



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Marta Śpibida
Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Fuzyjne polimerazy DNA – otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Fusion DNA polymerases – production, characterization and applications

Promotor
<i>Podpis</i>
dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. PG
Promotor pomocniczy
<i>Podpis</i>
dr inż. Marcin Olszewski



Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej Promotor Pani dr hab. Beacie Krawczyk za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie, za zaangażowanie, dzięki któremu możliwe było napisanie tej pracy.

Chciałam wyrazić ogromną wdzięczność mojemu Promotorowi dr inż. Marcinowi Olszewskiemu, bez którego moja praca doktorska nie mogłaby powstać. Dziękuję za inspirację do badań, niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń oraz kreatywne podejście w poszukiwaniu rozwiązań napotkanych problemów. Pragnę również podziękować za pomoc w redagowaniu pracy i poświęcony czas.

Bardzo dziękuję dr inż. Kasjanowi Szemiako za życzliwość, poświęcony czas, udzieloną pomoc oraz zawsze trafne i cenne wskazówki dotyczące metodyki mojej pracy.

Serdecznie dziękuję wszystkim koleżankom i kolegom za wspaniałą atmosferę pracy i nieustanną gotowość do pomocy, dziękuję Ani Pawlak-Szukalskiej, Ewelinie Krajewskiej, Monice Wickiej-Grochockiej, Natalii Filipowicz, Agacie Terebieniec, Magdzie Wysockiej, Martynie Mroczyńskiej, Bartkowi Ferze i wszystkim Pracownikom i doktorantom z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii.

Bardzo dziękuję Andrzejowi Skwareckiemu za wsparcie i pomoc w redagowaniu pracy doktorskiej.

Ogromne podziękowania składam Rodzicom i Bratu, którzy zawsze mnie mobilizowali i wspierali, dziękuję im za cierpliwość, nieustającą wiarę w moje możliwości i wszelką pomoc.





SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	5
CEL PRACY	10
STRESZCZENIE.....	11
ABSTRACT.....	13
WSTĘP TEORETYCZNY.....	14
1. Polimerazy DNA	14
1.1 Charakterystyka polimeraz DNA	14
1.2 Ogólna budowa polimeraz DNA	14
1.3 Podział polimeraz DNA	15
1.4 Mechanizm działania polimeraz DNA	17
2. Termostabilne polimerazy DNA.....	20
2.1 Charakterystyka termostabilnych polimeraz DNA.....	20
2.2 Przykłady termostabilnych polimeraz DNA	20
2.2.1 Bakteryjne polimerazy DNA	20
2.2.2 Polimerazy DNA z archeonów	21
3. Technika PCR.....	24
4. Problemy związane z amplifikacją DNA w reakcji PCR	25
4.1 Problemy związane z obecnością inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej	26
4.2 Problemy związane z amplifikacją długich fragmentów DNA i matryc DNA bogatych w pary GC.....	26
4.3 Problemy związane z powstawaniem niespecyficznego produktu PCR	27
4.4 Problemy związane z wiernością polimeraz DNA	27
5. Sposoby rozwiązywania problemów z reakcją PCR – modyfikacje w składzie mieszaniny reakcyjnej ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz DNA.....	28
5.1 Stosowanie wzmacniaczy, dodatkowych składników do reakcji PCR i udoskonalonych buforów	29
5.2 Wprowadzanie zmian w genach kodujących polimerazy DNA.....	30
5.3 Tworzenie chimericznych polimeraz DNA	31
5.4 Tworzenie fuzyjnych polimeraz DNA.....	33
5.4.1 Fuzja z białkiem wiążącym dwuniciowe DNA	33
5.4.2 Fuzja z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA.....	34
6. Zastosowanie natywnych i zmodyfikowanych polimeraz DNA.....	35
7. Charakterystyka białek wiążących DNA o potencjalnym zastosowaniu w układach fuzyjnych z polimerazą DNA.....	37
7.1. Białko SSB pochodzące z faga RB69	38
7.2 Białko SSB pochodzące z <i>Nanoarchaeum equitans</i>	39
7.3 Białko PriB pochodzące z <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	40
7.4 Domena DBD z ligazy <i>Pyrococcus furiosus</i>	41
MATERIAŁY	44
1. Materiały podstawowe.....	44



2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	44
3. Odczynniki chemiczne.....	45
4. Pożywki i podłoża mikrobiologiczne.....	46
5. Markery.....	46
6. Odczynniki do reakcji PCR.....	47
7. Enzymy restrykcyjne i ich bufony do reakcji trawienia.....	50
8. Odczynniki do reakcji Gibsona	50
9. Odczynniki do rozdzielenia DNA za pomocą elektroforezy agarozowej	50
10. Odczynniki do rozdzielenia białek za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	51
11. Bufory do oczyszczania białek.....	52
12. Odczynniki do filtracji żelowej	53
13. Szczepy bakteryjne, DNA plazmidowe i genomowe	53
14. Odczynniki do izolacji genomowego DNA	54
15. Odczynniki do izolacji plazmidowego DNA.....	54
16. Odczynniki do oczyszczania DNA z żelu agarozowego i po reakcjach trawienia enzymatycznego	54
17. Zestaw do oznaczania jednostkowości polimeraz DNA	54
18. Pozostałe bufony i roztwory	55
METODY.....	56
1. Izolacja genomowego DNA.....	56
2. Izolacja plazmidowego DNA	56
3. Elektroforetyczny rozdział DNA w żelu agarozowym	56
4. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE.....	57
4.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego.....	57
4.2. Przygotowanie próbek do elektroforezy białkowej	57
4.3. Barwienie i odbarwienie żeli poliakrylamidowych	57
5. Izolacja DNA z żelu agarozowego.....	57
6. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	57
7. Amplifikacja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA	58
8. Reakcje trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi.....	59
9. Reakcja Gibsona	59
10. Hodowle bakteryjne	60
10.1. Hodowle w pożywce płynnej.....	60
10.2. Hodowle na podłożu stałym	60
11. Transformacja komórek <i>E. coli</i> rekombinantowym DNA.....	60
11.1 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	60
11.2 Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	61
12. Sprawdzenie obecności DNA insertu	61
12.1 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą analizy restrykcyjnej	61
12.2 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą sekwencjonowania	61
13. Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne	62
13.1 Optymalizacja warunków ekspresji	62
13.2 Ekspresja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA w objętości 1000 ml pożywki	62

14. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii metalopowinowactwa	62
15. Usuwanie DNA z preparatów białkowych	63
16. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii żelowej.....	63
17. Dializa oczyszczonych preparatów białkowych.....	63
18. Badanie pozostałości kwasów nukleinowych w preparatach białkowych.....	64
18.1. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA metodą elektroforetyczną	64
18.2. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA metodą spektrofotometryczną.....	64
18.3. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem reakcji PCR	64
19. Określenie optymalnych warunków amplifikacji fuzyjnych polimeraz DNA	65
19.1 Dobór optymalnego buforu	65
19.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu.....	66
19.3. Dobór optymalnego stężenia chlorku potasu lub siarczanu (VI) amonu	66
19.4. Dobór optymalnego pH buforu reakcyjnego	66
20. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych polimeraz DNA.....	66
21. Określenie termostabilności fuzyjnych polimeraz DNA.....	68
22. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych polimeraz DNA.....	68
23. Oznaczenie szybkości syntezy DNA dla fuzyjnych polimeraz DNA	71
24. Badanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA.....	71
25. Określenie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA przez fuzyjne polimerazy DNA	72
26. Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC.....	73
27. Badanie odporności fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory	74
27.1 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji w obecności laktoferyny i heparyny jako inhibitorów z krwi	74
27.2 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji w obecności krwi pełnej	74
27.2.1 Wykorzystanie plazmidowego DNA jako matrycy DNA w reakcji PCR w obecności krwi	74
27.2.2 Wykorzystanie genomowego DNA jako matrycy DNA w reakcji PCR w obecności krwi	75
27.2.3 Wykorzystanie DNA pochodzącego z hodowli bakteryjnej jako matrycy w reakcji PCR w obecności krwi	75
27.2.4 Wykorzystanie DNA pochodzącego z krwi jako matrycy w reakcji PCR	76
28. Wpływ białek fuzyjnych rekombinantowych polimeraz DNA na amplifikację w warunkach wysokich temperatur hybrydyzacji starterów	76
29. Badanie oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA i dsDNA.....	77
30. Używane programy komputerowe	77
WYNIKI	78
I. Otrzymywanie fuzyjnych polimeraz DNA.....	78



1. Klonowanie genów kodujących białka RB69SSB- TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS	79
1.1. Izolacja genomowego DNA	79
1.2. Amplifikacja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA	79
1.3. Klonowanie genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA do DNA wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC	80
2. Ekspresja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA w komórkach bakteryjnych <i>E. coli</i> BL RIL	84
3. Oczyszczanie rekombinantowych białek RB69SSB-TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS za pomocą chromatografii metalopowinowactwa.....	85
4. Usuwanie genomowego DNA <i>E. coli</i> z preparatów białkowych	86
5. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii żelowej	88
II. Charakterystyka fuzyjnych polimeraz DNA.....	88
6. Określenie optymalnych warunków amplifikacji fuzyjnych polimeraz DNA.....	89
6.1. Dobór optymalnego buforu	89
6.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu, chlorku potasu i siarczanu (VI) amonu oraz optymalnego pH buforu reakcyjnego	90
7. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych polimeraz DNA	91
8. Określenie termostabilności fuzyjnych polimeraz DNA	93
9. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych polimeraz DNA	94
10. Oznaczenie szybkości syntezy DNA fuzyjnych polimeraz DNA	96
11. Badanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA.....	98
12. Określenie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA przez fuzyjne polimerazy DNA.....	99
13. Badanie zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC przez fuzyjne polimerazy DNA.....	100
14. Badanie odporności fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory	100
14.1 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji DNA w obecności inhibitorów z krwi i krwi pełnej	100
14.2 Badanie zdolności fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-TaqS do amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej w różnych konfiguracjach matrycowego DNA	101
III. Oddziaływanie fuzyjnych polimeraz DNA z kwasami nukleinowymi	103
15. Wpływ białek fuzyjnych polimeraz DNA na amplifikację w warunkach wysokich temperatur hybrydyzacji starterów	103
16. Badanie oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA i dsDNA	104
WNIOSKI I Dyskusja.....	107
1. Konstrukty fuzyjnych polimeraz DNA.....	109
2. Otrzymywanie fuzyjnych polimeraz DNA	110
3. Dobór optymalnych warunków amplifikacji DNA dla fuzyjnych polimeraz DNA	111
4. Właściwości fuzyjnych polimeraz DNA	111
5. Oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z kwasami nukleinowymi.....	113
6. Proponowane aplikacje dla fuzyjnych polimeraz DNA.....	115
7. Istotne cechy polimeraz DNA i białek użytych jako składowe fuzyjnych polimeraz DNA.....	116
PODSUMOWANIE	118

INDEKS SKRÓTÓW.....	119
LITERATURA.....	121
DOROBK NAUKOWY.....	128

ROZDZIAŁ 1

CEL PRACY

Podstawowym celem pracy było otrzymanie fuzyjnych polimeraz DNA składających się z polimerazy DNA z *Thermus aquaticus* pozbawionej aktywności egzonukleolitycznej 5'→3' (TaqStoffel) oraz białek wiążących jedno- lub dwuniciowe DNA, a następnie zbadanie ich właściwości: procesywności, szybkości elongacji, czułości, wrażliwości na inhibitory, termostabilności, zdolności do amplifikacji długich fragmentów DNA oraz matryc bogatych w pary GC.

Szczegółowe cele badań:

- 1) optymalizacja otrzymywania i oczyszczania fuzyjnych polimeraz DNA (NeqSSB-TaqS, DBD-TaqS, RB69SSB-TaqS oraz TtePriB-TaqS),
- 2) opracowanie metodyki związanej z charakterystyką molekularną polimeraz DNA i jej przeprowadzenie,
- 3) wskazanie potencjalnych zastosowań otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA,
- 4) wytypowanie fuzyjnej polimerazy DNA o najkorzystniejszych cechach pod względem jej użyteczności,
- 5) określenia istotnych cech białek użytych w fuzji z polimerazą DNA, które ułatwią racjonalne projektowanie innych fuzyjnych polimeraz DNA.



ROZDZIAŁ 2

STRESZCZENIE

Obecnie reakcje PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) wykazują bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce medycznej, biologii molekularnej czy inżynierii genetycznej. Efektywność tych reakcji rozumiana jako wydajność i wierność przeprowadzonej amplifikacji jest nieodłącznie związana ze stosowaną polimerazą DNA i warunkami prowadzenia reakcji PCR. Aby sprostać wymaganiom stawianym przez nowoczesne metody diagnostyczne oraz współczesną inżynierię genetyczną konieczne jest poszukiwanie polimeraz DNA o coraz lepszych właściwościach. Dotychczas wprowadzane modyfikacje amplifikacji DNA to przede wszystkim stosowanie udoskonalonych buforów, wzmacniaczy reakcji PCR, wprowadzanie mutacji w polimerazach DNA lub konstrukcje polimeraz chimerycznych. Coraz popularniejsze stają się również modyfikacje znanych już polimeraz DNA poprzez tworzenie ich fuzji z białkami mogącymi poprawić ich użyteczność.

Podstawowym założeniem niniejszej pracy było otrzymanie nowej, lepszej polimerazy DNA jako wynik fuzji polimerazy DNA z białkiem wiążącymi jedno- lub dwuniciowe DNA i zbadanie jej nowych właściwości pod względem procesywności, termostabilności, powinowactwa do matrycy DNA, jak również odporności na inhibitory występujące w próbkach klinicznych (np. we krwi).

