

# Modyfikacje polimeraz DNA jako rozwiązania problemów w reakcjach PCR

## 1. Wstęp

Polimeraza DNA to enzym, który odgrywa zasadniczą rolę w procesie replikacji i naprawy DNA, od 30 lat z powodzeniem wykorzystywana jest też w reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), gdzie katalizuje proces syntezy DNA *in vitro*, odpowiadając za dołączanie kolejnych nukleotydów do końca 3'-OH nici DNA. Reakcja PCR to bardzo szybka, specyficzna i czuła metoda amplifikacji, która znalazła swoje stosowanie w licznych technikach molekularnych wykorzystywanych w laboratoriach badawczych jak i klinicznych [1]. Termostabilne polimerazy DNA wykazują szerokie zastosowanie w biologii molekularnej, inżynierii genetycznej czy diagnostyce molekularnej. Ich przydatność w tych dziedzinach nauki jest zależna przed wszystkim od cech jakimi się dany enzym charakteryzuje: wierność, która jest ściśle związana z częstością popełnianych błędów podczas syntezy nici DNA, aktywność 5'→3'/3'→5' egzonukleazy, procesywnością, czy zdolnością dobudowywania dodatkowych nukleotydów na końcu 3' [2]. W zależności od napotkanego problemu podczas amplifikacji DNA stosuje się odpowiednią polimerazę.

## 2. Problemy w PCR

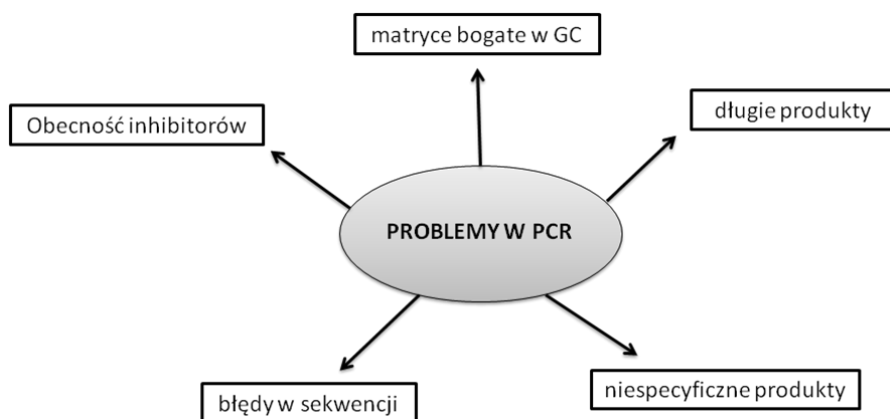
W ostatnim czasie jednym z poważniejszych problemów w diagnostyce molekularnej jest amplifikacja DNA z próbek środowiskowych i klinicznych. Takie próbki posiadają liczne inhibitory, które prowadzą do całkowitego zahamowania reakcji lub znacznego zmniejszenia jej wydajności. Liczne problemy napotyka się również podczas amplifikacji długich matryc, fragmentów bogatych w trudnotopliwe pary GC lub tworzące struktury drugorzędowe. Komercyjnie dostępne, natywne polimerazy DNA nie zawsze są w stanie poradzić sobie z tymi problemami, dlatego ciągle prowadzi się badania w kierunku poszukiwania nowych lub modyfikacji już istniejących polimeraz w celu ulepszenia ich użytecznych cech. Poniższy rys. 1 przedstawia podstawowe utrudnienia z jakimi można spotkać się podczas amplifikacji DNA.

---

<sup>1</sup> spibida.marta@gmail.com, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydziału Chemiczny, Politechnika Gdańska, www.pg.edu.pl

<sup>2</sup> beakrawc@pg.gda.pl, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydziału Chemiczny, Politechnika Gdańska, www.pg.edu.pl

<sup>3</sup> molszewski@pg.gda.pl, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydziału Chemiczny, Politechnika Gdańska, www.pg.edu.pl



Rysunek 1. Schemat przedstawiający problemy, które można napotkać podczas przeprowadzania reakcji PCR [opracowanie własne]

## 2.1. Inhibitory

W zależności od pochodzenia próbki inhibitory mogą pochodzić bezpośrednio z badanego materiału (np. DNA wyizolowane z krwi) lub być pozostałością po procesie izolacji lub oczyszczania DNA. Inhibitory PCR to zarówno organiczne jak i nieorganiczne składniki, które hamują reakcje poprzez oddziaływanie z matrycą RNA/DNA lub blokowanie polimerazy DNA bezpośrednio – poprzez jej degradację lub blokowanie centrum aktywnego, lub pośrednio – poprzez hamowanie kofaktora niezbędnego do pracy polimerazy [3, 4].

## 2.2. Trudne matryce

Innym problemem jest amplifikacja długich produktów oraz genów bogatych w pary GC. Obecność wysokotopliwych par GC prowadzi do licznych problemów podczas syntezy nici. Za trudne matryce przyjmuje się geny o zawartości par GC powyżej 80% lub dłuższe niż 10 kbp [5].

## 2.3. Nieśpetyczne produkty

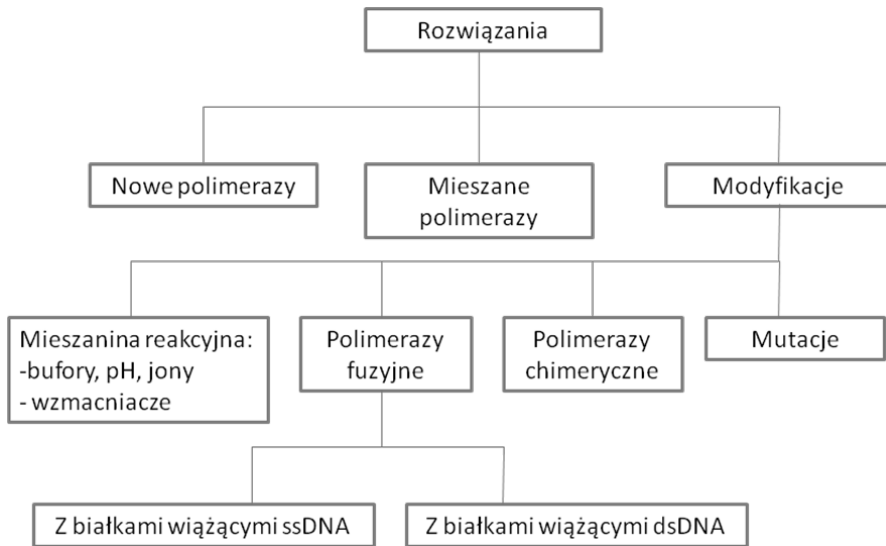
Podczas przeprowadzania reakcji PCR można napotkać kolejny problem jakim jest obecność nieśpetycznych produktów amplifikacji. Niektóre polimerazy wykazują niską aktywność w temperaturze pokojowej, a nawet w 4°C. Podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej startery mogą przyłączać się nieśpetycznie i być wydłużane przez polimerazę co prowadzi do powstawania serii nieśpetycznych produktów. By uniknąć tego problemu stosuje się tzw. polimerazy Hot Start. Znane są trzy podstawowe metody zapewniania warunków Hot-Start. Pierwsza z nich -manualna polega na dodaniu jonów  $Mg^{2+}$ , gdy mieszanina reakcyjna osiągnie temperaturę powyżej 70°C. W metodzie fizycznej stosowane są bariery oddzielające część

składników od siebie i ulegające stopieniu w temperaturze powyżej 75°C. Innym sposobem jest zastosowanie termolabilnych przeciwciał lub chemicznych grup blokujących polimerazę, które w wysokich temperaturach ulegają odłączeniu i enzym odzyskuje swoją aktywność [6].

