

# Molekuláris biológiai módszerek fejlesztése a K 5831 vakcinatörzs és vad *Mycoplasma gallisepticum* törzsek elkülönítésére

**XXVIII. DERZSY NAPOK**  
**2022. 06. 08-09.**



**Készítette: dr. Bánáti László**

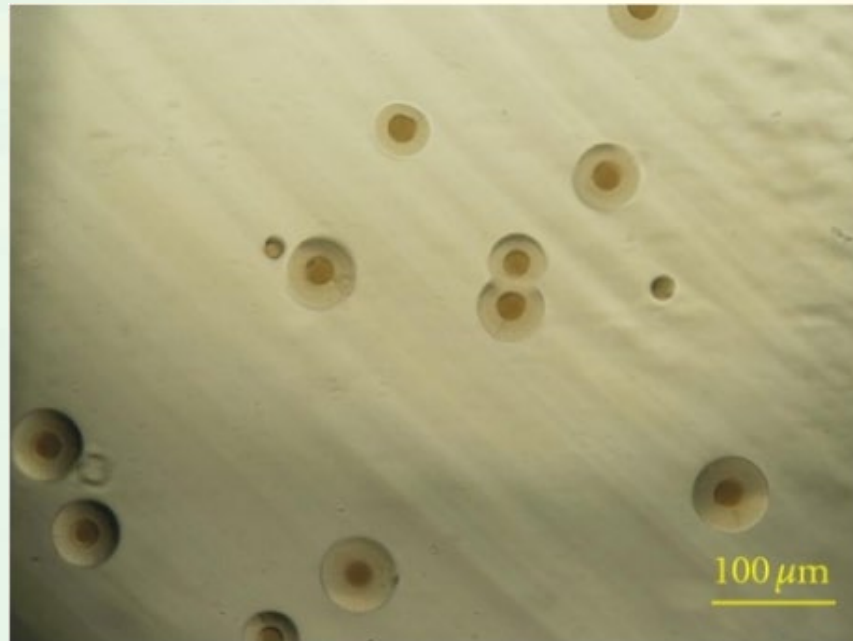
**Témavezetők: dr. Bekő Katinka  
dr. Gyurancez Miklós**

**AGRÁRTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT  
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI INTÉZET**

# Bevezetés

## *Mycoplasma gallisepticum*

- Sejtfallal nem rendelkeznek
- 0,2-0,8  $\mu\text{m}$
- Világszerte elterjedt
- Vertikális, horizontális terjedés
- Gazdafajok: főként tyúk, pulyka





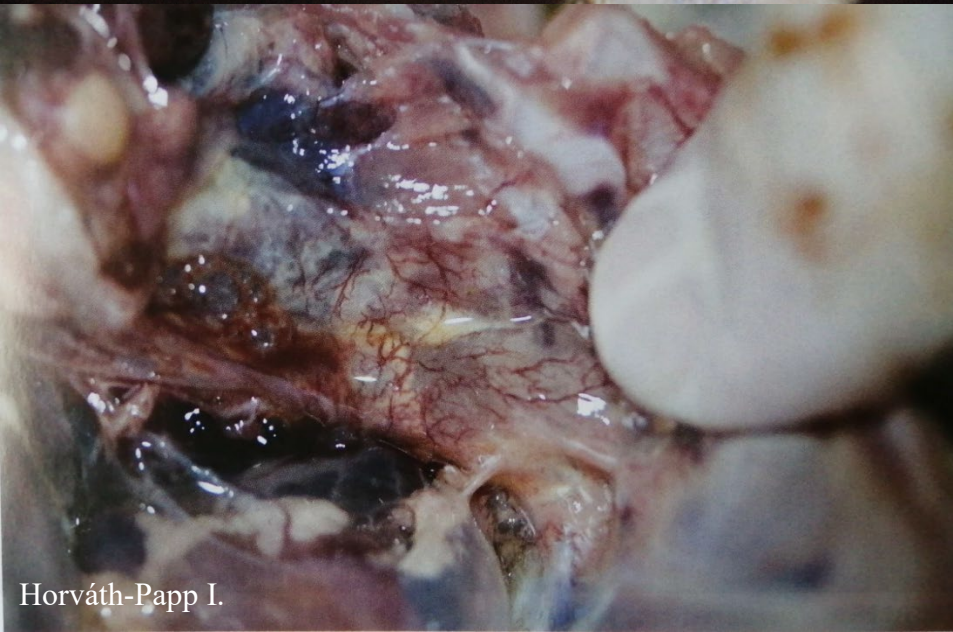
# Tünetek, kórbonctan



Gyuranecz Miklós



Morrow C



Horváth-Papp I.