Modyfikacjom została poddana najbardziej popularna w diagnostyce molekularnej polimeraza DNA z *Thermus aquaticus* z delecją reszt aminokwasowych tworzących domenę odpowiedzialną za aktywność egzonukleolityczną 5'→3' (TaqStoffel). Natomiast białkami, które zastosowano do fuzji były białka mające naturalną zdolność do wiązania się z DNA: RB69SSB, TtePriB i NeqSSB oraz domena DBD ligazy *P. furiosus*.

Cechy nowych polimeraz DNA porównano z polimerazą DNA TaqStoffel. Uzyskano polimerazy o ulepszonych podstawowych cechach, bardziej przydatnych do pracy z problematycznymi matrycami (długie i bogate w pary GC) oraz z próbkami, którym mogą towarzyszyć inhibitory z krwi (laktoferyna, heparyna). Ponadto wykazano wzrost termostabilności, procesywności i czułości fuzyjnych polimeraz DNA zwłaszcza w przypadku fuzji z białkiem SSB pochodzącym z *Nanoarchaeum equitans* (NeqSSB) oraz domeną DBD ligazy *Pyrococcus furiosus*.



Zoptymalizowane i przeprowadzone doświadczenia pozwoliły również na wyznaczenie istotnych cech białek użytych w fuzji z polimerazą DNA (co może być istotne w racjonalnym projektowaniu innych fuzyjnych polimeraz DNA) oraz sposobu badania ich właściwości.

ROZDZIAŁ 3

ABSTRACT

Nowadays PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) method is commonly used in diagnostics, molecular biology and genetic engineering. Efficiency and fidelity of amplification is strongly connected with DNA polymerase and reaction conditions. To meet the requirements of modern diagnostic methods and contemporary genetic engineering, it is essential to seek new DNA polymerases with better and better properties. So far, the modifications have been based on the improved buffer PCR amplifiers, carrying out a mutation in DNA polymerase or construction of chimeric polymerases. More and more popular there are also modifications of known DNA polymerases through creating a fusion with proteins being able to increase their usefulness.

The main goal of this study was to create a new, better DNA polymerase fused with protein binding single and double-stranded DNA, and investigate its new properties in terms of processivity, thermostability, relativity to DNA matrix and resistance to inhibitors from clinical samples (e.g. blood).

Being the most popular in molecular diagnostics, the DNA polymerase from *Thermus aquaticus* with deletion of amino acidic remainders creating the domain responsible for 5'→3' exonucleotic activity (TaqStoffel) was subjected to modifications. And, the proteins used for fusion were those which had a natural ability to binding with DNA such as: RB69SSB, TtePriB i NeqSSB and DBD domain from ligase of *Pyrococcus furiosus*.

The features of the new DNA polymerases were compared with TaqStoffel DNA polymerase. The DNA Polymerases with improved basic features, more useful for working with problematic templates (long-range PCR and GC-rich template) and with samples that could be accompanied by inhibitors from blood (lactoferrin, heparin) had been obtained. What is more, a higher thermostability, processivity and fusion sensitivity of the DNA polymerases, especially in the case of NeqSSB-TaqS and DBD-TaqS were observed.

The optimized and conducted experiments also allowed to determine the essential characteristics of proteins used in the fusion with DNA polymerase (which may be significant in further rational creating of new DNA polymerase fusions) and the way of testing their properties.

ROZDZIAŁ 4

WSTĘP TEORETYCZNY

1. Polimerazy DNA

1.1 Charakterystyka polimeraz DNA

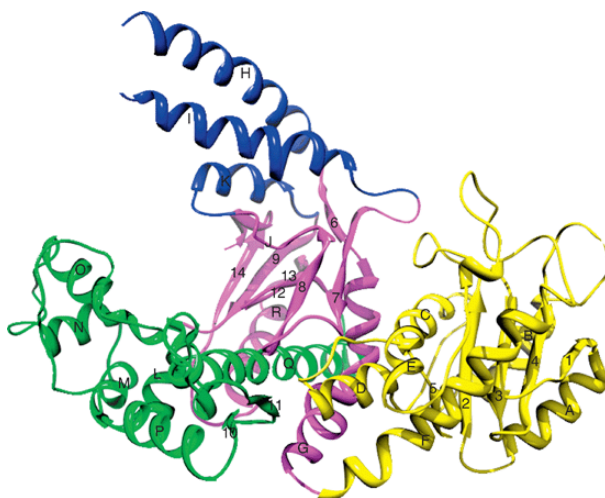
Polimeraza DNA to enzym, który odgrywa zasadniczą rolę w procesie replikacji i naprawie DNA. Dzięki odkryciu, poznaniu budowy i funkcji polimerazy DNA stało się możliwe wykorzystanie jej *in vitro* w reakcjach amplifikacji kwasów nukleinowych. Opracowana w 1983 roku przez Kary Mullis i Randall Saiki reakcja PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) znalazła wkrótce zastosowanie jako podstawowe narzędzie w technikach biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, jak również w diagnostyce molekularnej (1). Polimeraza DNA w reakcji PCR katalizuje proces syntezy DNA poprzez dołączanie kolejnych nukleotydów do końca 3'OH nici DNA, jednak oprócz właściwości polimeryzacyjnej może posiadać również zdolność do hydrolizy cząsteczek DNA dzięki obecności domeny egzonukleolitycznej o kierunku działania 3'→5' lub 5'→3' (2).

1.2 Ogólna budowa polimeraz DNA

Polimerazy DNA występują u wszystkich organizmów żywych i wykazują dość podobną strukturę przestrzenną, która przypomina prawą dłoń (rysunek 1). Składa się ona z 3 podstawowych subdomen: palców, śródreżca i kciuka, którym przypisane są szczegółowo określone funkcje. Subdomena palców odpowiedzialna jest za przyłączanie dNTP (trifosforan deoksynukleozydu) oraz wiązanie do jednoniciowego DNA. Dwuniciowe DNA powstałe w wyniku hybrydyzacji startera do matrycy DNA stabilizowane jest za pośrednictwem subdomeny kciuka, natomiast jony magnezu wiązane są przez subdomenę śródreżca (3). Polimerazy DNA różnią się między sobą wieloma cechami np. szybkością katalizy, procesywnością, obecnością lub brakiem różnych domen związanych z aktywnością nukleolityczną czy dodatkowymi współdziałającymi podjednostkami białkowymi. Podstawową domeną występującą



u wszystkich polimeraz DNA i odpowiadającą za fundamentalną cechę tych enzymów jest domena polimeryzacyjna syntezująca nici DNA poprzez przyłączanie kolejnych nukleotydów do końca 3'OH startera. Dodatkowe domeny, które mogą występować u polimeraz DNA to domeny egzonukleolityczne o kierunku działania 3'→5' i 5'→3'. Obecność domeny egzonukleazy 3'→5' nadaje enzymowi aktywność korektorską, dzięki czemu możliwa jest weryfikacja poprawności wprowadzanych nukleotydów i w razie potrzeby ich usuwanie. Domena egzonukleolityczna 5'→3' umożliwia eliminowanie starterów, a powstałe po nich luki są wypełniane w końcowej fazie syntezy DNA (4).



Rysunek 1. Struktura krystalograficzna polimerazy DNA I *E. coli*. Kolorem żółtym oznaczono domenę egzonukleazy 3'→5', kolorem zielonym domenę polimerazy 5'→3' zbudowaną z subdomeny palców, kolorem fioletowym subdomenę śródręcza, a kolorem niebieskim subdomenę kciuka. Litery A-R oznaczają struktury typu helisa, liczby 1-14 β-nici (5)

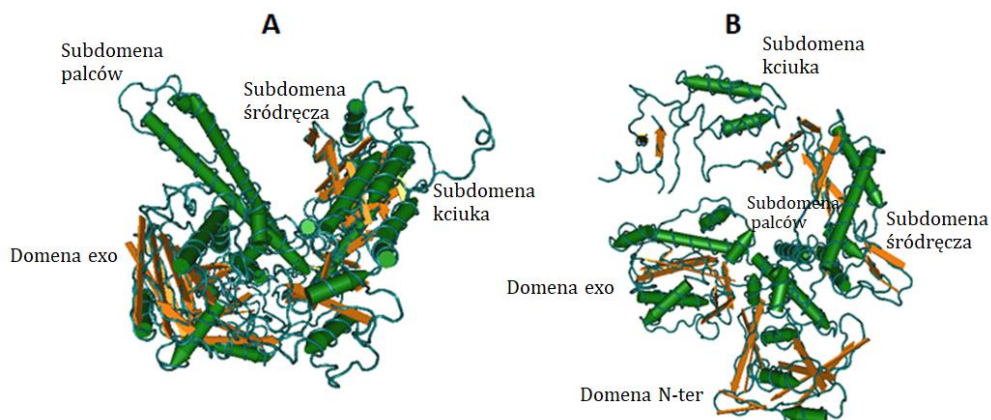
1.3 Podział polimeraz DNA

W oparciu o analizę sekwencji aminokwasowych oraz filogenezę polimerazy DNA zostały podzielone na 7 różnych rodzin: A, B, C, D, X, Y i RT. Reprezentantów bakteryjnych polimeraz DNA przypisano do rodzin A, B, C, X, Y; polimerazy DNA z archeonów do rodzin B, D, X i Y; a polimerazy DNA eukariotyczne do rodzin A, B, X, Y i RT. Polimerazy wirusowe natomiast należą do rodzin A, B oraz X (3).

Rodzina A to najlepiej poznana do tej pory grupa polimeraz DNA. Podstawowym zadaniem polimeraz DNA z tej grupy jest replikacja i naprawa DNA, dlatego też większość polimeraz DNA rodziny A posiada aktywność 3'→5' i 5'→3' egzonukleazy. Do rodziny tej należą dobrze zbadane polimerazy DNA takie jak: polimeraza DNA I *E. coli*, polimeraza DNA I *Bacillus subtilis*, polimeraza DNA I *Thermus aquaticus*, polimeraza DNA I *Bacillus stearothermophilus* czy polimeraza DNA faga T7 (5) (6).

Do rodziny B należą polimerazy DNA zarówno eukariotyczne, bakteryjne jak również te obecne u bakteriofagów i archeonów. Grupa ta jest najbardziej zróżnicowana pod względem budowy, a jej charakterystyczną cechą jest budowa

subdomeny palców, na którą składają się tylko dwie długie α -helisy, a także odmienne ułożenie domeny egzonukleolitycznej 3'→5' w porównaniu do pozostałych rodzin, co przedstawiono na rysunku 2. To nietypowe ułożenie sprawia, że aktywność tej domeny jest bardzo wysoka, 1000-krotnie przewyższa domenę korektorską fragmentu Klenowa. Polimerazy DNA większości Eukariota są całkowicie pozbawione właściwości korektorskich, ich podstawowym zadaniem jest synteza nici DNA wiodącej jak i opóźnionej, przy czym zachowują one wysoką wierność podczas replikacji (7) (8).



Rysunek 2. Porównanie budowy polimerazy DNA faga RB69 (9) (A) oraz polimerazy DNA KOD1 z archeona *Thermococcus kodakarensis* (B) (10)

Polimeraza DNA III *E. coli* i polimeraza DNA III *Bacillus subtilis* to przedstawiciele rodziny C. Większość polimeraz DNA tej rodziny występuje jako holoenzymy, które oddziałują z innymi białkami i tworzą kompleksy o co najmniej 10 podjednostkach. Badania wykazują, iż polimerazy DNA tej rodziny są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za replikację (11).

Rodzina D polimeraz DNA występuje tylko u Euryarchaeota, a jej reprezentantem jest polimeraza DNA II *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Polimeraza DNA Pfu w swojej budowie posiada dwie charakterystyczne podjednostki, małą DP1 i dużą DP2. Podjednostka DP2 posiada funkcję polimeryzacyjną, natomiast podjednostka DP1 pełni głównie rolę pomocniczą oraz wykazuje aktywność 3'→5' egzonukleazy (3).

Do rodziny X należą zarówno polimerazy DNA bakteryjne, pochodzące z archeonów jak i eukariotyczne: β , λ , μ , których podstawową funkcją jest katalizowanie replikacji, udział w rekombinacji i naprawie DNA. Polimerazy DNA tej rodziny to zazwyczaj małe, monomeryczne cząsteczki, których zdolność naprawy DNA opiera się głównie na wypełnianiu luk i łączeniu pękniętych nici DNA (12). Ciekawym przedstawicielem tej rodziny są eukariotyczne polimerazy β , które uczestniczą w naprawie uszkodzonego DNA w wyniku deaminacji, utleniania czy alkilacji. Naprawa DNA odbywa się poprzez wycinanie pojedynczych zasad przez system BER (ang. base excision repair) (12) (13). Rodzinę X charakteryzuje silne zakonserwowanie w obrębie subdomeny śródreżca, które dotyczą przede wszystkim trzech zakonserwowanych reszt kwasu asparaginowego w centrum aktywnym enzymu (14). Ponadto struktura subdomeny śródreżca tej polimerazy DNA wykazuje pewien stopień zredukowania

w porównaniu do subdomeny śródreżca polimeraz DNA z rodziny A, B i C, a wchodzące w jej skład β -kartki wykazują odwrotną orientację (13).

Charakterystyczna budowa polimeraz DNA z rodziny Y, pozwala na ich wykorzystanie w amplifikacji uszkodzonego DNA. Polimerazy DNA z tej rodziny nie wykazują aktywności egzonukleolitycznej 3'-5', co wiąże się z ich większą skłonnością do popełniania błędów w obrębie nieuszkodzonej matrycy DNA, posiadają jednak dodatkową domenę małego palca, która oddziałuje z matrycowym DNA i umożliwia omijanie uszkodzeń nici (15) (16).

Ostatnią rodzinę polimeraz DNA stanowią polimerazy RT, a należą do niej zarówno enzymy uczestniczące w odwrotnej transkrypcji u retrowirusów, jak i eukariotyczne telomerazy. Polimerazy RT syntezują nić DNA na matrycy jednoniciowego RNA. Proces odwrotnej transkrypcji wykorzystywany jest również przez telomerazę w procesie wydłużania telomerów (17) (18).