## 2.4. Błędy w sekwencji

Błędy w powstałym po amplifikacji produkcie związane są przede wszystkim z niską wiernością polimerazy. Systemy naprawcze polimeraz zależą od obecności domeny 3'-5'egzonukleazy, która zwiększa wierność replikacji DNA i zmniejsza częstość pojawiających się błędnie sparowanych zasad. Problem ten jest najistotniejszy podczas przygotowywania produktu do klonowania [2].

Wymienione powyżej czynniki mogą prowadzić do uzyskania fałszywie negatywnych wyników, niewłaściwej oceny jakościowej badanej próbki, a przede wszystkim znacznego zmniejszenia wrażliwości reakcji. W związku z tym, że natywne polimerazy nie zawsze są w stanie podołać tym problemom uzasadnione wydaje się ciągle udoskonalanie znanych polimeraz lub poszukiwanie nowych. Możliwości rozwiązania powyższych problemów przedstawia poniższy rys. 2.



Rysunek 2. Rozwiązania problemów reakcjach w PCR w kontekście użytej polimerazy [opracowanie własne]

## 3. Natywne polimerazy DNA – ich możliwości i ograniczenia

W obecnie stosowanych technikach amplifikacji wykorzystuje się dwa podstawowe typy termostabilnych polimeraz DNA: typ A oraz B. Typ A to polimerazy pochodzenia bakteryjnego, przede wszystkim polimerazy wyizolowane z *Thermus* i *Thermotoga*; typ B to enzymy pochodzące z *Thermococcus* i *Pyrococcus*.

Jedne z najpowszechniej stosowanych polimeraz typu A w biologii molekularnej to polimerazy *Taq* pochodząca z *Thermus aquaticus* i *Tfl* z *Thermus flavus* oraz polimeraza *Tth* z *Thermus thermophilus*. Inne to m.in.: wyizolowane z bakterii *Thermotoga* polimerazy *Tma* pochodząca z *T. maritima* oraz *Tne* z *T. neapolitana*.

Typ B to przede wszystkim polimeraza KOD pochodząca z *Thermococcus kodakaraensis*, *Tli* z *Thermococcus litoralis*, *Pfu* z *Pyrococcus furiosus*, *Pwo* z *Pyrococcus woesei*, czy *Tfu* z *Thermococcus fumicolans*. Wiele z tych polimeraz jest obecnie komercyjnie dostępnych jako rekombinantowe białka produkowane w *E. coli*.

Polimerazy DNA w zależności od obecności w swojej budowie odpowiednich domen mogą charakteryzować się odmiennymi aktywnościami. Podstawowe domeny jakie występują u tych enzymów to domena polimeryzacyjna oraz 3'-5' i 5'-3' egzonukleolityczna.

Obecność domeny 3'-5' egzonukleazy sprawia, że oprócz udziału w syntezie DNA polimeraza odcina niewłaściwie wbudowane mononukleotydy z końca 5'-OH nowo zsyntetyzowanej nici DNA. Aktywność nukleazowa zwiększa wierność replikacji DNA, zmniejszając częstość błędnie sparowanych zasad. Warto jednak pamiętać, iż aktywność 3'-5' egzonukleazy powoduje zmniejszenie prędkości syntezy DNA, czego efektem może być obniżenie końcowej wydajności reakcji. Ze względu na to, polimerazy DNA o aktywności korektorskiej oraz cechujące się dużą dokładnością, nie są odpowiednie do amplifikacji długich fragmentów DNA. Obecność domeny 5'-3' egzonukleazy umożliwia przecinanie ostatniego wiązania końca 5', wiązanie oddalonego o kilka zasad od końca 5' oraz wycinanie dimerów pirydynowych [2].

Znane są polimerazy, u których delecja domeny egzonukleolitycznej prowadzi do uzyskania funkcjonalnego białka o częściowo zmienionych cechach w stosunku do enzymu natywnego.

Wśród takich polimeraz najpopularniejsza jest polimeraz *Taq* wyizolowana z termofilnej bakterii *T. aquaticus*, której odkrycie całkowicie odmieniło oblicze biologii molekularnej. Pozbawiona aktywności 5'-3' egzonukleazy polimeraza (skrócona o 289 aminokwasów) *Taq* $\Delta$ 289 charakteryzuje się zwiększoną termostabilnością, jednakże wiąże się też ze zwiększonym zapotrzebowaniem na jony  $Mg^{2+}$ , a nowopowstała nić DNA może zawierać wysoką liczbę błędów. Ten wariant polimerazy *Taq* wykorzystuje się z powodzeniem w reakcjach sekwencjonowania czy w procesach powielania DNA *in vitro*. Natywna polimeraza *Taq* stosowana jest w przypadkach, gdzie wierność amplifikacji jest ważniejsza od wysokiej efektywności. Polimeraza *Taq* $\Delta$ 289 odznacza się mniejszą procesywnością w stosunku do natywnej polimerazy *Taq*, ale dzięki swojej mniejszej masie jest dużo łatwiejsza w modyfikacji i otrzymywaniu [7].

Co więcej wyróżnić można polimerazy DNA, które podczas reakcji PCR syntetyzują produkty z tępymi końcami (*Pfu*) oraz takie, które dodają kilka dodatkowych nukleotydów na końcu nici (*Taq*). Różnorodność polimeraz pod względem wykazywanych właściwości pozwala na dowolne użycie ich w zależności od obranego celu.

#### 4. Modyfikacje polimeraz prowadzące do ulepszenia ich użytecznych cech

Aby sprostać wymaganiom jakie stawia nam nowoczesna diagnostyka, biologia molekularna czy inżynieria genetyczna konieczne jest udoskonalanie polimeraz DNA. Dotychczas wprowadzane modyfikacje to przede wszystkim stosowanie udoskonalonych buforów, wzmacniaczy reakcji PCR lub przeprowadzanie mutacji w polimerazach DNA. Mutacje prowadzą do uzyskania enzymów o zwiększonej termostabilności i opornych na inhibitory z próbek klinicznych czy środowiskowych. Coraz bardziej popularne staje się również modyfikowanie już znanych polimeraz poprzez tworzenie fuzji tych enzymów z innymi białkami, które mogą wpływać na zwiększenie ich procesywności czy wierności.