Cornell University



Cornell University

# Védekezés, a kutatás célja

- Fontos a gazdasági kár csökkentése
  - Állományok mentesítése
  - Antibiotikus kezelés: szűk skála
  - Vakcinázás
    - Attenuált vakcinák: F, ts-11, 6/85, legújabb: K törzs
- Célunk: a K törzs elkülönítésére szolgáló MAMA rendszer tervezése

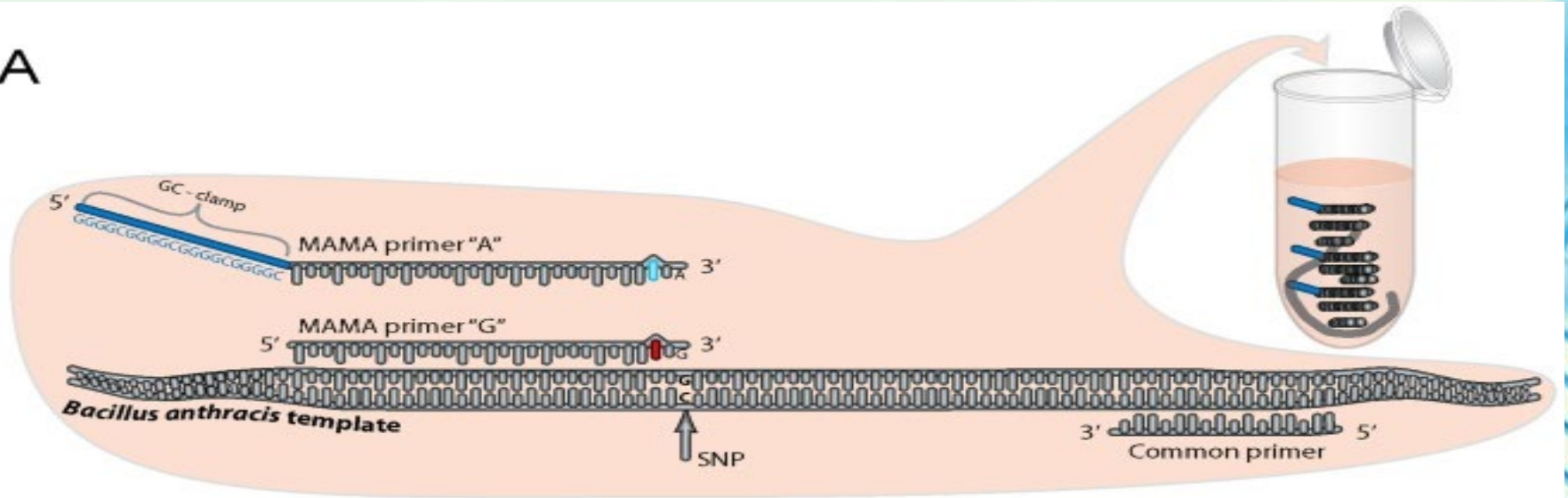


# Anyag és módszer

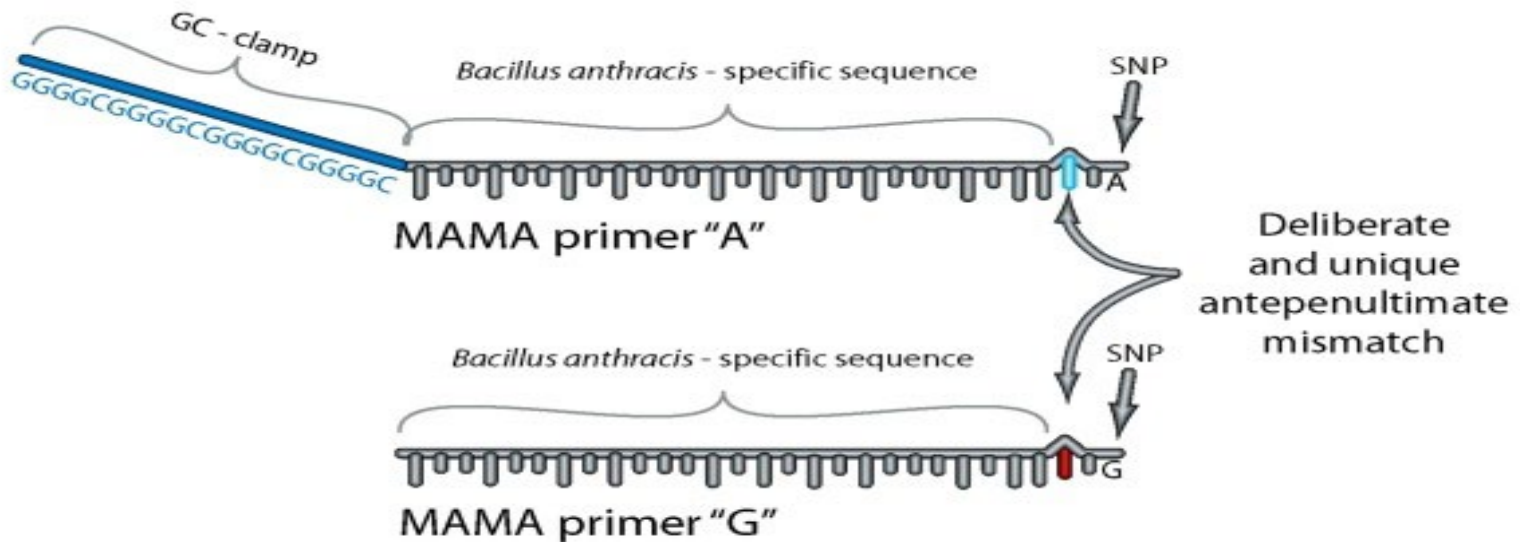
- Összesen 274 minta a világ különböző országaiból, több madárfajból
- DNS kivonása, K törzs teljes genom szekvenálása
- A kapott read-ek referencia genommal való összevetése → „K” specifikus pontmutációk keresése
- →MAMA (mismatch amplification mutation assay) rendszer tervezése

# MAMA vizsgálat

A



B



# A tervezett MAMA rendszerek

Esszé	Gén	Pontmutáció génen belüli pozíciója (bp)	Nukleotid szubsztitúció	Aminosav-csere
MAMA-K-aptA-1469/1	aptA	1469	A-G	K-R
MAMA-K-aptA-1469/2	aptA	1469	A-G	K-R
MAMA-K-dnaA-227	dnaA	227	T-C	L-S
MAMA-K-dnaA-350	dnaA	350	T-C	L-S
MAMA-K-dnaA-452/1	dnaA	452	C-T	T-I
MAMA-K-dnaA-452/2	dnaA	452	C-T	T-I
MAMA-K-dppD-73	dppD	73	G-A	D-N
MAMA-K-fruA-88/1	fruA	88	G-A	D-N
MAMA-K-fruA-88/2	fruA	88	G-A	D-N
MAMA-K-pgi-958	Pgi	958	G-A	V-M

# Specificitás és szenzitivitás

- Fajspecifitás: *M. anatis*, *M. anseris*, *M. sp. 1220* (“*M. anserisalpingitis*”), *M. cloacale*, *M. columbinasale*, *M. columbinum*, *M. columborale*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum*, *M. gallopavonis*, *M. iners*, *M. imitans*, *M. iowae*, *M. meleagridis* és *M. synoviae*
- Szenzitivitás: az a legkisebb kópiaszám, ahol még detektálható termék született