Nie należąca do tej rodziny, ale również posiadająca zdolność odwrotnej transkrypcji jest polimeraza DNA Tth, wyizolowana z eubakterii *Thermus thermophilus*. Wykazuje ona duże podobieństwo do polimerazy DNA Taq w obrębie sekwencji, jak i struktury przestrzennej białka. Co ciekawe, polimeraza DNA Tth w zależności od rodzaju użytego kofaktora wykazuje inne aktywności. W obecności jonów magnezu polimeraza Tth wykazuje zdolność do amplifikacji DNA w reakcji PCR, natomiast w obecności jonów manganu wykazuje aktywność odwrotnej transkryptazy syntezując nić cDNA na matrycy RNA (19)(20).

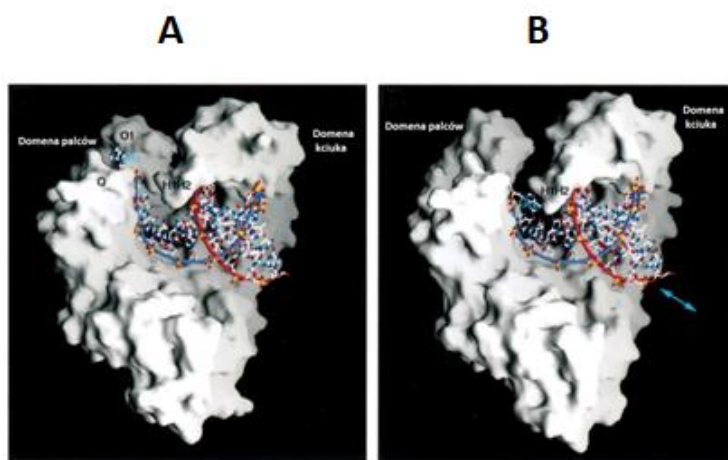
1.4 Mechanizm działania polimeraz DNA

Podstawową funkcją polimerazy DNA jest synteza łańcucha polinukleotydowego poprzez dodawanie kolejnych nukleotydów do końca 3'OH. Polimerazy DNA, w przeciwieństwie do polimeraz RNA, nie są w stanie syntezować *de novo*, zainicjowanie reakcji jest możliwe tylko wtedy, gdy polimeraza DNA ma dostęp do startera zhybrydowanego z matrycą DNA i posiadającego wolną grupę hydroksylową 3'OH. W mechanizmie syntezy DNA wyróżnia się kilka istotnych etapów. Pierwszy z nich polega na przyłączeniu enzymu do matrycy DNA związanej ze starterem, następnie powstały kompleks asocjuje odpowiednie dNTP (trifosforany deoksyrybonukleotydów) w wyniku ataku nukleofilowego końca 3'OH startera na atom fosforu nukleotydu, a ostatni etap prowadzi do powstania wiązania fosfodiesterowego i uwolnieniu pirofosforanu (PPi) (21).

Pierwszy etap, czyli przyłączenie polimerazy DNA do matrycy DNA zhybrydowanej ze starterem, wymusza i aktywuje zmianę konformacji subdomeny kciuka i ściśle dopasowanie się do cząsteczki DNA. Subdomena kciuka obraca się względem subdomeny śródreżca, a zakonserwowane reszty aminokwasowe na szczycie kciuka wykonują przeciwległy skręt. W ten sposób polimeraza DNA oddziałuje z małym rowkiem DNA, co odbywa się za pośrednictwem odpowiednio wygiętej subdomeny kciuka. Wszystko to sprawia, że trzy zasady w obrębie startera ulegają wygięciu i cząsteczka DNA znajduje się wystarczająco blisko centrum aktywnego enzymu. Wzmocnienie wygięcia nici DNA możliwe jest dzięki kolejnym interakcjom z polimerazą DNA. Tym razem subdomena śródreżca determinuje rotację dwóch pierwszych zasad

matrycy DNA o odpowiednio 90° i 180° , obracając w ten sposób zasady na zewnątrz helisy i tworząc konformację w kształcie litery S. Ta konformacja jest indukowana przez oddziaływanie DNA z subdomeną kciuka, śródreżca oraz interakcją matrycy DNA z centrum aktywnym enzymu (21).

Istotna w mechanizmie działania polimerazy DNA jest również kolejna zmiana konformacyjna, zachodząca wewnątrz enzymu na etapie wiązania dNTP. Polega ona na tworzeniu konformacji „zamkniętej” (rysunek 3), co dokonuje się w wyniku obrotu strukturalnych elementów wewnątrz subdomeny palców w kierunku końca 3'. Wtedy też zasady matrycy DNA ulegają ponownej rotacji do wnętrza helisy i w ten sposób formują się pary zasad na matrycy DNA. Analiza kinetyczna powyższej reakcji z użyciem polimerazy DNA wskazuje, że najszybszym etapem jest powstawanie kompleksu enzym-matryca DNA, natomiast za etap opóźniający i determinujący szybkość działania polimerazy DNA w reakcji syntezy nici uznawana jest zmiana konformacji kompleksu w celu przyłączenia nukleotydu (21).

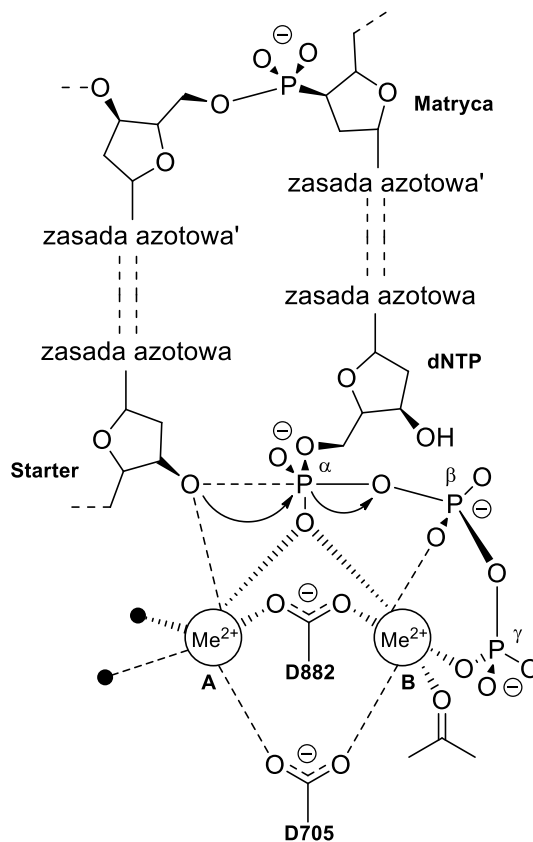


Rysunek 3. (a) Konformacja zamknięta oraz (b) otwarta kompleksu *TaqStoffel* z matrycą DNA. DNA matrycowe zostało oznaczone kolorem niebieskim, starterowe czerwonym (22)

Niebagatelny w uzyskaniu aktywności katalitycznej przez polimerazę DNA jest udział w środowisku reakcji dwuwartościowych jonów metali. Najpowszechniej stosowane są jony magnezu. Wieloletnie badania pozwoliły na wskazanie uniwersalnego mechanizmu działania zarówno polimerazy DNA, polimerazy RNA, jak i innych egzonukleaz (23). Zaproponowany przez Toma Steitz'a mechanizm zwany jest mechanizmem zależnym od dwóch jonów metalu (ang. *two-metal ions mechanism*), co obrazuje rysunek 4 (24).

Opiera się on na nukleofilowym ataku grupy 3' hydroksylowej nukleotydu odcinka starterowego DNA na grupę α -fosforanową dNTP i w konsekwencji uwolnieniu pirofosforanu (PPi). Na przykładzie fragmentu Klenowa polimerazy DNA I *E. coli* Steitz wskazuje, że oba jony Mg^{2+} są oktaedrycznie skoordynowane przez grupy fosforanowe przyłączanego nukleotydu oraz łańcuchy boczne reszt aminokwasowych znajdujących się w centrum aktywnym enzymu. Rysunek 3 wskazuje, że jon metalu A oddziałuje

z atomami tlenu należącymi do grup karboksylowych reszt kwasu asparaginowego D882 i D705, grupy hydroksylowej startera DNA, dwóch cząsteczek wody oraz grupy α -fosforanowej. Jon magnezu B stabilizowany jest przez sześć atomów tlenu należących do grupy α -, β - i γ -fosforanowej i trzy grupy pochodzące z reszt aminokwasowych: dwie grupy karboksylowe z kwasu asparaginowego i grupa karbonylowa z reszty tyrozyny (25).



Rysunek 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez polimerazę DNA I *E. coli*. Mechanizm zależny od dwóch jonów metalu z uwzględnieniem reszt aminokwasowych D882, D705 występujących w centrum aktywnym fragmentu Klenowa polimerazy DNA I *E. coli* (25). Opis w tekście

Atak nukleofilowy możliwy jest dzięki zwiększeniu ładunku dodatniego na atomie fosforu (dzięki oddziaływaniu jonu magnezu A z grupą fosforanową) oraz obniżeniu pKa (stałej dysocjacji kwasu) grupy 3'OH odcinka starterowego DNA (dzięki oddziaływaniu jonu metalu A z atomem tlenu tej grupy), co prowadzi do deprotonowania i wygenerowania centrum nukleofilowego 3'O⁻. Atak cząsteczki nukleofilowej na grupę fosforanową α w dNTP umożliwia wbudowanie kolejnego nukleotydu do łańcucha DNA, a oddysocjowanie grup β - i γ - fosforanowych jest możliwe dzięki aktywności jonu magnezu B (25).

2. Termostabilne polimerazy DNA

2.1 Charakterystyka termostabilnych polimeraz DNA

Organizmy termofilne oraz hipertermofilne stanowią potencjalne źródło enzymów pożądaných w różnych gałęziach przemysłu, dzięki swojej wysokiej stabilności w wysokich temperaturach. Przykładem białek o szerokim zastosowaniu są termostabilne polimerazy DNA, których optymalna aktywność osiągnięta jest w temperaturze powyżej 70°C, a wiele z nich zachowuje swoją aktywność nawet powyżej 100°C (26). Budowa termostabilnych polimeraz DNA różni się od ich odpowiedników pochodzenia mezofilnego. Struktura ich jest sztywniejsza i bardziej upakowana. Stabilność α -helis jest zapewniona m.in. przez zmniejszoną zawartość takich reszt aminokwasowych jak izoleucyna czy walina, które w znacznym stopniu przyczyniają się do występowania przestrzennych naprężeń. W enzymach tych zaobserwowano znaczne zwiększenie oddziaływań, takich jak: oddziaływania jonowe, van der Waalsa czy hydrofobowe, które również mają istotny wpływ na wzrost termostabilności białek. W technikach biologii molekularnej czy inżynierii genetycznej najczęściej korzysta się z termostabilnych polimeraz DNA pochodzenia bakteryjnego: *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Bacillus stearothermophilus* lub z archeonów tj.: *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*. Główne zastosowanie tych polimeraz DNA to amplifikacja fragmentów DNA z udziałem techniki PCR oraz sekwencjonowanie DNA (27).

2.2 Przykłady termostabilnych polimeraz DNA

2.2.1 Bakteryjne polimerazy DNA

Najpowszechniej używaną polimerazą DNA pochodzenia bakteryjnego jest wyizolowana z *Thermus aquaticus* polimeraza Taq. Ten odkryty w 1976 roku enzym, który zrewolucjonizował oblicze biologii molekularnej, zbudowany jest z 832 reszt aminokwasowych o masie molekularnej 94 kDa (28). Warto zauważyć, że jego najwyższa aktywność osiągnięta jest w temperaturze od 72°C do 80°C. Polimeryzacja możliwa jest dzięki przyłączeniu DNA do centrum aktywnego enzymu, w którym najistotniejsze reszty aminokwasowe to Arg682, Lys785, Tyr766, Arg821, His811 (19).

Polimeraza DNA Taq posiada trzy domeny: egzonukleolityczną 5'→3', nieaktywną egzonukleolityczną 3'→5' oraz polimeryzacyjną 5'→3'. Delecja domeny egzonukleolitycznej np. u polimerazy DNA Taq, pozwala na uzyskanie funkcjonalnego białka, ale o częściowo zmienionych cechach w stosunku do enzymu natywnego. Pozbawiona aktywności 5'→3' egzonukleazy polimeraza DNA Taq Δ 289 (TaqStoffel, KlenTaq) charakteryzuje się zwiększoną termostabilnością, nieco zwiększonym zapotrzebowaniem na jony Mg²⁺, natomiast nowo zsyntetyzowana nić DNA obdarzona jest mniejszą liczbą błędów (21) (30).

Badania polegające na otrzymaniu polimerazy DNA z delecją kolejnych reszt aminokwasowych z N-końca wykazały, że krytyczne dla zachowania optymalnej

termostabilności i aktywności reszty aminokwasowe znajdują się w regionie od 303 do 335. Struktura krystalograficzna enzymu wykazuje, że reszty aminokwasowe z tego obszaru formują trzy β -kartki oddziałujące z pozostałą częścią enzymu (29).

Najmniej termostabilnym enzymem spośród polimeraz DNA I jest polimeraza wyizolowana z bakterii *Bacillus stearothermophilus*. Enzym ten osiąga najwyższą aktywność w temperaturze 65°C, a maksimum temperaturowe wynosi 70°C, natomiast inaktywacji ulega już w 75°C w czasie 15 minut. Polimeraza ta nie posiada domeny odpowiedzialnej za aktywność 3'→5' egzonukleolityczną. W celach komercyjnych powstała rekombinantowa polimeraza DNA IsoTherm™, zawierająca aktywność 3'-5' egzonukleolityczną (31).