##### 4.1. Wzmacniacze, dodatki do PCR, ulepszone bufory

Alternatywą dla ulepszonych, opornych na inhibitory polimeraz może być stosowanie dodatków, wzmacniaczy bądź ulepszonych buforów w mieszaninie reakcyjnej PCR. Składniki dodawane do mieszanin mogą wpływać na reakcję PCR poprzez zwiększenie jej czułości, efektywności, specyficzności reakcji, a także zmniejszyć inhibicję w próbkach klinicznych czy środowiskowych. Jednoznaczne określenie mechanizmu działania wzmacniaczy nie jest łatwe. Zakłada się, że jest to suma efektów, które zachodzą w poszczególnych cyklach reakcji, na które składa się wpływ na denaturację matrycy, hybrydyzację starterów czy aktywność stosowanej polimerazy. Najpowszechniej stosowane dodatki i wzmacniacze reakcji PCR przedstawione zostały w tab. 1.

Tabela 1. Najbardziej znane dodatki/wzmacniacze stosowane w reakcjach

Wzmacniacze PCR	Funkcja
DMSO – (dimetylosulfotlenek) (2-10%)	zmniejsza oddziaływania międzycząsteczkowe, podczas hybrydyzacji rozplecionych nici DNA struktura II-rzędowa jest uformowana luźniej i dostęp polimerazy do struktur normalnie ciasno upakowanych i niedostępnych (zwłaszcza w przypadku rejonów bogatych w GC lub ściśle związanych z inhibitorem) jest zdecydowanie ułatwiony
Betaina (0,5-2 M)	związek organiczny o charakterze jonu obojnaczego, rola podobna do DMSO, hamuje formowanie się struktur II-rzędowych starterów, stabilizuje powstawanie kompleksu DNA-polimeraza
DTT – (ditiotreitrol) (5-40 mM)	antyoksydant, korzystnie wpływa na stabilność stosowanych w reakcji PCR polimeraz
Albumina (100 ng/50 µl)	posiada zdolność blokowania białek obecnych w mieszaninie, które nie są związane z polimerazą, wykorzystywana w reakcjach PCR próbek klinicznych, środowiskowych, lizatach, przydatna w przypadku trudnotopliwych matryc, dzięki zdolności utrzymywania nici DNA w formie denaturowanej

Formamid (max 2,5%)	środek denaturujący DNA, stosowany w niskich stężeniach, hamuje powstawanie struktur drugorzędowych
Detergenty niejonowe (0,1-1%)	przykłady: Triton, NP40 czy Tween, stabilizują polimerazę oraz matrycę DNA, zmniejszają podatność na inhibicję odczynnikami organicznymi obecnymi w próbce
Glikol etylenowy (0,5-2 M)	działanie zbliżone do betainy, badania wskazują na zdecydowanie wyższą skuteczność
Białka SSB (wiążące jednoniciowe DNA)	wpływają korzystnie na redukcję tworzonych dimerów starterów, zwiększają efektywności i wydajności amplifikacji

Źródło: [8÷19]

## 4.2. Mutacje

W celu nadania enzymom nowych cech, niespotykanych w natywnych odpowiednikach, ich geny poddaje się mutacjom punktowym w obrębie sekwencji genu kodującego dane białko. Naukowcy wykorzystują takie możliwości zmiany w genomie i celowo wprowadzają mutacje w procesie spontanicznej lub ukierunkowanej mutagenyzy.

Mutagenyza przypadkowa polega na ekspozycji danego mikroorganizmu na działanie fizycznych lub chemicznych mutagenów tj.: promieniowanie UV, różnego rodzaju promieniowanie jonizujące, związki alkilujące itp. Przypadkowe mutacje wprowadzać można również z wykorzystaniem technik PCR. Wśród takich metod wyróżnić można trzy najpopularniejsze. Pierwsza z nich, tasowanie DNA (ang. *DNA shuffling*), polega na zastosowaniu enzymu DNAzy I do pocięcia nici DNA kodującej dane białko, które ma zostać poddane modyfikacji na przypadkowe fragmenty o długości od 50 do 100 pz i następnie przeprowadzeniu reakcji PCR bez użycia starterów. Uzyskane w wyniku cięcia fragmenty DNA łączą się na zasadzie komplementarności zasad, a polimeraza DNA uzupełnia braki pomiędzy nimi. W wyniku tak przeprowadzonej reakcji powstają mutacje. Po kilku cyklach amplifikacji uzyskiwany jest gen zmodyfikowany, który poddaje się ponownie reakcji PCR, tym razem ze starterami definiującymi zakończenie genu danego białka oraz umożliwiającymi wklonowanie go do wektora ekspresyjnego [20]. Inną techniką uzyskania mutacji przypadkowej jest wykorzystanie szczepów mutacyjnych (ang. *Mutator strains*). Metoda ta polega na sklonowaniu genu, który ma zostać poddany mutagenyzie do plazmidu. Następnie przeprowadza się transformację do zmodyfikowanego szczepu *E. coli*, który został pozbawiony jednego lub kilku szlaków naprawy podstawowej DNA (mutS, mutD lub mutT). Brak systemu naprawy DNA skutkuje wprowadzaniem zmian podczas replikacji w materiale genetycznym wprowadzonym do szczepu, w wyniku czego gen docelowy ulega przypadkowym mutacjom. Wadą tej metody jest to, że zmodyfikowany szczep *E. coli* szybko traci żywotność, ponieważ geny kodujące podstawowe funkcje życiowe również ulegają mutacjom, pozbawione są jednego ze szlaków naprawy, co prowadzi do wprowadzania przypadkowych zmian podczas replikacji genu. Wykorzystać można również technikę

PCR podatną na błędy (ang. *error prone PCR*) polegającą na zastosowaniu polimerazy DNA o zredukowanej wierności replikacji i umieszczeniu jej w buforze reakcyjnym, którego skład jest modulowany w taki sposób by reakcja zachodziła niespecyficznie. Enzym w wyniku małej specyficzności katalizy wprowadza mutacje do nowej nici DNA. Kontrolowanie składu mieszaniny reakcyjnej pozwala na regulowanie częstości błędów wprowadzanych do nowo syntetyzowanej nici DNA. Częstość wprowadzanych przez polimerazę DNA mutacji wynosi około 1-3 zmiany na 1 kpz [21].

Mutacje ukierunkowane wykorzystują przede wszystkim reakcje PCR, dzięki czemu zmiany w sekwencji mogą być wprowadzane w sposób kontrolowany. W takich technikach stosuje się zmodyfikowane startery, zarówno zewnętrzne jak i wewnętrzne, które posiadają niekomplementarne do matrycy nukleotydy, wprowadzając w ten sposób pożądaną mutację [22, 23].