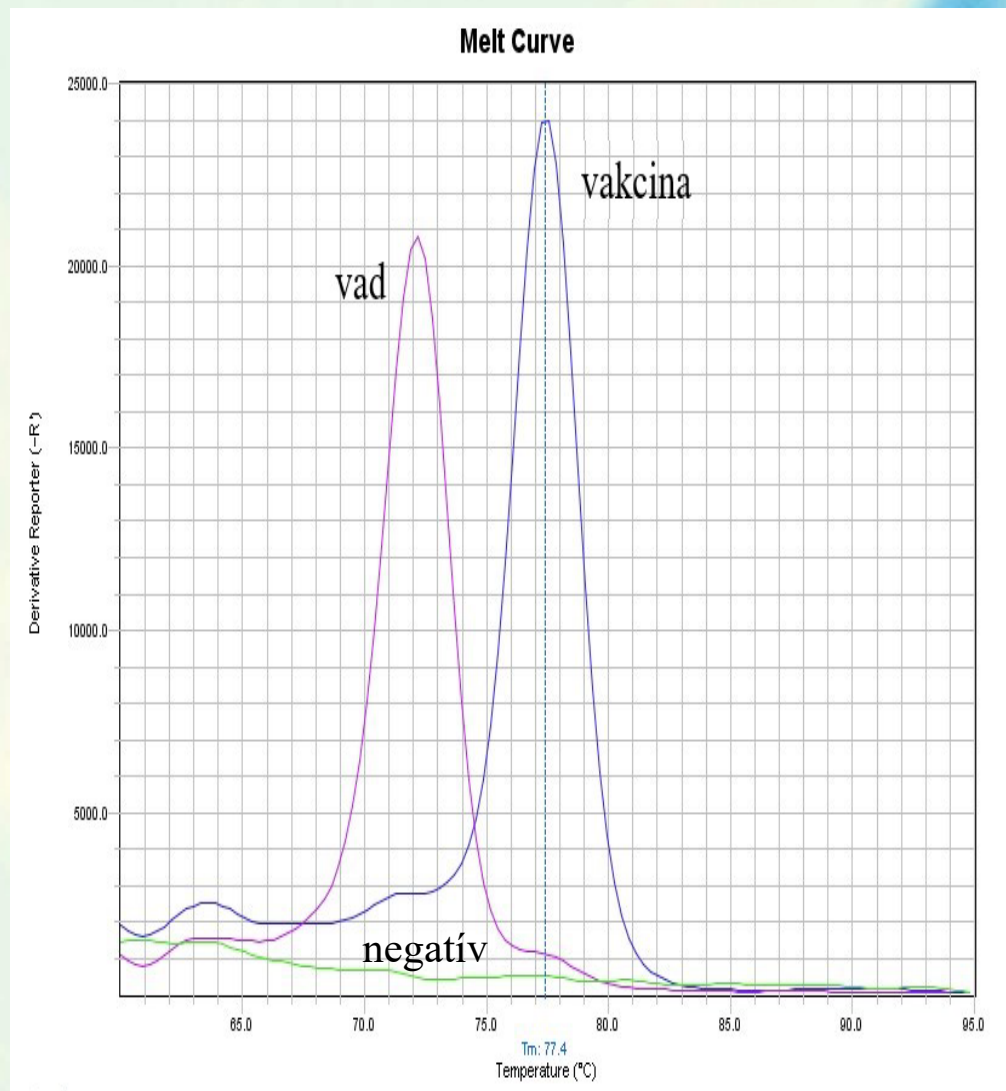
# A megfelelő MAMA rendszer kiválasztása

- Kritériumok:
  - K törzs specifikus pontmutáció
  - Termékméret, olvadáspont alapján való elkülönítés
  - Negatív kontrol ne amplifikálódjon

Primer neve	Primer szekvencia (5'→3')
fruA-88-K5831	ggggcggggcggggCGTGTAGCTAGTTCTTTTAAGATATCCTT
fruA-88-wt	CGTGTAGCTAGTTCTTTTAAGATATCATC
fruA-88-con	AAGCCCGAGTTTGTCTTTATTAATC