Polimeraza DNA *Thermus thermophilus* wykazuje duże podobieństwa strukturalne do polimerazy DNA Taq. Posiada ona zbliżoną masę molekularną, wynoszącą ok. 94 kDa z nieco dłuższą sekwencją aminokwasową (843 reszty aminokwasowe) niż polimeraza DNA Taq. Ich sekwencje aminokwasowe wykazują niezwykle wysoki stopień podobieństwa. Polimeraza DNA Tth posiada analogiczną trójdomenową budowę w stosunku do polimerazy DNA Taq, a mianowicie domeny: 5'→3' egzonukleolityczną, polimeryzacyjną oraz nieaktywną 3'→5' egzonukleolityczną. W przeciwieństwie do polimerazy DNA Taq posiada aktywność odwrotnej transkryptazy i w odpowiednich warunkach potrafi syntezować cDNA (19) (32).

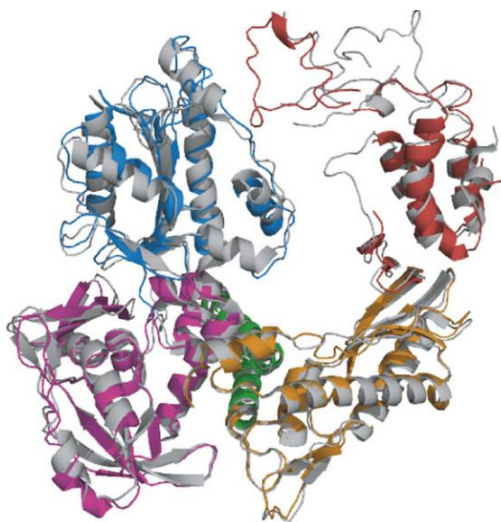
Największą masę molekularną z powyżej wymienionych polimeraz DNA posiada polimeraza pochodząca z bakterii *Thermotoga maritima* (96 kDa). Jako rekombinantowy enzym o masie 70 kDa z domeną 3'→5' i 5'→3' egzonukleazy jest komercyjnie dostępna pod nazwą Ultima (Perkin Elmer, USA). Polimeraza ta najwyższą aktywność osiąga w temperaturze 65°C – 75°C, charakteryzuje się także dużą wrażliwością na obecność soli potasowych i sodowych, a także niską odpornością na inhibitory z próbek klinicznych (głównie hem, laktoferynę, sole żółciowe, mocznik) i środowiskowych (33).

2.2.2 Polimerazy DNA z archeonów

Jedną z najlepiej znanych polimeraz DNA, pochodzących z Euryarcheota i wykorzystywanych w biologii oraz diagnostyce molekularnej jest polimeraza DNA Pfu z *Pyrococcus furiosus*. Jej struktura przypomina pierścień, na który składają się domena 3'→5' egzonukleazy oraz domena polimeryzacyjna zbudowana z subdomeny śródrezcza, palców i kciuka (rysunek 5) (34).

Aktywność polimeryzacyjna oraz korektorska polimeraz DNA archeonów jest związana z pętlą w domenie odpowiedzialnej za aktywność egzonukleolityczną. Jest to element silnie zakonserwowany i występujący wyłącznie u tej grupy mikroorganizmów. Reszty aminokwasowe budujące pętlę oddziałują z dodatnio naładowaną krawędzią subdomeny kciuka i umożliwiają wiązanie końca 3' ssDNA do centrum aktywnego enzymu (34). Polimeraza DNA Pfu charakteryzuje się wysoką procesywnością i wiernością replikacji DNA, co związane jest z obecnością domeny korektorskiej 3'→5' egzonukleazy. Jej termostabilność znacznie przewyższa bakteryjną polimerazę DNA Taq, gdyż czas jej półtrwania wynosi prawie 3 h w 100°C. Ponadto wykazuje większą procesywność i rzadziej popełnia błędy w trakcie syntezy (35).

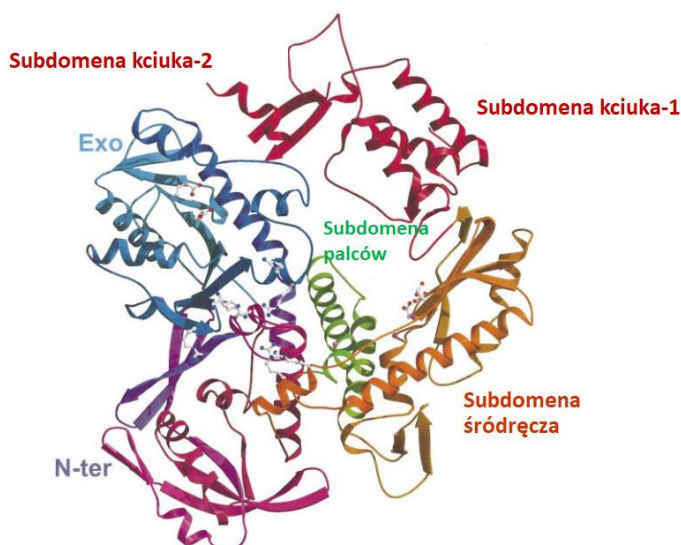




Rysunek 5. Struktura czwartorzędowa polimerazy DNA Pfu składa się z domeny egzonukleazy (kolor niebieski), domeny N-końcowej (kolor fioletowy) oraz trzech subdomen: śródścza (kolor pomarańczowy), palców (kolor zielony), kciuka (kolor czerwony) (34)

Polimeraza DNA KOD1 wyizolowana została z hipertermofilnego archeona *Thermococcus kodakaraensis*. Enzym ten jest polimerazą DNA z grupy B, posiadającą aktywność egzonukleolityczną 3'→5' (korektorską) i wykazuje 79% identyczność w obrębie sekwencji aminokwasowej z polimerazą DNA Pfu. Polimeraza DNA KOD1 w stosunku do polimerazy DNA Pfu charakteryzuje się 10-15-krotnie wyższą procesywnością i wyższą wydajnością amplifikacji DNA w reakcji PCR. Częsteczką polimerazy DNA KOD1 również posiada kształt pierścienia, jednak podstawowa różnica w strukturze trzeciorzędowej to unikalna obecność dwóch jednostek budujących subdomenę kciuka (rysunek 6) (10).

Wysoce termostabilną polimerazą DNA jest również polimeraza DNA, pochodząca z hipertermofilnego archeona *Thermococcus gorgonarius* (Tgo). Zakres temperatur, w których możliwy jest wzrost tego mikroorganizmu wynosi od 55°C do 98°C. Przystosowanie enzymu do wysokich temperatur związane jest przede wszystkim z obecnością zwiększonej ilości β -krotek połączonych wiązaniami wodorowymi. Co więcej, w strukturze obecne są dwa mostki disiarczkowe, stabilizujące strukturę oraz zwiększona ilość naładowanych reszt aminokwasowych. Warto zaznaczyć, że centrum aktywne (CA) polimerazy DNA Tgo wykazuje duże zakonserwowanie wśród polimeraz DNA rodziny B. CA zbudowane jest z β -krotki oraz dwóch α -helis, wśród których ściśle zakonserwowane kwaśne reszty aminokwasowe (E578, E580) nadają jej unikalne właściwości wiązania jonów Mn^{2+} oraz Zn^{2+} (36).



Rysunek 6. Struktura polimerazy DNA KOD1. Poszczególne domeny i subdomeny oznaczono kolorami: domena egzonukleolityczna (Exo - niebieski), koniec N-terminalny (N-ter - fioletowy), subdomena palców (zielony), śródreżcza (pomarańczowy), kciuka (czerwony) z uwzględnieniem jednostki kciuk-1 oraz kciuk-2 (10)

Porównanie polimeraz DNA termostabilnych KOD1, Pfu oraz Taq przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Właściwości wybranych termostabilnych polimeraz DNA z archeonów: *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1) oraz bakteryjnej polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (Taq) (35)

Właściwości	Polimerazy DNA		
	KOD1	Pfu	Taq
Masa cząsteczkowa [kDa]	90	90,1	93,9
Optymalna temperatura aktywności enzymu [°C]	75	75	75
Optymalne pH aktywności enzymu (w temp. 75°C)	6,5	6,5	8,0 – 8,5
Czas półtrwania	95°C, 12 h; 100°C, 3 h	95°C, 6 h; 100°C, 2,9 h	95°C, 1,6 h
Aktywność 3'-5' egzonukleazy	+	+	-
Aktywność 5'-3' egzonukleazy	-	-	+
Aktywność terminalnej transferazy	-	-	+
Procesywność [zasady]	>300	<20	b.d.
Stopień elongacji [nt/s]	106-138	25	61
Częstość popełnianych błędów [%]	0,47	1,27	7,91

Interesującym przedstawicielem polimeraz DNA z rodziny B pochodzącym z archeonów jest polimeraza DNA z *Nanoarchaeum equitans* (Neq). Posiada ona

domenę korektorską 3'-5' egzonukleazy co umożliwia amplifikację DNA z ok. 2-krotnie mniejszą ilością popełnianych błędów niż polimeraza DNA Taq oraz charakteryzuje się wyższą wydajnością w amplifikacji długich produktów PCR (37). Polimeraza DNA Neq jest jedynym przedstawicielem tej grupy, która katalizuje reakcję PCR w obecności dUTP i dITP. Analiza sekwencji domeny N-terminalnej polimerazy DNA Neq wykazała, że nie tworzy ona struktury kieszeni wiążącej uracylu (ang. uracil-binding pocket), która odpowiada za wiązanie deaminowanych zasad. Ponadto, badania genomu *N. equitans* wskazują na obecność pełnego zestawu enzymów naprawczych DNA, w tym UDG (glikozylazy DNA uracylu) i dUTPazy, mimo że jest to jeden z najmniejszych genomów liczący zaledwie 490885 pz (38). Brak kieszeni wiążącej uracylu w polimerazie DNA Neq tłumaczy się więc tym, że wierność, a tym samym integralność genomu zachowana jest dzięki obecności stosunkowo dużej ilości enzymów naprawczych w porównaniu do innych archeonów. Niska wrażliwość polimerazy DNA Neq na obecność uracylu czy hipoksantyny może mieć swoje zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce, gdzie mogłaby zastąpić polimerazę DNA Taq, która również jest niewrażliwa na uracylu, ale ogranicza ją niska wierność syntezy (37).

3. Technika PCR

Bardzo szerokie zastosowanie w biologii molekularnej, inżynierii genetycznej oraz diagnostyce molekularnej mają metody oparte o technikę PCR. Opracowana w 1983 roku przez K. Mullis łańcuchowa reakcja polimerazy DNA (ang. Polymerase Chain Reaction) pozwala w warunkach *in vitro* na powielenie fragmentu DNA do milionów kopii w bardzo krótkim czasie. Niezbędne do przeprowadzenia amplifikacji DNA są: termostabilna polimeraza DNA wraz z kofaktorem (sole magnezu), matryca DNA oraz startery komplementarne do niej, bufor zapewniający odpowiednie warunki pH oraz skład jonów i główne substraty reakcji – trifosforany deoksynukleozydów (dNTPs) (39). Początkowo w reakcji PCR stosowano polimerazę DNA z mezofilnej bakterii *E. coli*, co było niezwykle uciążliwe dla eksperymentatora. Ze względu na jej niską termostabilność konieczne było wielokrotne uzupełnianie mieszaniny reakcyjnej o ten enzym w trakcie trwania reakcji. Odkrycie termostabilnych polimeraz DNA, a przede wszystkim polimerazy DNA *Thermus aquaticus* zrewolucjonizowało podejście i zakres wykorzystania techniki PCR. Obecnie w stosowanych technikach amplifikacji kwasów nukleinowych wykorzystuje się termostabilne polimerazy DNA z dwóch rodzin A i B. Ta pierwsza to polimerazy DNA pochodzenia bakteryjnego, w tym przede wszystkim polimerazy DNA wyizolowane z *Thermus* i *Thermotoga*, z kolei typ B to enzymy pochodzące z archeonów *Thermococcus* i *Pyrococcus*. Wiele z tych polimeraz DNA jest obecnie komercyjnie dostępnych jako rekombinantowe białka produkowane w systemach ekspresji *E. coli* (40).