Techniki mutagenazy ukierunkowanej jak i przypadkowej wykorzystywane były w tworzeniu polimeraz o ulepszonych cechach użytecznych w diagnostyce molekularnej i inżynierii genetycznej. Najczęściej modyfikacjom takim poddawana była polimeraza *Taq*. Mutacje prowadzące do zmian w wierności replikacji DNA przez polimerazę obejmują wysoce konserwatywny region O-helix. Jest to obszar składający się z dwunastu reszt aminokwasowych od 659 do 671 reszty aminokwasowej, który stanowi jednocześnie część szczeliny wiążącej enzym z DNA i nukleotydami dobudowywanymi do nowej nici. Badania dowodzą, że zmiany w czterech z dwunastu reszt aminokwasowych: Arg-659, Lys-663, Phe-667 i Tyr-671 prowadzą do znacznego pogorszenia wierności replikacji przez polimerazę *Taq*, przy czym zmiana 667 Phe na Tyr powoduje częstsze włączanie dideoksyrybonukleotydów do nowo syntetyzowanej nici DNA, co jest pożądane w technikach sekwencjonowania metodą Sangera [24, 25]. Uzyskanie enzymów o obniżonej wierności replikacji znajduje swoje zastosowanie także w technikach mutagenazy metodą „error prone PCR”, gdzie takie polimerazy są pożądane.

Mutacje wprowadzone w resztach aminokwasowych E742 i A743 w subdomenie palców okazują się być bardzo istotne w powinowactwie polimerazy do matrycy DNA. Badania sugerują, że jest to miejsce krytyczne dla zdolności elongacyjnych enzymu. Badane warianty mutacji za każdym razem prowadziły do zwiększenia powinowactwa do DNA i szybszego wydłużania starterów w porównaniu ze szczepem dzikim. Mutacje w tym obrębie stanowią, więc potencjał do otrzymywania polimeraz o polepszonej procesywności, wydajności i szybkości reakcji [26].

W związku z coraz większą potrzebą przeprowadzania reakcji PCR, gdzie w mieszaninie reakcyjnej pojawia się wiele związków będących inhibitorami polimeraz rozwinęły się badania nad poszukiwaniem nowych (zmienionych) białek, które nie będą wrażliwe na ich obecność. Pierwsze pozytywne rezultaty, które zakończyły się wdrożeniem nowego produktu dotyczyły modyfikacji polimerazy *Taq*. Przetestowano wiele mutantów i wśród nich wyselekcjonowano te o najwyższym potencjale aplikacyjnym. Charakteryzowały się one znacznie zwiększoną opornością na inhibitory zawarte w krwi względem białek dzikich i umożliwiały wydajne



otrzymywanie amplikonów przy 20% stężeniu krwi w mieszaninie reakcyjnej. Mutacji dokonywano w rejonie palców cynkowych w pozycji 708 i 707. Mutacje w pozycji 708 gwarantowały oporność na obecność krwi w próbce. Kwas glutaminowy występujący w tej pozycji w natywnej polimerazie zamieniany był na walinę, lizynę, leucynę oraz tryptofan [27].

Zmiany w obrębie reszt aminokwasowych 706, 707, 708 mogą doprowadzić do powstania polimerazy „Hot-start”. Wymiana tryptofanu w pozycji 706 na argininę, izoleucyny 707 na leucynę oraz kwasu glutaminowego 708 na asparaginowy prowadzą do spadku aktywności białka w niskich temperaturach, co podwyższa specyficzność reakcji PCR [27].

### 4.3. Chimeryczne polimerazy

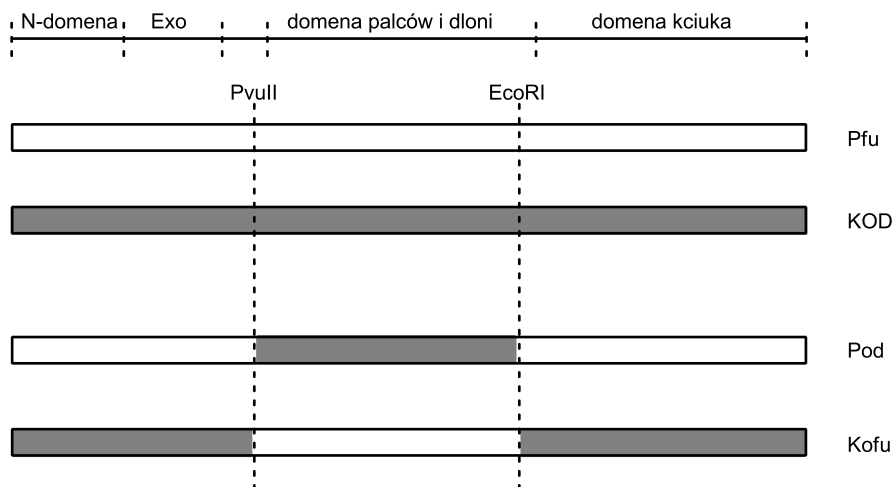
Chimeryczne polimerazy DNA to białka, których sekwencja aminokwasowa złożona jest z subsekwencji pochodzących z co najmniej dwóch odrębnych białek. Kowalencyjne połączenie tych podsekwencji na drodze zastosowania technik inżynierii genetycznej prowadzi do ekspresji funkcjonalnego białka [28]. Przykładem takiej modyfikacji jest chimeryczna bakteryjna polimeraza DNA, która powstała w wyniku połączenia subsekwencji aminokwasowych pochodzących z DNA i polimeraz *Tth* z *T. thermophilus* i *Taq* z *T. aquaticus*. Uwzględniając unikalne cechy polimerazy *Tth* i polimerazy *Taq*, postanowiono wyodrębnić z nich części o najbardziej pożądanym właściwościach i połączyć w taki sposób, by uzyskać funkcjonalne, chimeryczne białko. Sekwencja aminokwasowa chimerycznej termostabilnej polimerazy *Tth-Taq* składa się z części N-końcowej polimerazy *Tth* (4 – 600 reszty aminokwasowej) i C-końcowej pochodzącej z polimerazy *Taq* (556 – 834 reszty aminokwasowej) [28]. Polimeraza *Tth-Taq* charakteryzuje się pożądanymi cechami zarówno polimerazy *Tth* jak i polimerazy *Taq*; wykazuje wysoką skuteczność powielania długich sekwencji DNA. Wydajność chimerycznego enzymu jest co najmniej 5 razy większa niż w przypadku polimerazy *Taq* i porównywalna z polimerazą *Tth*. Podobnie wzrasta czułość na obecność niedopasowania nukleotydu startera na końcu 3'. Chimeryczny enzym jest co najmniej 6 razy bardziej wrażliwy na obecność niedopasowania na 3'-końcu startera niż polimeraza *Tth* i porównywalnie wrażliwy z polimerazą *Taq*. Specyficzność reakcji amplifikacji jest znacznie większa niż przy użyciu polimerazy *Tth* oraz porównywalna z polimerazą *Taq* [28].