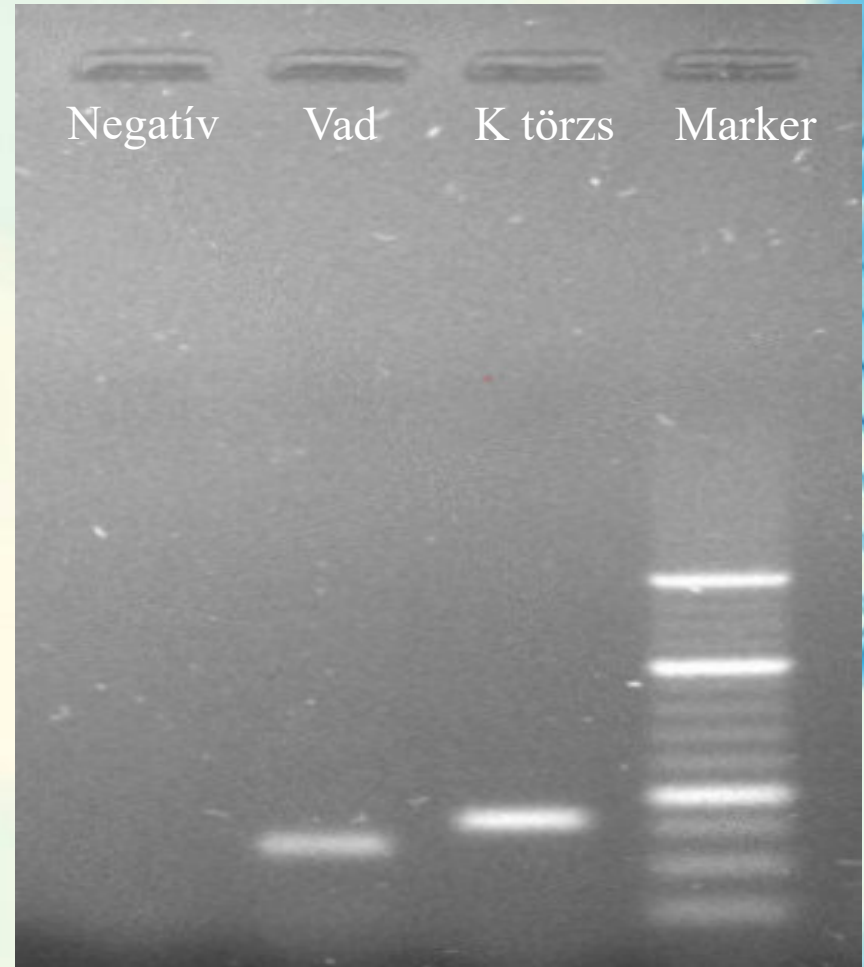
# A melt-MAMA teszt eredménye

- K törzs olvadáspont-  
görbéjének a csúcsa:  
77,12 °C - 77,42 °C
- Vad törzsek esetén:  
71,46 °C - 72,21 °C
- Legkisebb különbség:  
4,91 °C
- Érzékenység:  
10<sup>2</sup> kópiaszám/μl



# Az agaróz-MAMA teszt eredménye

- K törzs: 85 bázispár
- Vad törzs: 71 bázispár
- Érzékenység:  
 $10^3$  kópiaszám/ $\mu\text{l}$