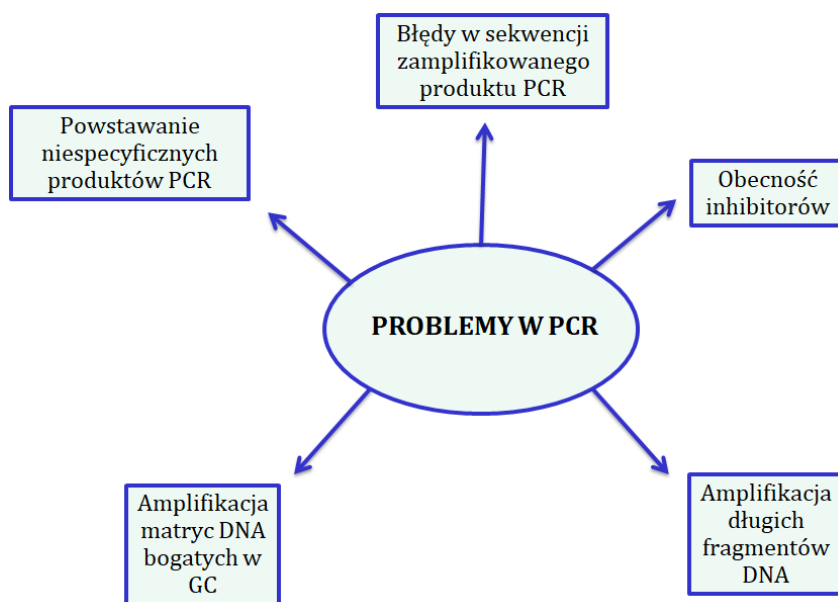
Reakcja PCR składa się z trzech podstawowych etapów, które występują po sobie w sposób cykliczny zapewniając w ten sposób wykładniczy przyrost ilości amplifikowanych fragmentów DNA. Dostępność matrycy DNA dla polimerazy DNA możliwa jest dzięki denaturacji dsDNA i uzyskaniu dwóch pojedynczych nici. *In vivo* odpowiadają za to helikazy, które wykorzystują energię z hydrolizy ATP, w warunkach

laboratoryjnych osłabienie wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami uzyskuje się podgrzewając mieszaninę reakcyjną do temperatury 92-98°C. Następny etap związany jest z przyłączeniem syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do matrycy DNA działających jako startery w reakcji PCR. W związku z tym, że polimerazy DNA (w przeciwieństwie do polimeraz RNA) nie mogą rozpocząć syntezy DNA *de novo*, sama dostępność do jednoniciowego kwasu nukleinowego im nie wystarcza i niezbędna jest obecność wolnych grup hydroksylowych na końcach 3' starterów. Temperatura przyłączania starterów mieści się w przedziale od 50°C do 70°C i zależna jest przede wszystkim od sekwencji nukleotydowej (składu zasad A, T, G, C) oraz długości starterów. Matryca DNA zhybrydyzowana z komplementarnym starterem zostaje wydłużona przez polimerazę DNA w ostatnim etapie reakcji, która prowadzona jest w temperaturze optymalnej dla danej polimerazy DNA (zazwyczaj 72°C). Na wykresie zależności przyrostu ilości produktów DNA od czasu, w trakcie następujących po sobie cyklach w reakcji PCR, wyróżnić można cztery podstawowe fazy:

- 1) faza wstępna to hybrydyzacja matrycy DNA z komplementarnym starterem oraz synteza pierwszych kopii fragmentów DNA (pierwsze dwa cykle to tzw. produkty I i II rzędowe o nieokreślonej długości, właściwe produkty PCR uzyskujemy dopiero w trzecim cyklu reakcji i dalszych);
- 2) faza wykładnicza reakcji jest pozytywnie skorelowana z ilością cząsteczek dostępnej matrycy DNA podczas amplifikacji;
- 3) faza logarytmicznego wzrostu następuje, gdy tempo przyrostu powielanego DNA obniża się;
- 4) faza stacjonarna (*plateau*), w której przyrost ilości amplifikowanego DNA ulega całkowitemu zatrzymaniu (39).

4. Problemy związane z amplifikacją DNA w reakcji PCR

Jednym z poważniejszych problemów w diagnostyce molekularnej jest amplifikacja DNA z próbek środowiskowych i klinicznych. Takie próbki posiadają liczne inhibitory, które mogą spowodować brak powielania DNA lub znaczne zmniejszenie wydajności samej reakcji PCR. Liczne problemy napotyka się również podczas amplifikacji długich fragmentów DNA, bogatych w pary GC lub tworzących struktury drugorzędowe. Komercyjnie dostępne, natywne polimerazy DNA nie zawsze są w stanie poradzić sobie z tymi problemami, dlatego też prowadzi się badania w kierunku poszukiwania nowych polimeraz DNA bądź modyfikuje się już istniejące. Rysunek 7 przedstawia podstawowe problemy z jakimi można spotkać się podczas amplifikacji DNA.



Rysunek 7. Schemat przedstawiający problemy, które można napotkać podczas przeprowadzania reakcji PCR [opracowanie własne]

4.1 Problemy związane z obecnością inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej

W zależności od rodzaju próbki, inhibitory mogą pochodzić bezpośrednio z badanego materiału (np. z krwi), bądź są pozostałością po procesie izolacji lub oczyszczania DNA. Inhibitory PCR to zarówno organiczne, jak i nieorganiczne związki, które hamują reakcję poprzez oddziaływanie z matrycą DNA lub polimerazą DNA wpływając na nią bezpośrednio (poprzez jej degradację lub blokowanie centrum aktywnego) bądź pośrednio (poprzez utrudnienie dostępu do kofaktora niezbędnego do pracy polimerazy DNA). Do badanych materiałów, w których problem inhibitorów jest największy, zalicza się m.in. próbki kliniczne (np. hemoglobina, laktoferyna, heparyna, immunoglobuliny G, mioglobina, kolagen, sole żółciowe), próbki środowiskowe (np. gleba, kwas humusowy, polisacharydy), czy próbki żywności (jony wapnia, laktoferyna) (41)(42).

4.2 Problemy związane z amplifikacją długich fragmentów DNA i matryc DNA bogatych w pary GC

Problemem wiążącym się z wydajnością i procesywnością polimerazy DNA jest amplifikacja długich fragmentów DNA oraz matryc DNA bogatych w pary zasad GC. Na zdolność amplifikacji długich fragmentów DNA ma wpływ przede wszystkim obecność domeny korektorskiej (3'→5' egzonukleazy), która odpowiedzialna jest za wierność syntezy. Taką domenę posiadają polimerazy DNA z hipertermostabilnych archeonów należących do rodziny B, np. polimeraza DNA Pfu. Wydajne amplifikowanie tego typu matryc DNA związane jest również z procesywnością polimeraz DNA i ich szybkością



syntezy co jest pewnym ograniczeniem dla tej grupy polimeraz. Interesującym rozwiązaniem tego problemu jest stosowanie mieszanek polimeraz DNA: pozbawionej aktywności egzonukleolitycznej, ale charakteryzującej się wysoką procesywnością polimerazy DNA z rodziny A (np. Taq lub TaqStoffel) i posiadającej zdolności korektorskie polimerazy DNA z rodziny B (np. Pfu). W przypadku wyżej wymienionej mieszaniny enzymów synteza DNA jest katalizowana za pomocą polimerazy DNA Taq występującej we względnie wysokim stężeniu w mieszaninie reakcyjnej, natomiast nić DNA z nieprawidłowo włączonymi przez nią nukleotydami, jest następnie naprawiana i wydłużana przez polimerazę DNA Pfu występującą w mieszaninie w znacznie niższym stężeniu (43) (44). Problematicznymi matrycami DNA stosowanymi w reakcjach PCR są również fragmenty DNA o dużej zawartości par zasad GC. Matryce DNA zawierające fragmenty bogate w guaninę i cytozynę stanowią problem podczas amplifikacji z powodu niepełnej denaturacji DNA i wymagają zastosowania wyższych temperatur na etapie denaturacji (do 98°C) lub specjalnych dodatkowych składników (np. DMSO), które obniżą temperaturę topnienia matrycy. W takim przypadku niezbędne jest zastosowanie wysoce termostabilnych polimeraz DNA (45).

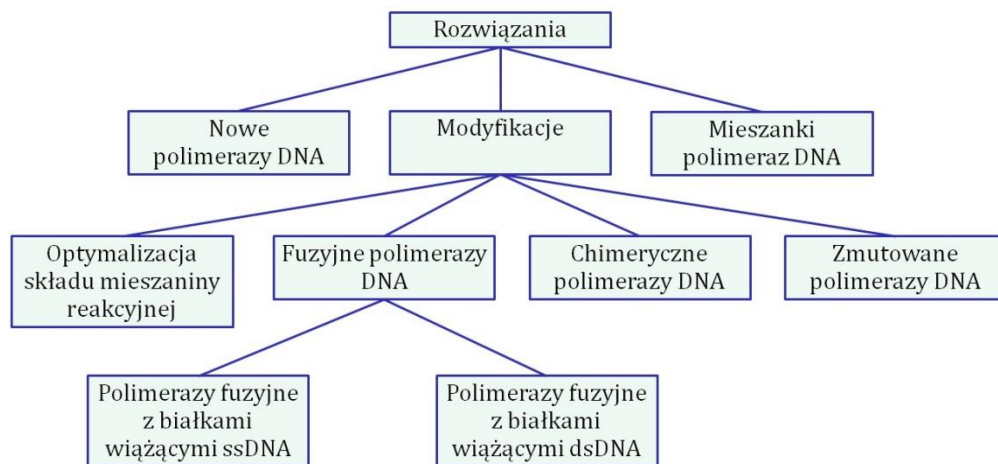
4.3 Problemy związane z powstawaniem niespecyficzných produktów PCR

W czasie przeprowadzania reakcji PCR często napotyka się na problem niespecyficzných produktów amplifikacji. Niektóre polimerazy DNA wykazują aktywność polimeryzacyjną już w temperaturze pokojowej, a nawet w 4°C. Podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej startery DNA mogą przyłączać się niespecyficznie do matrycy DNA, następnie są wydłużane przez polimerazę DNA, co w konsekwencji prowadzi do powstawania niespecyficzných fragmentów DNA. Aby uniknąć tego problemu stosuje się rozwiązanie typu „hot start”, w jednym z trzech wariantów. Pierwszy z nich polega na dodaniu jonów Mg^{2+} , gdy mieszanina reakcyjna w termocyklerze osiągnie temperaturę powyżej 70°C. Drugim rozwiązaniem jest stosowanie fizycznego rozdziału istotnych dla reakcji PCR składników poprzez zastosowanie kuleczek woskowych, w których zatopiony jest np. magnez lub polimeraza DNA. Kuleczki woskowe ulegają stopieniu w temperaturze powyżej 75°C i poszczególne składniki uwalniane są do mieszaniny reakcyjnej. Trzecim sposobem jest zastosowanie termolabilnych przeciwciał lub chemicznych grup blokujących polimerazę DNA, które w temperaturze denaturacji wstępnej, podczas reakcji PCR, ulegają odpowiednio zniszczeniu lub odłączeniu i enzym odzyskuje swoją aktywność (46).

4.4 Problemy związane z wiernością polimeraz DNA

Obecność mutacji w powstałym po amplifikacji produkcie PCR związana jest przede wszystkim z niską wiernością polimerazy DNA. Zdolności naprawcze polimeraz DNA zależą w dużym stopniu od obecności domeny egzonukleazy 3'→5', która zwiększa wierność replikacji DNA i zmniejsza częstość pojawiających się błędnie sparowanych zasad. Uzyskanie zamplifikowanego DNA pozbawionego mutacji jest szczególnie istotne w przypadku klonowania molekularnego (47).

Wymienione powyżej problemy z amplifikacją DNA w reakcji PCR mogą prowadzić do uzyskania fałszywie negatywnych wyników, niewłaściwej oceny jakości badanej próbki, a przede wszystkim znacznego obniżenia czułości reakcji. W związku z tym, że natywne polimerazy DNA często nie są w stanie podołać tym problemom, uzasadnione wydaje się ciągłe udoskonalanie znanych polimeraz DNA lub poszukiwanie nowych. Możliwe rozwiązania powyższych problemów przedstawiono na rysunku 8.



Rysunek 8. Sposoby rozwiązywania problemów w reakcji PCR ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji dotyczących polimeraz DNA [opracowanie własne]

5. Sposoby rozwiązywania problemów z reakcją PCR – modyfikacje w składzie mieszaniny reakcyjnej ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz DNA

Aby sprostać wymaganiom, jakie stawia nowoczesna diagnostyka, biologia molekularna czy inżynieria genetyczna, konieczne jest stworzenie optymalnych warunków działania dla polimeraz DNA. Dotychczas wprowadzane modyfikacje to przede wszystkim stosowanie udoskonalonych buforów (pod względem składu jonowego, pH), wzmacniaczy reakcji PCR oraz wprowadzanie mutacji w polimerazach DNA. Dzięki mutacjom możliwe jest uzyskanie enzymów o zwiększonej termostabilności i odporności na inhibitory z próbek klinicznych czy środowiskowych. Coraz bardziej popularne staje się modyfikowanie już znanych polimeraz DNA poprzez tworzenie fuzji tych enzymów z innymi białkami, które mogą wpływać na zwiększenie ich procesywności czy wierności syntezy.



5.1 Stosowanie wzmacniaczy, dodatkowych składników do reakcji PCR i udoskonalonych buforów

Podstawowym podejściem w poprawie działania enzymów jest opracowanie optymalnych dla nich warunków środowiska, które zapewnią polimerazie DNA zachowanie pełnej aktywności. Optymalizacja warunków buforowych to przede wszystkim odpowiednie pH reakcji, skład jonów i dodatkowych składników zwanych wzmacniaczami reakcji PCR. Składniki dodawane do mieszaniny 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 (wpływ na denaturację matrycy DNA, hybrydyzację starterów, aktywność stosowanej polimerazy DNA). Najpowszechniej stosowane dodatki i wzmacniacze reakcji PCR przedstawione zostały w tabeli 2.

Tabela 2. Najbardziej znane dodatki/wzmacniacze stosowane w reakcji PCR

Wzmacniacze PCR (stosowane stężenia)	Funkcja
DMSO (dimetylosulfotlenek) (2-10%)	zmniejsza oddziaływania międzycząsteczkowe, podczas hybrydyzacji rozplecionych nici DNA, struktura II- rzędowa jest uformowana luźniej przez co dostęp polimerazy DNA do struktur trudnodostępnych (zwłaszcza w przypadku rejonów bogatych w GC) jest zdecydowanie ułatwiony (48) (49)
Betaina (0,5-2 M)	związek organiczny o charakterze jonu obojnego, rola podobna do DMSO, zapobiega formowaniu się struktur II-rzędowych starterów, stabilizuje powstawanie kompleksu DNA-polimeraza (49) (50)
DTT (5-40 mM)	korzystnie wpływa na stabilność polimeraz DNA stosowanych w reakcji PCR (51)
Albumina (100 ng/50 µl)	wykorzystywana jest w reakcjach PCR dla próbek klinicznych, środowiskowych, lizatów komórkowych, stosowana również w przypadku trudnotopliwych matryc DNA dzięki zdolności utrzymywania nici DNA w formie zdenaturowanej (52)
Formamid (max 2,5%)	związek wspomagający denaturację DNA, stosowany w niskich stężeniach - hamuje powstawanie struktur II-rzędowych (53)
Detergenty niejonowe (0,1-1%)	np.: Triton, NP40 czy Tween; stabilizują polimerazę DNA oraz matrycę DNA, zmniejszają podatność na inhibicję wywołaną odczynnikami organicznymi obecnymi w próbce (54)
Glikol etylenowy (0,5-2 M)	działanie zbliżone do betainy, badania wskazują na zdecydowanie wyższą skuteczność (55)
Białka SSB	wpływają korzystnie na redukcję tworzonych dimerów starterów, stabilizują ssDNA zapobiegając niespecyficznemu hybrydyzacji, zwiększają efektywność i wydajność amplifikacji DNA (56)(57)(58)(59)(60)

5.2 Wprowadzanie zmian w genach kodujących polimerazy DNA

W celu nadania enzymom nowych cech, niespotykanych w natywnych odpowiednikach, ich geny poddaje się zazwyczaj mutacjom w procesie spontanicznej lub ukierunkowanej mutagenezy.