Innym przykładem chimerycznych polimeraz DNA są enzymy *Kofu* i *Pod*. Zostały one otrzymane poprzez wymianę domen między polimerazami DNA KOD (*T. kodakarensis*) i *Pfu* (*P. furiosus*). W przypadku polimerazy *Kofu* domeny: N-końcowa, egzonukleazy, kciuka i C-końcowa pochodzą z polimerazy KOD, natomiast domeny śródreżca i palców z polimerazy *Pfu* (rys. 3.) Takie modyfikacje powodują, że polimeraza *Kofu* charakteryzuje się podobną do polimerazy KOD prędkością wydłużania starterów (106-138 nt/s), procesywnością (~300nt/s) i termostabilnością, natomiast wierność replikacji jest podobna do polimerazy *Pfu* ( $2,0 \times 10^{-6}$ ). Polimeraza





*Pod* jest analogicznym połączeniem polimeraz *Pfu* i KOD, przy czym charakteryzuje się prędkością wydłużania starterów (25 nt/s), procesywnością (>20 nt) i termostabilnością podobną do polimerazy *Pfu*, natomiast wierność replikacji jest podobna do polimerazy KOD ( $4,45 \times 10^{-6}$ ) [29].



Rysunek 3. Schematyczny rozkład domen w chimerycznych polimerazach *Pod* oraz *Kofu* opracowanie własne na podstawie [29]

Kolejnym przykładem chimerycznej polimerazy DNA jest enzym, który powstał w wyniku wymiany domen pomiędzy polimerazami *Taq* i *Tma*. Białko to posiada także cztery mutacje, które wpływają na jego funkcje. Region N-końcowy tego enzymu zbudowany jest z reszt aminokwasowych od 1 do 190 pochodzących z polimerazy *Taq*. W obrębie tego regionu mieści się domena 5'-3' egzonukleazy, której aktywność jest obniżona 1000-krotnie przez mutację G46D. Region C-końcowy złożony jest z reszt aminokwasowych od 191 do 893 pochodzących z polimerazy *Tma*. W regionie tym znajduje się między innymi domena egzonukleazy 3'-5', która jest unieczynniona poprzez wprowadzenie mutacji punktowych D323A i E325A. Oprócz wszystkich wymienionych wyżej modyfikacji polimeraza DNA posiada też mutację F730Y, która powoduje, że enzym ten chętniej włącza dideoksynukleotydy do nowo syntetyzowanej nici DNA. Enzym taki jest bardzo dobrym narzędziem w technikach sekwencjonowania DNA metodą Sangera [30]. Taka chimeryczna polimeraza DNA charakteryzuje się zwiększoną powtarzalnością wysokości pików sekwencjonowania DNA, w szczególności, gdy stosuje się znakowane barwnikiem ddNTPs w reakcji sekwencjonowania cyklicznego. Obniża szybkość pirofosforolizy znakowanych barwnikami ddNTPs oraz poprawia wprowadzanie dITP [31].



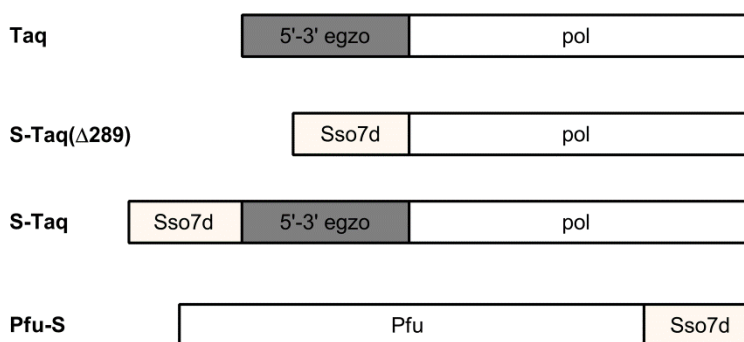
## 4.4. Fuzyjne polimerazy DNA

Jednym z ważniejszych etapów w działaniu polimeraz, odpowiedzialnym za ich końcową wydajność jest proces inicjacji związany z przyłączeniem do matrycowego DNA. Dlatego też uzasadnione jest modyfikowanie znanych polimeraz w celu ułatwienia im przyłączania nici DNA poddawanej polimeryzacji. Przykładem takiej modyfikacji może być tworzenie fuzyjnych polimeraz DNA z białkami, które posiadają naturalną zdolność wiązania jedno- lub/i dwuniciowego DNA. W literaturze spotkać można zaledwie kilka przykładów takich fuzyjnych polimeraz DNA [2].

### 4.4.1. Fuzja z białkiem wiążącym dwuniciowe DNA

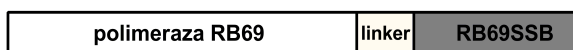
Jedyną opisaną w literaturze fuzją polimerazy DNA *Taq* jest fuzja z białkiem *Sso7d* [32]. Jest to białko pochodzące z hipertermofilnego archeonu *Sulfolobus solfataricus* mające zdolność wiązania dwuniciowego DNA. Posiada niewielką masę, około 7 kDa, w roztworze występuje jako monomer. Jego funkcja w rodzimym mikroorganizmie polega na stabilizacji genomowego DNA i ułatwieniu w ten sposób działania polimerazy DNA [33]. Wang wraz z współpracownikami [32] przeprowadził fuzję tego białka z polimerazą *Taq*, *TaqStoffel* oraz polimerazą *Pfu* i porównał procesywność zmodyfikowanych polimeraz do polimerazy natywnej. W przypadku fuzji z polimerazami *Taq* oraz *TaqStoffel* białko *Sso7d* umieszczone zostało na N-końcu polimerazy i połączone bezpośrednio z enzymem. W polimerazie *Pfu* sprawdzone zostało natomiast połączenie enzymu z białkiem na C-końcu za pomocą trójaminokwasowego linkera: Gly – Thr – His. Badane warianty przedstawione są na rys. 4. Wstępne badania wskazały, że natywna polimeraza *Taq* charakteryzuje się większą procesywnością niż polimeraza z delecją domeny 5'-3' egzonukleolitycznej. Wstawienie białka *Sso7d* w miejsce domeny „egzo” doprowadziło do wzrostu procesywności w stosunku do polimerazy bez fuzji. Jednak polimeraza *Taq* natywna z dodatkowym białkiem fuzyjnym nadal przewyższa procesywnością fuzyjną polimerazę z delecją. W przypadku polimerazy *Pfu* również zachowana jest tendencja polepszenia procesywności białka fuzyjnego w porównaniu z natywnym. Ogólny wzrost procesywności we wszystkich przeprowadzonych fuzjach wyniósł od 5 do 17 razy w odniesieniu do odpowiednich polimeraz natywnych. Co więcej, polimeraza *Pfu* pochodząca z archeonu jest przedstawicielem zupełnie innej rodziny niż bakteryjna polimeraza *Taq*. Fakt, że w przypadku obu fuzji obserwujemy wzrost procesywności może wskazywać na uniwersalność stosowanej modyfikacji bez względu na typ użytej polimerazy [32]. Potwierdzeniem tego faktu mogą być późniejsze badania prowadzące do otrzymania fuzji polimerazy DNA *Tpa* pochodzącej z bakterii *Thermococcus pacificus* z tym samym białkiem *Sso7d*, gdzie również zauważony jest znaczny wzrost procesywności i wydajności polimerazy bez negatywnego wpływu na działanie katalityczne czy zmianę stabilności enzymu [34]. Z białkiem *Sso7d* połączona została również polimeraza KOD. Fuzja polimerazy z białkiem wiążącym dwuniciowe DNA prowadzi do zwiększenia wydajności i procesywności polimerazy w stosunku do natywnej polimerazy KOD bez znacznego wpływu na termostabilność otrzymanej polimerazy [35].