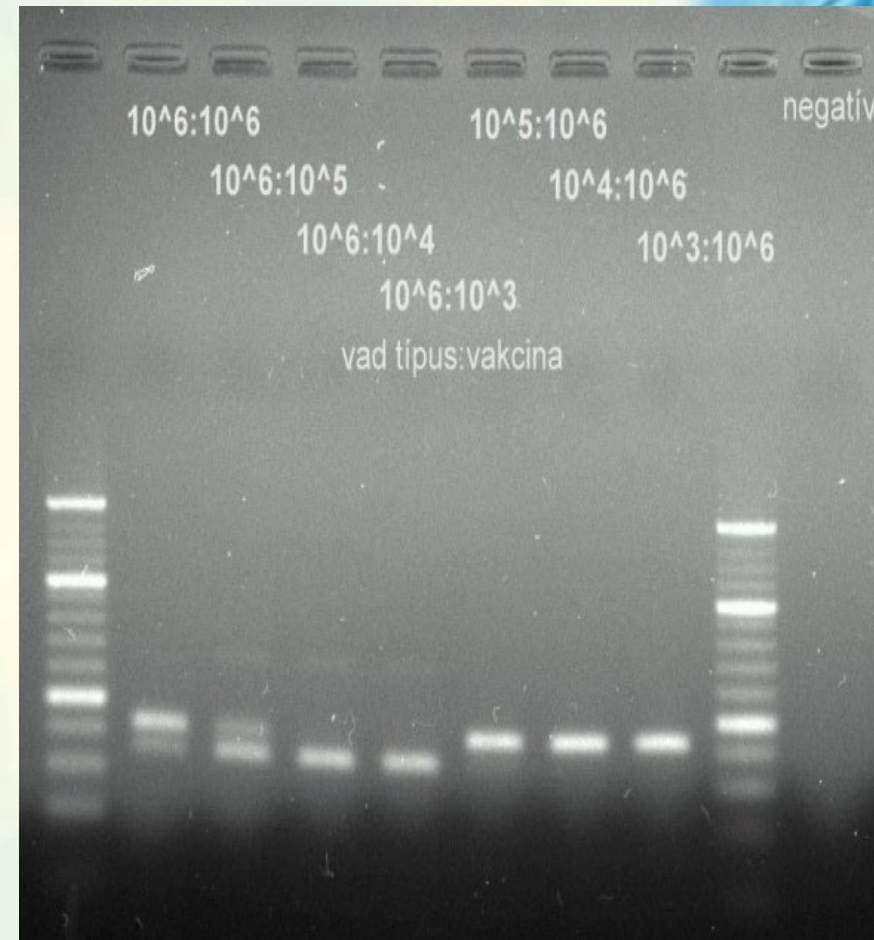
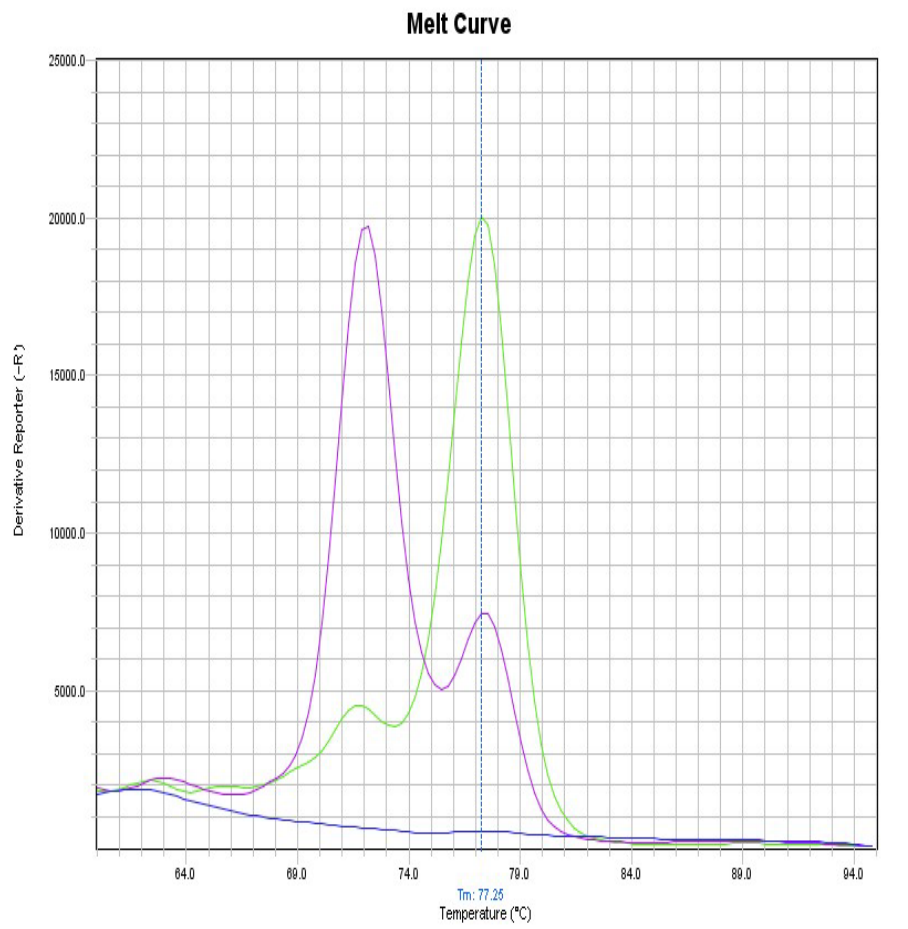




# Kevert minták vizsgálata

melt-MAMA

agaróz-MAMA



# Összefoglalás



# Köszönetnyilvánítás

- dr. Bekő Katinka
- dr. Gyuranecz Miklós
- Kovács Áron Botond
- A laboratórium összes munkatársa
- dr. Magyar Tibor

A vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázata (LP2012-22), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K\_16 (119594) és KKP19 (129751) pályázatai, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az Innovációs és Technológiai Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíja (ÚNKP-19-4) támogatták





Köszönöm szépen a figyelmet!!