Mutageneza przypadkowa polega na ekspozycji danego mikroorganizmu na działanie fizycznych lub chemicznych mutagenów tj.: promieniowania UV, promieniowania jonizującego czy związków alkilujących. Przypadkowe mutacje wprowadzać można również z wykorzystaniem technik PCR. Najpopularniejszymi metodami są: tasowanie DNA (ang. DNA shuffling), wykorzystanie szczepów mutatorowych oraz technika PCR z zastosowaniem polimerazy DNA wprowadzającej błędnie sparowane zasady. Pierwsza z metod polega na zastosowaniu enzymu DNAzy I do pocięcia nici DNA (kodującej dane białko, które ma zostać poddane modyfikacji) na fragmenty o długości od 50 do 100 pz, a następnie przeprowadzeniu reakcji PCR bez użycia starterów. Uzyskane w wyniku cięcia fragmenty DNA łączą się na zasadzie komplementarności, a polimeraza DNA uzupełnia brakującą sekwencję pomiędzy nimi. W wyniku tak przeprowadzonej reakcji powstają przypadkowe mutacje, które po kilku cyklach amplifikacji są utrwalone. Zmutowany gen ponownie poddaje się amplifikacji techniką PCR, tym razem ze starterami komplementarnymi do początku i końca genu kodującego zmodyfikowaną polimerazę DNA oraz umożliwiającymi wklonowanie go do wektora ekspresyjnego (61).

Kolejną techniką uzyskania mutacji przypadkowej jest wspomniane już wykorzystanie szczepów mutatorowych (ang. Mutator strains), które są pozbawione jednego lub kilku szlaków naprawy DNA (mutanty *mutS*⁻, *mutD*⁻ lub *mutT*⁻). Szczep ten zostaje poddany transformacji plazmidem z wklonowanym genem polimerazy DNA, którą chcemy zmodyfikować. Brak systemu naprawczego w komórce bakteryjnej spowoduje pojawienie się przypadkowych mutacji w materiale genetycznym, w tym również w genie na plazmidzie. Wadą tej metody jest to, że zmodyfikowany szczep *E. coli* szybko traci żywotność, ponieważ geny kodujące białka odpowiedzialne za podstawowe funkcje życiowe również ulegają mutacjom, przez co mogą powstawać niefunkcjonalne białka (61a).

Trzecia metoda wykorzystuje również technikę PCR, ale stosowana w niej polimeraza DNA cechuje się obniżoną wiernością replikacji (ang. error prone PCR). Dodatkowo, zastosowanie zmodyfikowanego, nieoptymalnego dla polimerazy DNA buforu reakcyjnego sprzyja wprowadzaniu przypadkowych mutacji do nowo zsyntezowanej nici DNA. Kontrolowanie składu mieszaniny reakcyjnej pozwala na regulowanie częstości wprowadzanych błędów (najczęściej około 1-3 zmiany na 1 kbp) (62).

Mutacje ukierunkowane wykorzystują reakcję PCR, dzięki której zmiany w sekwencji nukleotydowej mogą być wprowadzane w sposób kontrolowany. W takich technikach stosuje się zmodyfikowane startery, które posiadają niekomplementarne do matrycy DNA nukleotydy, wprowadzając w ten sposób pożądaną mutację (63)(64).

Mutagenezie najczęściej poddawana była polimeraza DNA TaqS, która należy do najpowszechniej stosowanych polimeraz DNA w diagnostyce molekularnej i inżynierii genetycznej. Mutacje wprowadzano w obszarze silnie zakonserwowanym

ewolucyjnie regionie O-helix. Jest to obszar składający się z dwunastu reszt aminokwasowych od 659 do 671, 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: Arg659, Lys663, Phe667 i Tyr671 prowadzą do znacznego obniżenia wierności replikacji przez polimerazę DNA Taq, przy czym zmiana Phe667 na Tyr powoduje częstsze włączanie dideoksyrybonukleotydów do nowo syntetyzowanej nici DNA. Zjawisko to jest pożądanym w technikach sekwencjonowania metodą Sangera. Uzyskanie enzymów o obniżonej wierności replikacji znajduje swoje zastosowanie także w technikach mutagenazy metodą „error prone PCR” (65)(66).

Zmiany w sekwencji aminokwasowej enzymu w pozycjach Glu742 i Ala743 w subdomenie palców, okazują się być bardzo istotne dla powinowactwa polimerazy DNA do matrycy. Badania sugerują, że jest to miejsce krytyczne dla zdolności enzymu do syntezy (elongacji) DNA. Różne warianty wprowadzonych mutacji zwiększały powinowactwo enzymu do DNA oraz wpływały na szybkość wydłużania starterów w porównaniu z polimerazą niezmodyfikowaną. Mutacje w tej subdomenie mogą stanowić potencjał do otrzymywania polimeraz DNA o polepszonej procesywności, wydajności i szybkości reakcji (67).

Wraz ze wzrostem popularności techniki PCR pojawiła się potrzeba korzystania z polimeraz DNA niewrażliwych na ewentualne inhibitory. Pierwsze pozytywne rezultaty, które finalnie skutkowały wdrożeniem nowego produktu dotyczyły modyfikacji polimerazy DNA Taq. Przetestowano wiele mutantów i wśród nich wyselekcjonowano te o najwyższym potencjale aplikacyjnym. Odznaczały się one zwiększoną odpornością na inhibitory zawarte w krwi względem form natywnych i umożliwiały wydajne otrzymywanie amplikonów nawet przy 20% stężeniu krwi w mieszaninie reakcyjnej. Mutacji dokonywano w rejonie palców cynkowych w pozycji 708 i 707. Mutacja w pozycji 708 gwarantowała odporność na inhibitory z krwi. Kwas glutaminowy występujący w tej pozycji w natywnej polimerazie DNA został wymieniony na walinę, lizynę, leucynę lub tryptofan (68).

Zmiany w obrębie reszt aminokwasowych 706, 707, 708 mogą doprowadzić do powstania polimerazy DNA tzw. „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 (68).

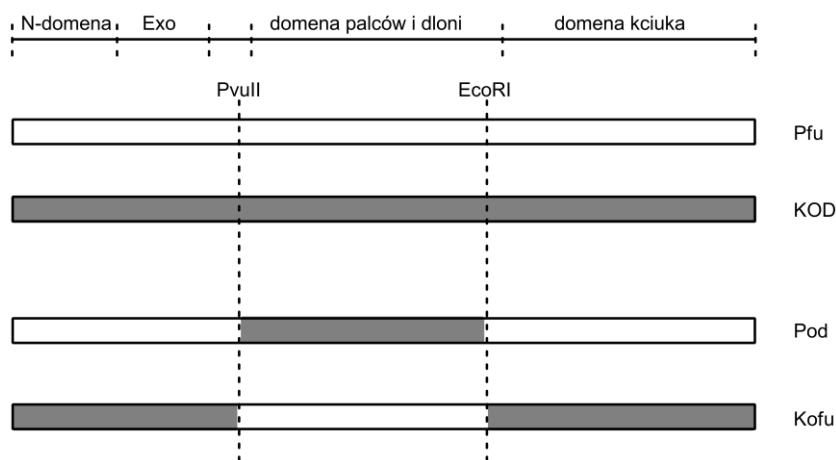
5.3 Tworzenie chimerycznych polimeraz DNA

Chimeryczne polimerazy DNA to białka, których sekwencja aminokwasowa złożona jest z sekwencji pochodzących z co najmniej dwóch odrębnych białek. Kowalencyjne połączenie tych sekwencji na drodze zastosowania technik inżynierii genetycznej prowadzi do ekspresji genu kodującego funkcjonalne, chimeryczne białko (69). Przykładem takiej modyfikacji jest chimeryczna, bakteryjna polimeraza DNA, która powstała w wyniku połączenia sekwencji aminokwasowych, polimerazy DNA I z *T. thermophilus* (Tth) i polimerazy DNA I z *T. aquaticus* (Taq). 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 DNA Tth-Taq składa się z części N-końcowej polimerazy DNA Tth (4 – 600 reszty aminokwasowej) i C-końcowej pochodzącej z polimerazy DNA Taq (556 – 834 reszty aminokwasowej)(69). Polimeraza DNA Tth-Taq charakteryzuje się pożądanymi cechami zarówno polimerazy DNA Tth jak i polimerazy DNA Taq i wykazuje wysoką wydajność amplifikacji długich fragmentów DNA. Wydajność amplifikacji chimerycznego enzymu jest co najmniej pięciokrotnie wyższa niż w przypadku polimerazy DNA Taq i porównywalna z polimerazą DNA Tth, równocześnie wzrosła co najmniej sześciokrotnie wrażliwość na niedopasowanie nukleotydu na końcu 3' startera w porównaniu do polimerazy DNA Tth. Specyficzność reakcji amplifikacji DNA jest znacznie większa niż przy użyciu polimerazy DNA Tth oraz porównywalna z polimerazą DNA Taq (69).

Innymi przykładami chimerycznych polimeraz DNA są enzymy Kofu i Pod, które zostały otrzymane poprzez wymianę domen między polimerazami DNA KOD1 (*T. kodakarensis*) i Pfu (*P. furiosus*). W przypadku polimerazy DNA Kofu domeny: N-końcowa, egzonukleazy i C-końcowa subdomena kciuka pochodzą z polimerazy DNA KOD1, natomiast subdomeny śródścza i palców z polimerazy DNA Pfu (rysunek 9). Takie modyfikacje powodują, że polimeraza DNA Kofu charakteryzuje się podobną do polimerazy DNA KOD1 szybkością syntezy DNA (106-138 nt/s), procesywnością (~300nt) i termostabilnością, natomiast wierność replikacji jest zbliżona do polimerazy DNA Pfu ($2,0 \times 10^{-6}$). Polimeraza DNA Pod jest odwrotnym do wyżej opisanej połączeniem polimeraz DNA Pfu i KOD1 (część N-końcowa, egzonukleazy i C-końcowa subdomena kciuka pochodzą z polimerazy DNA Pfu, natomiast subdomeny śródścza i palców z polimerazy DNA KOD1). Ta polimeraza charakteryzuje się szybkością syntezy DNA (25 nt/s), procesywnością (>20 nt) i termostabilnością podobną do polimerazy DNA Pfu, natomiast wierność replikacji jest podobna do polimerazy DNA KOD1 ($4,45 \times 10^{-6}$) (70).



Rysunek 9. Schematyczny rozkład domen w chimerycznych polimerazach DNA Pod oraz Kofu; opracowanie własne na podstawie Faurholm i współpracownicy (70)

Kolejnym przykładem chimerycznej polimerazy DNA jest enzym, który powstał w wyniku wymiany domen pomiędzy polimerazami DNA 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 DNA Taq. W obrębie tego regionu mieści się domena egzonukleazy 5'→3', której aktywność jest obniżona 1000-krotnie przez mutację Gly46Asp. Region C-końcowy złożony jest z reszt aminokwasowych od 191 do 893 pochodzących z polimerazy DNA Tma i obejmuje on między innymi domenę egzonukleazy 3'→5', która jest wyłączona poprzez wprowadzenie mutacji punktowych Asp323Ala i Glu325Ala. Oprócz wymienionych powyżej modyfikacji, polimeraza DNA posiada też mutację Phe730Tyr, która powoduje, że enzym ten chętniej włącza dideoksynukleotydy do nowo syntetyzowanej nici DNA (71). Enzym taki jest bardzo dobrym narzędziem w technikach sekwencjonowania DNA metodą Sangera (27). Taka chimeryczna polimeraza DNA pozwala na uzyskanie ujednoliconej wysokości pików sekwencjonowania DNA co jest niezwykle istotne w reakcji sekwencjonowania cyklicznego, obniża szybkość pirofosforolizy znakowanych barwnikami ddNTPs oraz poprawia wprowadzanie dITP (71).

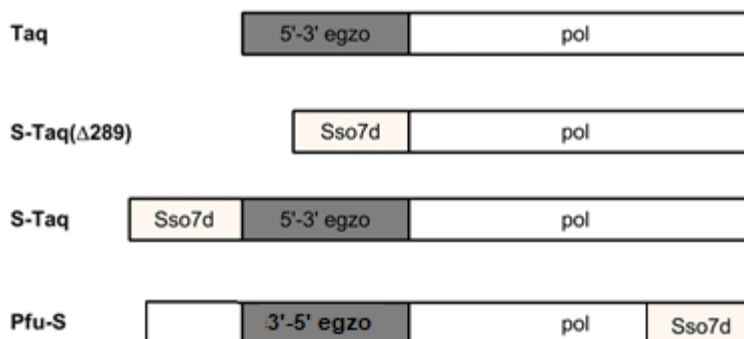
5.4 Tworzenie fuzyjnych polimeraz DNA

Ważnym etapem w działaniu polimerazy DNA, mającym wpływ na końcową wydajność reakcji syntezy jest proces inicjacji, związany z przyłączeniem się enzymu do matrycy DNA. Dlatego też uzasadnione jest modyfikowanie znanych polimeraz DNA w celu ułatwienia im przyłączania się do nici DNA poddawanej polimeryzacji. Przykładem takiej modyfikacji może być tworzenie fuzyjnych polimeraz DNA z białkami, które posiadają naturalną zdolność wiązania jedno- lub dwuniciowego DNA. W literaturze spotkać można zaledwie kilka przykładów takich fuzyjnych polimeraz DNA (3).