Rysunek 4. Schemat położenia domen w polimerazach DNA oraz ich fuzjach z białkiem *Sso7d* [32]

#### 4.4.2. Fuzja z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA

W literaturze odnaleźć można również przykład fuzji polimerazy DNA z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA. Polepszenie cech enzymu przedstawione jest na przykładzie polimerazy DNA bakteriofaga RB69 w połączeniu z jego rodzimym białkiem SSB. RB69SSB to niewielkie, monomeryczne białko, które odgrywa istotną rolę w prawidłowym działaniu polimeraz DNA tego bakteriofaga. W badanej fuzji białko zostało umieszczone na C-końcu polimerazy za pośrednictwem sześćioaminokwasowego linkera: Gly – Thr – Gly – Ser – Gly – Thr (Rys. 5) [36].



Rysunek 5. Schematyczna budowa fuzyjnej polimerazy RB69 z jej rodzimym białkiem RB69SSB [opracowanie własne]

Obecność linkera, w przeciwieństwie do sztywnego, bezpośredniego łączenia, zapewnia białku fuzyjnemu pewną elastyczność i stosunkowo swobodne ułożenie się względem polimerazy. Pomaga to uniknąć ewentualnej zawady sterycznej, co może być znaczące w procesie przyłączania DNA i jego polimeryzacji. W wyniku przeprowadzonej fuzji, otrzymana polimeraza okazała się wykazywać znacznie polepszone cechy wykorzystywane w diagnostyce czy biologii molekularnej. Nowa polimeraza wykazywała 6-krotne zwiększenie powinowactwa do matrycowego DNA oraz 7-krotne polepszenie procesywności przy zachowaniu dotychczasowej wierności. Co więcej zwiększyła się jej zdolność do amplifikacji dłuższych fragmentów DNA [36].

W europejskim patencie z 2013 rok [37], zawarty został opis polimerazy DNA pochodzącej z *Thermococcus zilligi* w fuzji z białkiem SSB *Sulfolobus solfataricus*. Podobnie jak w poprzednich przypadkach jest to niewielkie (18 kDa) białko wiążące jednoniciowe DNA. Wykazuje ono aktywność jako monomer, ma zdolność multimeryzacji w roztworze [38]. Fuzja z tym białkiem została przeprowadzona w nieco odmienny sposób niż opisana powyżej (rys. 6).





Rysunek 6. Schematyczna budowa fuzyjnej polimerazy DNA *Tzi* z białkiem *SsoSSB* [opracowanie własne]

Białko SSB znajduje się na N-końcu polimerazy, a użyty linker różni się częściowo sekwencją aminokwasową: Gly – Ser – Gly – Gly – Val – Asp. Badanie przeprowadzone na zmodyfikowanej polimerazie wskazują na znaczne zwiększenie jej wydajności, wierności oraz procesywności w stosunku do natywnej polimerazy *Tzi* [37].

Badania jakie do tej pory przeprowadzono wskazują, że przyłączenie do polimerazy dodatkowego, niewielkiego białka może w znaczny sposób poprawić jej właściwości użytkowe nie wpływając negatywnie na jej stabilność czy aktywność. Polimerazy fuzyjne mogą znaleźć ogromne zastosowanie, jako narzędzia w diagnostyce, biologii molekularnej czy inżynierii genetycznej.

## 5. Zastosowanie natywnych oraz zmodyfikowanych polimeraz DNA

Polimerazy zarówno u bakterii, archeonów czy eukariontów mają podobną strukturę. Różnią się jednak pod wieloma względami, przede wszystkim wykazywanymi właściwościami: szybkością przeprowadzanej reakcji, procesywnością, obecnością lub brakiem podjednostek białkowych czy właściwościami egzonukleolitycznymi. Często wybór odpowiedniej polimerazy determinowany jest jej specyficznymi cechami pożądanymi w danej technice.

Obecność domeny korektorskiej jest niezwykle ważna podczas syntezy produktów przeznaczonych do klonowania czy detekcji mutacji w danym genie. W takich przypadkach najlepiej sprawdza się polimeraz DNA *Pwo* lub fuzyjna Phusion. Częstość błędów popełnianych podczas amplifikacji przez te polimerazy jest co najmniej 10 razy mniejszy niż w przypadku polimerazy *Taq* [39].

W przypadku amplifikacji długich fragmentów DNA rekomendowana jest polimeraz *Tfu* z *T. fumicolans* (produkty do 10 kbp). Podobnie polimeraza KOD dobrze sprawdza się podczas amplifikacji długich matryc ponieważ wykazuje 10-15 razy większą procesywność oraz lepszą zdolność elongacyjną niż polimeraza *Pfu* [40].

Polimeraza DNA *Pfu* jest natomiast niezwykle termostabilna, wykazuje aktywność nawet w temperaturze 95°C i stosowana jest w przypadku amplifikacji produktów bogatych w pary GC. Podobnie bardzo wydajna w tego typu trudnych matrycach jest polimeraza fuzyjna z białkiem z *Sso7d* – Phusion.

Jednym z nowszych rozwiązań jest stosowanie termostabilnych polimeraz DNA z rodziny Y podczas amplifikacji próbek archeologicznych lub z częściowo zdegradowanym DNA [41]. Polimerazy te pozbawione są aktywności 3'-5' egzonukleazy i posiadają znacznie zwiększoną tolerancję w stosunku do uszkodzonego DNA. Podstawowym przedstawicielem tej rodziny jest polimeraza DNA IV pochodząca z *Sulfolobus solfataricus* oraz polimeraza DNA IV z *E. coli* [42].



