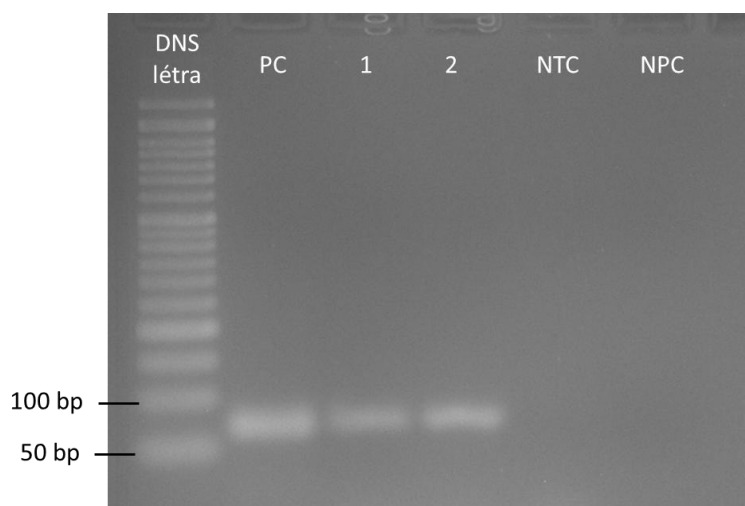
A kinyert genomi DNS minták qPCR-analízis során megfelelő amplifikációt mutattak, ami bizonyítja a módszer alkalmasságát downstream molekuláris biológiai alkalmazásokra (4. ábra).



4. ábra. A $MgFe_2O_4-NH_2$ MNP-vel izolált, különböző baktériumfajokból származó gDNS minták qPCR vizsgálatának Cq értékei. NTC = templát nélküli kontroll, NPC = primer nélküli kontroll, NaN = nem értékelhető adat

5. tézis: A $MgFe_2O_4-NH_2$ nanorészecskék alkalmazásával kidolgoztam egy szilárd fázisú RNS-izoláló protokollt bakteriális sejtekből, amellyel a kinyert RNS RT-PCR alapú molekuláris biológiai analízisekben felhasználható.

Alátámasztás: A kutatás során kidolgozott, bakteriális RNS-izoláló protokoll elvégzését követően RT-PCR-rel validáltam a kinyert RNS funkcionalitását. Az RT-PCR folyamat első lépéseként reverz transzkripciót végeztem, melynek 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 (5. ábra).



5. 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 (NTC = templát nélküli negatív kontroll, NPC = primerek nélküli negatív kontroll)

Az 5. 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 az izolált RNS megfelelő minőségű volt a reverz transzkripcióhoz és az azt követő PCR-amplifikációhoz. Bár az izolált RNS koncentrációja elmarad a kereskedelmi forgalomban kapható készlettel elérhető kihozattalól, az izolátum RT-PCR reakcióban sikeresen szolgált templátként, ami igazolja annak funkcionális felhasználhatóságát.

5. 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 hétköznapokban 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 esetében 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, restrikciós 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-ferritról 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 modullal 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.

6. 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.

7. Saját publikációk listája

7.1. 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)

7.2. 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 B. 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)

7.3. 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)

8. Hivatkozások

Összes hivatkozás száma: 34

Független hivatkozások száma: 23

h-index: 3

9. 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] Gerzsenyi TB, Ilosvai ÁM, Kristály F, Daróczi L, Owen MC, Viskolcz B, Vanyorek L, Szóri-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] 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.