5.4.1 Fuzja z białkiem wiążącym dwuniciowe DNA

Jedynym białkiem wiążącym dwuniciowe DNA wykorzystanym w tworzeniu fuzyjnych polimeraz DNA jest białko Sso7d. Jest to białko pochodzące z hipertermofilnego archeona *Sulfolobus solfataricus*, posiada ono niewielką masę cząsteczkową (około 7 kDa), a w roztworze występuje jako monomer (72). Wang wraz z współpracownikami (73) przeprowadził fuzję tego białka z polimerazą DNA Taq, TaqStoffel oraz polimerazą DNA Pfu i porównał procesywność zmodyfikowanych polimeraz DNA z polimerazami natywnymi. W przypadku fuzji z polimerazami DNA Taq oraz TaqStoffel białko Sso7d dołączono bezpośrednio do N-końca polimerazy DNA natomiast w polimerazie DNA Pfu białko Sso7d dołączono do C-końca enzymu za pomocą linkera składającego się z trzech aminokwasów: Gly – Thr – His. Badane warianty przedstawiono na rysunku 10. Wstępne badania wskazały, że natywna polimeraza DNA Taq charakteryzuje się większą procesywnością niż polimeraza DNA z delecją domeny egzonukleolitycznej 5'→3' (TaqStoffel). Zastąpienie domeny egzonukleolitycznej 5'→3' białkiem Sso7d doprowadziło do wzrostu procesywności w stosunku do polimerazy DNA bez fuzji. Ponadto zauważono, że polimeraza DNA Taq

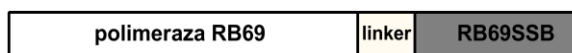
natywna z dodatkowym białkiem fuzyjnym (S-Taq) przewyższa procesywnością fuzyjną polimerazę DNA z delecją domeny egzonukleolitycznej 5'→3' (S-Taq(Δ 289)). W przypadku polimerazy DNA Pfu również obserwowano zwiększenie procesywności białka fuzyjnego w porównaniu z natywnym. Ogólny wzrost procesywności we wszystkich przeprowadzonych fuzjach wyniósł od 5 do 17 razy w odniesieniu do odpowiednich polimeraz DNA natywnych, przy czym warto zwrócić uwagę, że polimeraza DNA Pfu, pochodząca z archeona, jest przedstawicielem zupełnie innej rodziny niż bakteryjna polimeraza DNA Taq. W przypadku obu fuzji obserwujemy wzrost procesywności co może wskazywać na uniwersalność stosowanej modyfikacji bez względu na typ użytej polimerazy DNA (73). 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 zauważono znaczny wzrost procesywności i wydajności polimerazy DNA bez negatywnego wpływu na działanie katalityczne czy zmianę stabilności enzymu (74). Z białkiem Sso7d połączona została również polimeraza DNA KOD1. Fuzja polimerazy DNA z białkiem wiążącym dwuniciowe DNA prowadzi do zwiększenia wydajności i procesywności polimerazy DNA w stosunku do natywnej polimerazy DNA KOD1 bez znacznego wpływu na termostabilność otrzymanej polimerazy DNA (75).



Rysunek 10. Schemat lokalizacji domen w polimerazie DNA Taq oraz fuzyjnych polimerazach DNA z białkiem Sso7d (73)

5.4.2 Fuzja z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA

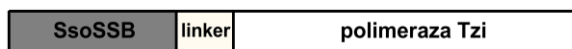
W literaturze odnaleźć można również przykład fuzji polimerazy DNA z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA. Polepszenie cech enzymu przedstawione jest na przykładzie polimerazy DNA bakteriofaga RB69 w połączeniu z jego rodzimym białkiem SSB. RB69SSB to niewielkie, monomeryczne białko, które odgrywa istotną rolę w prawidłowej replikacji DNA tego bakteriofaga. W tym przypadku białko dołączono do C-końca polimerazy DNA za pośrednictwem sześćoaminokwasowego linkera: Gly – Thr – Gly – Ser – Gly – Thr (rysunek 11) (76).



Rysunek 11. Schematyczna budowa fuzyjnej polimerazy DNA 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 DNA. Pomaga to uniknąć ewentualnej zawady sterycznej, co może być istotne w procesie przyłączania DNA i jego amplifikacji. Uzyskana fuzyjna polimeraza DNA wykazywała korzystniejsze cechy z punktu widzenia zastosowania jej w diagnostyce medycznej czy biologii molekularnej. Nowa polimeraza DNA wykazywała 6-krotnie wyższe powinowactwo do matrycy DNA oraz 7-krotnie lepszą procesywność przy zachowaniu dotychczasowej wierności. Co więcej, zwiększyła się jej zdolność do amplifikacji dłuższych fragmentów DNA (76).

W europejskim patencie (77), zawarty został opis polimerazy DNA, pochodzącej z *Thermococcus zilligi* w fuzji z białkiem SSB *Sulfolobus solfataricus*. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, jest to niewielkie białko (18 kDa) wiążące jednoniciowe DNA, które wykazuje aktywność jako monomer, ale posiada także zdolność multimeryzacji w roztworze (78). Fuzja z tym białkiem została przeprowadzona w nieco odmienny sposób niż w przypadku wcześniej opisanym (rysunek 12).



Rysunek 12. Schematyczna budowa fuzyjnej polimerazy DNA Tzi z białkiem SsoSSB [opracowanie własne]

Białko SSB znajduje się na N-końcu polimerazy DNA, a użyty linker posiada odmienną sekwencję aminokwasową: Gly – Ser – Gly – Gly – Val – Asp. Badania przeprowadzone na zmodyfikowanej polimerazie DNA wskazują na znaczne zwiększenie jej wydajności, wierności oraz procesywności w stosunku do natywnej polimerazy DNA Tzi (77).

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

6. Zastosowanie natywnych i zmodyfikowanych polimeraz DNA

Polimerazy DNA dzięki różnicom w wykazywanych właściwościach (szybkości przeprowadzenia reakcji, procesywności, obecności lub braku domen zwłaszcza egz nukleolitycznych) mogą wykazywać różne zastosowania, a wybór odpowiedniej polimerazy DNA determinowany jest jej specyficznymi cechami pożądanymi w danej technice.



Obecność domeny korektorskiej jest niezwykle ważna w przypadku powstawania produktów PCR przeznaczonych do klonowania czy detekcji mutacji w danym genie. W takich przypadkach najlepiej sprawdza się polimeraza DNA Pfu lub fuzyjna polimeraza Phusion (Bio-Rad, ThermoScientific, NEB), co wynika z faktu, że częstość błędów popełnianych podczas amplifikacji przez te polimerazy DNA jest co najmniej 10-krotnie niższa niż w przypadku polimerazy DNA Taq (79).

Do amplifikacji długich fragmentów DNA rekomendowana jest polimeraza DNA Tfu z *T. fumicolans* (produkty do 10 kpz). Podobnie polimeraza DNA KOD1 dobrze sprawdza się podczas amplifikacji długich fragmentów DNA, ponieważ wykazuje 10-15 razy wyższą procesywność oraz lepszą zdolność elongacyjną niż polimeraza DNA Pfu (35).

Jednym z nowszych rozwiązań jest stosowanie termostabilnych polimeraz DNA z rodziny Y podczas amplifikacji próbek archeologicznych lub z częściowo zdegradowanym DNA (80). Polimerazy te pozbawione są aktywności egzonukleazy 3'→5' i posiadają znaczną tolerancję w stosunku do uszkodzonego DNA. Sztandarowym przedstawicielem tej rodziny jest polimeraza DNA IV, pochodząca z *Sulfolobus solfataricus* oraz polimeraza DNA IV z *E. coli* (16).

Stosunkowo dobrym rozwiązaniem jest również stosowanie mieszaniny polimeraz DNA o różnych właściwościach w odpowiednich proporcjach. Przykładem może być mieszanina polimeraz DNA Taq i Tpe (z *Thermococcus peptonophilus*) w stosunku 31:1. Taka mieszanka polimeraz DNA pozwala na amplifikację długich fragmentów DNA nawet do 15 kpz. Również mieszanka polimeraz DNA KOD1 z polimerazą KOD1 pozbawioną aktywności egzonukleolitycznej (exo-) zapewnia wydajniejszą amplifikację matryc DNA o wielkości ok. 15 kpz (44). Inne badania donoszą, że zastosowanie mieszaniny polimeraz DNA Taq i Pfu w stosunku 16:1 pozwala na amplifikację fragmentów DNA do 30 kpz (81).

Istnieją polimerazy DNA, które wykazują dużą przydatność w diagnostyce molekularnej do detekcji DNA mikroorganizmów w próbkach krwi, gleby lub żywności (sery, mięso, mleko) z wykorzystaniem reakcji PCR. Próbkę te posiadają duże ilości inhibitorów reakcji PCR, często trudnych do zidentyfikowania. Polimeraza DNA 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 DNA Taq jest całkowicie hamowana w obecności już 0.004% (v/v) krwi, polimerazy DNA wymienione powyżej są zdolne (jak wskazuje literatura) syntetyzować nić DNA w obecności 20% krwi w mieszaninie reakcyjnej (19).

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 DNA.

W związku z ogromnym rozpowszechnieniem reakcji PCR w różnych dziedzinach nauki, a także w przemyśle, problemy jakie napotyka się podczas amplifikacji DNA są różnorodne. Firmy biotechnologiczne wychodzą naprzeciw zapotrzebowaniom i cały czas poszukują oraz konstruują nowe, ulepszone wersje polimeraz DNA. Drogi postępowania mogą być różne, w tabeli 3 poniżej, przedstawione



zostały najczęstsze problemy, ich rozwiązania oraz rekomendowane polimerazy DNA. Wydaje się, że modyfikacje już znanych, a nie poszukiwanie nowych polimeraz DNA to sposób łatwiejszy, szybszy i dający większe możliwości w zaprojektowaniu enzymów o pożądanym cechach.

Tabela 3. Najczęstsze problemy w reakcjach PCR, ich przyczyny i możliwe rozwiązania wraz z rekomendowaną polimerazą DNA [opracowanie własne]

Problem	Przyczyna	Rozwiązanie	Polecana polimeraza DNA	
			natywna	Zmodyfikowana
Niespecyficzne produkty	Aktywność polimerazy DNA w RT	Użycie polimerazy DNA typu "hot-start"	-	Taq W706R I707L Z708B
Próbki krwi lub środowiskowe	Obecność inhibitorów	Użycie polimerazy DNA odpornej na inhibitory	Tfl, Tli, Tth, Pfu	Taq Z708V,K,L
Błędy w sekwencji	Polimeraza DNA z niską wiernością	Użycie polimerazy DNA o lepszej wierności	Pfu	Phusion SsoSSB-Tzi Kofu
Długie produkty, niska wydajność ich amplifikacji	Polimeraza DNA z niską procesywnością, brak domeny korektorskiej	Użycie polimerazy DNA o lepszej procesywności z domeną korektorską	Mieszane polimerazy DNA Taq i Tpe Mieszane polimerazy DNA KOD1 i KOD1 (exo) Tfu (z <i>Thermococcus fumicolans</i>)	Phusion RB69- RB69SSB Sso7d-Taq Pfu-Sso7d SsoSSB-Tzi Sso7d-KOD1 Tth-Taq
Matryce DNA bogate w GC	Obecność trudnotopliwych par GC	Użycie polimerazy DNA wysokotermostabilnej	Pfu	Phusion

7. Charakterystyka białek wiążących DNA o potencjalnym zastosowaniu w układach fuzyjnych z polimerazą DNA

W poniższej pracy zaproponowano cztery fuzyjne polimerazy DNA oparte o polimerazę DNA TaqStoffel, która na swoim N-końcu, za pomocą sześćoaminokwasowego łącznika, połączona została z białkami wiążącymi kwasy nukleinowe: RB69SSB (pochodzącym z bakteriofaga RB69), TtePriB (z *Thermoanaerobacter tengcongensis*), NeqSSB (wyizolowanym z *Nanoarchaeum equitans*) oraz domeną ligazy *Pyrococcus furiosus* – DBD. Obecność łącznika zapewnić miała białku fuzyjnemu pewną elastyczność i stosunkowo swobodne ułożenie w stosunku do polimerazy DNA, co powinno zapobiec powstawaniu ewentualnej zawady sterycznej. Białka użyte w fuzyji posiadają naturalną zdolność wiązania jedno- lub dwuniciowego DNA, co dało podstawy sądzić, że wpłyną pozytywnie na proces amplifikacji DNA, a otrzymane fuzyje charakteryzować się będą ulepszonymi cechami użytecznymi w biologii molekularnej, inżynierii genetycznej czy diagnostyce molekularnej.