Stosunkowo dobrym rozwiązaniem jest również stosowanie mieszanych polimeraz o różnych właściwościach w odpowiednich proporcjach. Przykładem może być mieszanina polimeraz *Taq* i *Tpe* (z *Thermococcus peptonophilus*) w stosunku a 31:1, które idealnie nadają się do amplifikacji długich produktów – do 15 kpz [34] a także mieszanina polimerazy KOD z KOD (exo-), która również dobrze radzi sobie z produktami o wielkości ok. 15 kpz [42]. Badania sugerują, że zastosowanie mieszaniny polimeraz DNA *Taq* i *Pfu* w stosunku 16:1 pozwala na amplifikację produktów DNA do 30 kpz [44].

Istnieją polimerazy, które wykazują dużą przydatność w diagnostyce molekularnej do detekcji mikroorganizmów w próbkach krwi, gleby lub żywności (sery, mięso, mleko) z wykorzystaniem reakcji PCR. Próbki te posiadają duże ilości inhibitorów, często trudnych do zidentyfikowania. Badania wskazują, że polimeraza *Taq* jest hamowana już przy niewielkich stężeniach tych składników, jednak polimerazy DNA tj. *Tfl*, *Tli*, *Tth* czy *Pfu* wykazują wielokrotnie większą odporność na te inhibitory. Podczas gdy amplifikacja z użyciem polimerazy *Taq* jest całkowicie hamowana w obecności już 0.004% (v/v) krwi, polimerazy wymienione powyżej są w stanie syntetyzować nić DNA w obecności powyżej 20% krwi w mieszaninie reakcyjnej [45].

Komercyjne, fuzyjne polimerazy DNA wykazują bardzo szerokie zastosowanie jako narzędzia w diagnostyce, biologii molekularnej czy inżynierii genetycznej. Cechują się one zarówno zwiększoną wiernością, procesywnością jak i zdolnością amplifikacji trudnych matryc.

## 6. Podsumowanie

W związku z ogromnym rozpowszechnieniem reakcji PCR w różnych dziedzinach nauki, a także w przemyśle problemy jakie napotyka się podczas amplifikacji są bardzo duże. Firmy biotechnologiczne wychodzą naprzeciw zapotrzebowaniom i cały czas poszukują oraz konstruują nowe i ulepszone wersje polimeraz DNA. Drogi postępowania są najróżniejsze. Poniżej, w tab. 2, przedstawione zostały najczęstsze problemy, ich rozwiązania oraz rekomendowane polimerazy. Wydaje się, że modyfikacje już znanych, a nie poszukiwanie nowych polimeraz to sposób łatwiejszy, szybszy i dający większe możliwości w zaprojektowaniu enzymów o pożądanym cechach. Obrana droga zależy jednak od naukowca.



Tabela 2. Najczęstsze problem w reakcjach PCR, ich przyczyny i możliwe rozwiązania wraz z rekomendowaną polimerazą DNA

Problem	Przyczyna	Rozwiązanie	Polecana polimeraza DNA	
			natywna	zmodyfikowana
Niespecyficzne produkty	Aktywność polimerazy w RT	Użycie polimerazy hot-startowej	-	<i>Taq</i> W706R I707L Z708B
Próbki krwi lub środowiskowe	Obecność inhibitorów	Użycie polimerazy odpornej na inhibitory	<i>Tfl</i> , <i>Tli</i> , <i>Tth</i> , <i>Pfu</i>	<i>Taq</i> Z708V,K,L
Błędy w sekwencji	Polimeraza z niską wiernością	Użycie polimerazy o polepszonej wierności	<i>Pfu</i>	Phusion <i>SsoSSB-Tzi</i> <i>Kofu</i>
Długie produkty	Polimeraza z niską procesywnością	Użycie polimerazy o lepszej procesywności	Mieszane polimerazy <i>Taq</i> i <i>Tpe</i> Mieszane polimerazy KOD i KOD (exo) <i>Thermococcus fumicolans</i>	Phusion <i>RB69-RB69SSB</i> <i>Sso7d-Taq</i> <i>Pfu-Sso7d</i> <i>SsoSSB-Tzi</i> <i>Sso7d-KOD</i> <i>Tth-Taq</i>
Matryce bogate w GC	Obecność trudnotopliwych par GC	Użycie polimerazy wysokotermotabilnej	<i>Pfu</i>	Phusion

Źródło: opracowanie własne

## Literatura

1. Passarge E., *Color Atlas of Genetics*, Thieme, (2007)
2. Hubscher U. DNA Polymerases – Discovery, *Characterization and Functions in Cellular DNA Transactions*, World Scientific Publishing, (2010).
3. Al-soud W. A., Rådström P., *Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood*, 39 (2001), s. 485-93
4. Watson R. J., Blackwell B., *Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction*, Canadian Journal of Microbiology, 46 (2000), s.633-42
5. Mamedov T. G. Pienaar E., Whitney S. E., TerMaat J. R., Carvill G., Goliath R., Subramanian A., Viljoen H. J., *A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates*, Computational Biology and Chemistry, 32 (2008), s.452-7
6. Primrose S. B., Twyman R. M., *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell, (2006)
7. Vainshtein I., Atrazhev A., Eom S. H., Elliott J. F., Wishart D. S., Malcolm B. A., *Peptide Rescue of an N-Terminal Truncation of the Stoffel Fragment of Taq DNA Polymerase*, Protein Science, 5 (1996), 51785-92



8. Musso M., Bocciardi R., Parodi S., Ravazzolo R., Ceccherini I., *Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences*, The Journal of Molecular Diagnostics, 8 (2006), s.544-50
9. Zhang Z., Kermekchiev M. B., Barnes W. M., *Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq*. The Journal of Molecular Diagnostics, 12 (2010), s.152-61
10. Nagai M., Yoshida A., Sato N., *Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on PCR*, International Union of Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientist, 44 (1998), s.157-163
11. Forbes B. A., Hicks K. E., *Substances Interfering with Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Specimens by PCR: Effects of Bovine Serum Albumin*, Journal of Clinical Microbiology, 34 (1996), s.2125-2128
12. Kovárová M., Dráber P., *New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions*, Nucleic Acids Research, 28(2000), s. E70
13. Weyant R. S., Edmonds P., Swaminathan B., *Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase*, BioTechniques, 9(1990), s.308-9
14. Zhang Z., Yang X., Meng L., Liu F., Shen C., Yang W., *Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents*, BioTechniques, 47(2009), s.775-779
15. Dabrowski S., Kur J., *Cloning overexpression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of Escherichia coli and use in polymerase chain reaction amplification*, Protein Expression and Purification, 16(1999), s. 96-102
16. Dabrowski S., Olszewski M., Piatek R., Brillowska-Dabrowska A., Konopa G., Kur J., *Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from Thermus thermophilus and Thermus aquaticus – new arrangement of binding domains*, Microbiology, 148 (2002), s. 3307-3315
17. Olszewski M., Mickiewicz M., Kur J., *Two highly thermostable paralogous single-stranded DNA-binding proteins from Thermoanaerobacter tengcongensis*, Archives of Microbiology, 190 (2008), s. 79-87
18. Olszewski M., Rebała K., Szczerkowska Z., Kur J., *Application of SSB-like protein from Thermus aquaticus in multiplex PCR of human Y-STR markers identification*, Molecular and Cellular Probes, 19 (2005), s. 203-5
19. Nowak M., Olszewski M., Śpibida M., Kur J., *Characterization of single-stranded DNA-binding proteins from the psychrophilic bacteria Desulfotalea psychrophila, Flavobacterium psychrophilum, Psychrobacter arcticus, Psychrobacter cryohalolentis, Psychromonas ingrahamii, Psychroflexus torquus, and Photobacterium profundum*, BMC Microbiology, 14 (2014), s. 91
20. Stemmer W. P., *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 (1994), s.10747-51
21. Hanson-Manful P., Patrick W. M., *Construction and analysis of randomized protein-encoding libraries using error-prone PCR*, Methods in Molecular Biology, 996 (2013), s. 251-67
22. Reikofski J., Tao B. Y., *Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis*, Biotechnology Advances, 10 (1992), s.535-47
23. Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*, Gene, 77 (1989), s. 51-9



24. Suzuki M., Avicola A. K., Hood L., Loeb L. A., *Low fidelity mutants in the O-helix of Thermus aquaticus DNA polymerase I*, The Journal of Biological Chemistry, 272(1997), s. 11228-35
25. Suzuki M. Yoshida S., Adman E. T., Blank A., Loeb L. A., *Thermus aquaticus DNA polymerase I mutants with altered fidelity. Interacting mutations in the O-helix*, The Journal of Biological Chemistry, 275 (2000), s. 32728-35
26. Yamagami T., Ishino S., Kawarabayasi S., Ishino Y., *Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering*, Frontiers in Microbiology, 5 (2014), s. 461
27. Kermekchiev M. B., Kirilova L. I., Vail E. E., Barnes W. M., *Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples*, Nucleic Acids Research, 37 (2009), s. e40
28. Ignatov K., Kramarov V., Billingham S., *Chimeric DNA polymerase*, US Patent 20090209005 A1, (2009)
29. Faurholm B., McEwan P., Bourn W., Rush G., *Chimeric DNA Polymerases*, US Patent 20120115188 A1, (2012)
30. Hamilton S. C., Farchaus J. W., Davis M. C., *DNA polymerases as engines for biotechnology*, BioTechniques, 31 (2001), s. 370-6, 378-80, 382-3
31. Gelfand D. H., Reichert F. L., *Mutant chimeric DNA polymerase*, US Patent 6228628 B1, (2001)
32. Wang Y., Prosen D. E., Mei L., Sullivan J. C., Finney M., Horn P. B. V., *A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro*, Nucleic Acids Research, 32 (2004), s. 1197-207
33. Gao Y. G., Su S. Y., Robinson H., Padmanabhan S., Lim L., McCrary B. S., Wan A. H., *The crystal structure of the hyperthermophile chromosomal protein Sso7d bound to DNA*, Nature Structural & Molecular Biology, 5 (1998), s. 782-786
34. Lee J. I., Cho S. S., Kil E. J., Kwon S. T., *Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from Thermococcus pacificus*, Enzyme and Microbial Technology, 47 (2010), s. 147-152
35. Wang F., Li S., Zhao H., Bian L., Chen L., Zhang Z., Zhong X., Ma L., Yu X., *Expression and Characterization of the RKOD DNA Polymerase in Pichia pastoris*, PloS one, 10 (2015), s. e0131757
36. Sun S., Geng L., Shamoo Y., *Structure and Enzymatic Properties of a Chimeric Bacteriophage RB69 DNA Polymerase and Single-Stranded DNA Binding Protein With Increased Processivity*, Proteins, 65 (2006), s. 231-238
37. Lee J. E., Potter R. J., Mandelman D., *SSB – polymerase fusion proteins*, EP Patent 1934372 B1, (2013)
38. Haseltine C. A., Kowalczykowski S. C., *A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon Sulfolobus solfataricus*, Molecular Microbiology, 43 (2002), s. 1505-15
39. McNerney P., Adams P., Hadi M. Z., *Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase*, Molecular biology international, 2014 (2014), s. 287430
40. Takagi M., Nishioka M., Kakihara H., Kitabayashi M., Inoue H., Kawakami B., Oka M., Imanaka T., *Characterization of DNA polymerase from Pyrococcus sp. strain KOD1 and its application to PCR*, Applied and Environmental Microbiology, 63(1997), s. 4504-10





41. McDonald J. P., Hall A., Gasparutto D., Cadet J., Ballantyne J., Woodgate R., *Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs*, *Nucleic Acids Research*, 34 (2006), s. 1102-1111
42. Lehmann A. R., *New Functions for Y Family Polymerases*, *Molecular Cell*, 24 (2006), s.493-495
43. Nishioka M., Mizuguchi H., Fujiwara S., Komatsubara S., Kitabayashi M., Uemura H., Takagi M., Imanaka T., *Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme*, *Journal of Biotechnology*, 88 (2001), s. 141-149
44. Cline J., Braman J. C., Hogrefe H. H., *PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases*, *Nucleic Acids Research*, 24 (1996), s. 3546-51
45. Al-soud W. A., Rådström P., *Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1998), s. 3748-3753

### **Modyfikacje polimeraz DNA jako rozwiązania problemów w reakcjach PCR**

Reakcja PCR już od wielu lat jest podstawowym narzędziem stosowanym w biotechnologii molekularnej. Nadal napotyka się jednak liczne problemy podczas jej przeprowadzania związane z trudnymi matrycami, obecnością inhibitorów itp. Optymalizacja reakcji PCR jest więc niezbędna w celu poprawy wyników. Jednym z rozwiązań tych problemów może być modyfikowanie polimeraz DNA. W powyższym artykule opisano problemy i rozwiązania zależne od polimerazy DNA. Opisano również powody, które uzasadniają potrzebę modyfikacji polimeraz DNA, rodzaje modyfikacji, a także podjęto próbę określenia wpływu tych zmian na końcową efektywność polimeraz.

Słowa kluczowe: PCR, polimerazy DNA, modyfikacje polimeraz, mutacje, polimerazy fuzyjne

### **Modifications of DNA polymerases as a problem solution in the PCR reactions**

PCR has become an essential tool in biological science. However, we often encounter problems with difficult targets, inhibitors accompanying the samples or PCR trouble related to DNA polymerase. Therefore, PCR optimization is necessary to obtain better results. One solution is using modified DNA polymerases with desirable properties for our experiments. In this article, PCR troubleshooting, depending on the DNA polymerase used, is shown. We also explain the reasons that might justify the need for modification of DNA polymerases, describe the type of modifications, and consider the links between modifications in DNA polymerases and PCR efficiency.

Keywords: PCR, DNA polymerase, polymerase modification, fusion DNA polymerases