7.1. Białko SSB pochodzące z faga RB69

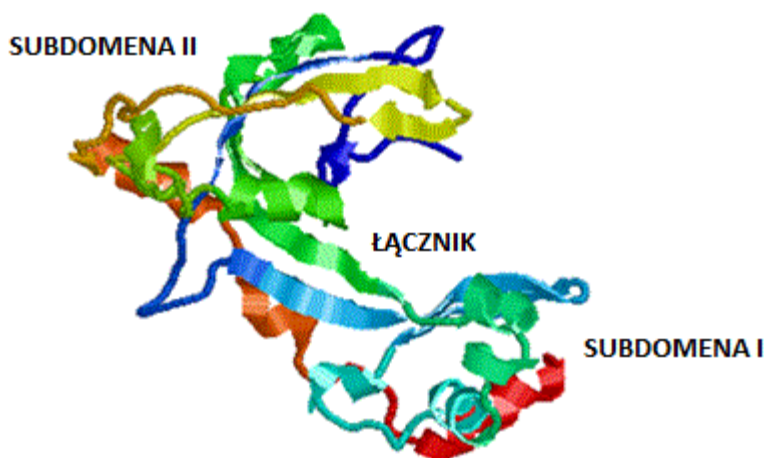
Białko RB69SSB należy do rodziny białek SSB (ang. Single-Stranded DNA Binding protein), które wykazują różnorodność sekwencji aminokwasowych oraz różnorodność struktury. Mimo to, wszystkie posiadają charakterystyczną, silnie zakonserwowaną, ok. 100-aminokwasową domenę oligonukleotydomą OB (ang. Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Fold Domain). Występuje ona powszechnie u białek posiadających zdolności wiązania ssDNA, determinuje podstawową i wspólną dla wszystkich białek SSB cechę – niespecyficzne wiązanie jednoniciowego DNA, a także, odkryte znacznie później, wiązanie RNA. Białka SSB odgrywają zasadniczą rolę w procesach ściśle związanych z ssDNA: odgrywają istotną rolę w replikacji, rekombinacji i naprawie DNA. Odpowiadają za interakcje z jednoniciowym DNA, zapobiegają tworzeniu struktur drugorzędowych i chronią przed degradacyjnym działaniem nukleaz (60).

Odkrycie białek SSB datuje się na połowę lat 60. XX wieku, a pierwsze wykryte białka to białko SSB faga T4 oraz białko SSB *E. coli*. Już w latach 70. ujawniono ich silne właściwości związane z selektywnym oddziaływaniem z ssDNA (82). Zwrócono również uwagę na fakt występowania tego białka u wszystkich organizmów żywych, a także u wirusów. Wiązanie się białka SSB z ssDNA polega na upakowaniu aromatycznych reszt aminokwasowych między zasady w łańcuchu oligonukleotydomym, a dodatnio naładowane reszty aminokwasowe oddziałują ze szkieletem fosforanowym w cząsteczce ssDNA (59) (82).

Białko RB69SSB jest produkowane przez faga RB69, który infekuje bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Białka SSB pełnią u bakteriofagów bardzo istotną rolę w prawidłowym działaniu ich rodzimych polimeraz DNA, a brak tego typu białek pomocniczych powoduje nie tylko znaczne zmniejszenie procesywności polimerazy DNA, ale również dużo częstsze pojawianie się niekorzystnych, drugorzędowych struktur na matrycowej nici DNA (59).

RB69SSB to niewielkie, monomeryczne białko, zbudowane z 299 reszt aminokwasowych. Struktura krystalograficzna tego białka nie została do tej pory opracowana, jednak przyjmuje się, że jego budowa jest zbliżona do homologicznego białka SSB faga T4, którego struktura przedstawiona jest na rysunku 13. Dotychczasowe badania sugerują, że w białku RB69SSB wyróżnić można trzy podstawowe domeny. Pierwsza, N-terminalna (B-domena), obejmuje reszty aminokwasowe od 1 do 21 i odpowiedzialna jest za wiązanie się białka do jednoniciowego DNA. A-domena, o charakterze kwaśnym, obejmująca 45 C-końcowych reszt aminokwasowych, umożliwia oddziaływanie z innymi białkami, uczestniczącymi w procesie replikacji, rekombinacji i naprawie DNA. Reszty aminokwasowe 22-254 wchodzi w skład domeny „rdzenia”, która wykazuje powinowactwo do ssDNA. RB69SSB będąc białkiem wiążącym się niezależnie od sekwencji z jednoniciowym DNA pełni również rolę autogenicznego represora translacji specyficznego dla mRNA (76) (83).





Rysunek 13. Struktura krystalograficzna białka SSB bakteriofaga T4, zblizonego budowa do białka RB69SSB (AAP68674, www.ncbi.nlm.nih.gov). Subdomena I odpowiada za oddziaływanie z jonami Zn^{2+} , subdomena II tworzona jest przez 5 β -karktek, które wchodzą w skład szczeliny wiążącej ssDNA. Łącznik odpowiada za połączenie tych dwóch subdomen (84)

Białko RB69SSB wydaje się być idealnym kandydatem do fuzji z polimerazą DNA ze względu na swoje unikalne właściwości. Jest to małe białko, selektywnie przyłączające się do jednoniciowego DNA, które wykazuje aktywność jako monomer. Pochodzi z termofilnego faga, co sugeruje, że będzie zachowywało stabilność w wysokich temperaturach. Jest to cecha niezwykle cenna w przypadku zastosowania w reakcjach PCR, gdzie temperatura denaturacji DNA przekracza $90^{\circ}C$. Ponadto, białka SSB są obecnie stosowane jako wzmacniacze w reakcji PCR. Udowodniono, że białko SSB bakteriofaga T4 o budowie zbliżonej do białka RB69SSB, podnosi wydajność amplifikacji DNA (85). Co więcej, potwierdzono pozytywny wpływ białka RB69SSB na działanie polimerazy DNA wykorzystując je do stworzenia fuzyjnej polimerazy DNA z jego rodzimą polimerazą DNA (RB69Pol). Taka modyfikacja przyniosła znaczny wzrost procesywności badanego enzymu (76).

7.2 Białko SSB pochodzące z *Nanoarchaeum equitans*

Kolejnym przykładem białek SSB jest białko NeqSSB, które mimo przynależności do rodziny białek SSB, odbiega swoimi cechami od klasycznych białek SSB, stąd określane jest jako białko NeqSSB-podobne. Białko to pochodzi z hipertermofilnego archeona *Nanoarchaeum equitans*, który jest pasożytem *Ignicoccus hospitalis* (Królestwo Crenarchaeota). Optymalne warunki wzrostu tego mikroorganizmu wymagają ściśle beztlenowych warunków i temperatury $90^{\circ}C$. *Nanoarchaeum equitans* posiada najmniejszy znany genom składający się z 490885 par zasad i w przeciwieństwie do większości znanych organizmów o małych genomach, posiada pełen zestaw enzymów, biorących udział w replikacji, naprawie i rekombinacji DNA, w tym białko SSB (86).



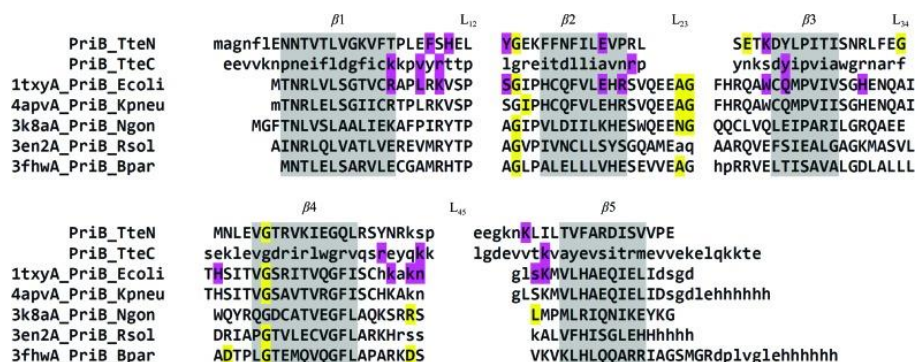
Białko NeqSSB, podobnie jak inne białka z tej rodziny, posiada naturalną zdolność wiązania DNA. Składa się z 243 reszt aminokwasowych, posiada jedną domenę OB, wykazuje aktywność biologiczną również jako monomer, podobnie jak niektóre wirusowe białka SSB. Badania wskazują na jego, nietypowe dla białek SSB, zdolności wiązania wszystkich form DNA (ssDNA, dsDNA) oraz RNA bez strukturalnych preferencji. Bardzo istotną cechą, która pozwoliła wytypować to białko jako kandydata do fuzji jest jego wysoka termostabilność – czas półtrwania przy zachowaniu aktywności biologicznej wynosi 5 min w 100°C (86).

7.3 Białko PriB pochodzące z *Thermoanaerobacter tengcongensis*

Białko TtePriB, należące do białek PriB, wyizolowane zostało po raz pierwszy w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii WCh PG z bakterii *Thermoanaerobacter tengcongensis*. PriB to zazwyczaj niewielkie białka, które posiadają zdolność wiązania jednoniciowego DNA, a co więcej, pełnią funkcję pomocniczą w replikacji DNA, co skłoniło do poszukiwania analogii między nimi a poznanymi już białkami SSB. Mimo licznych podobieństw strukturalnych do białek SSB, wykazują one dodatkową zdolność oddziaływania z dwuniciowym DNA (87).

Większość scharakteryzowanych białek PriB posiada sekwencję aminokwasową o długości ok. 110 reszt aminokwasowych, jedną domenę OB i budowę homodimeryczną. TtePriB odznacza się nietypowymi cechami budowy, posiada aż 220 reszt aminokwasowych i dwie domeny OB, a w roztworze tworzy struktury monomeryczne. Opisane wyżej białko jest więc przedstawicielem nowej rodziny białek PriB, scharakteryzowanej w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, do której należą aktualnie tylko przedstawiciele rodzaju *Clostridium* (88).

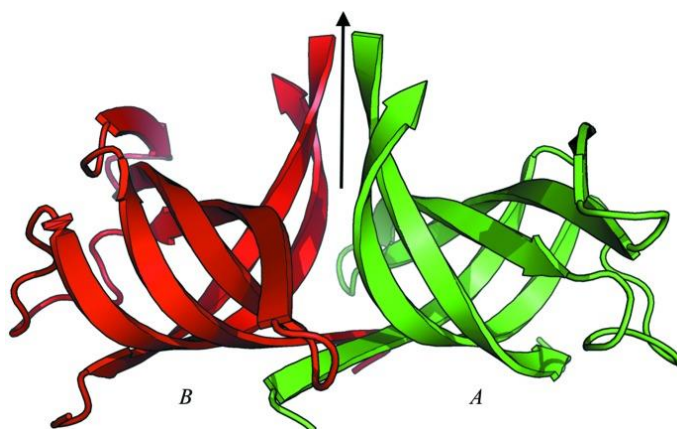
Głębsza analiza sekwencji aminokwasowej białka TtePriB wskazuje, że jego N- i C-końcowa domena, mimo dużego podobieństwa, nie jest identyczna, nie występuje tutaj pełne dublowanie jednostek. Porównanie N-końcowej sekwencji białka z innymi jednodomenowymi sekwencjami białek PriB ujawnia zakonserwowanie w obrębie β-beczki (rysunek 14)(88).



Rysunek 14. Porównanie sekwencji aminokwasowej domeny N- i C- końcowej TtePriB oraz jednodomenowych białek EcoPriB, KpnPriB, NgoPriB, RsoPriB i BpaPriB. Najwyższe zakonserwowanie

oznaczone zostało kolorem szarym, obszar odpowiedzialny za wiązanie ssDNA oznaczono kolorem fioletowym i żółtym (88)

Białko TtePriB posiada zdolność dimeryzacji, a powierzchnię kontaktu monomerów tworzą koniec β -beczki i pętla L23, owijająca się wokół drugiego monomeru. Struktura homodimeru tworzona przez fragmenty białka TtePriB zobrazowana jest na rysunku 15 (88).



Rysunek 15. Model N-końcowej domeny białka TtePriB (TtePriBN). Monomerom A i B odpowiadają odpowiednio kolor zielony i czerwony (88)

Dzięki swoim zdolnościom do wiązania, zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA oraz możliwościom tworzenia struktury monomerycznej w roztworze, białko TtePriB wydaje się być odpowiednim kandydatem do fuzji z polimerazą DNA.

7.4 Domena DBD z ligazy *Pyrococcus furiosus*

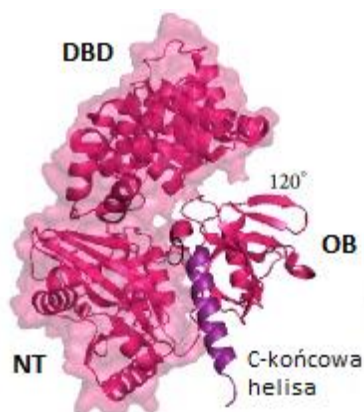
Ligazy, jako enzymy katalizujące połączenie dwóch łańcuchów nici DNA w wyniku wytworzenia wiązania fosfodiesterowego, odgrywają nadrzędną rolę w procesach replikacji, syntezy nici DNA oraz rekombinacji genetycznej. W związku z pełnieniem tak ważnych funkcji ligazy DNA występują zarówno w archeonach, organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Ligazy DNA do przeprowadzenia reakcji ligacji wymagają odpowiedniego kofaktora – cząsteczki ATP bądź NAD^+ , z czym związany jest też ich podstawowy podział. Różnice pomiędzy dwoma rodzajami ligaz DNA dotyczą również budowy i wielkości poszczególnych enzymów. Masa cząsteczkowa ATP-zależnych ligaz DNA jest bardzo zróżnicowana i mieści się w przedziale 30 – 100 kDa. Enzymy zależne od substratu NAD^+ wykazują natomiast duży stopień homologii sekwencji aminokwasowej oraz zbliżony zakres masy cząsteczkowej wynoszącej 70 – 80 kDa. Podobieństwo poznanych ATP- i NAD^+ -zależnych ligaz DNA ogranicza się przede wszystkim do zakonserwowanego motywu w sekwencji aminokwasowej. Ligazy DNA pochodzenia eukariotycznego oraz wirusowego do właściwego przebiegu reakcji replikacji czy naprawy DNA, wymagają jako kofaktora



cząsteczek ATP, a tylko nieliczne bakterie zawierają sekwencje kodujące ATP-zależne ligazy DNA, które u tej grupy organizmów pełnią zazwyczaj funkcje pomocnicze. Nadrzędną rolę w procesie syntezy i naprawy DNA odgrywają NAD⁺-zależne ligazy DNA – ich obecność stwierdzono u wszystkich bakterii (89).

Odkrycie ligaz w 1967 roku przez Martina Gellert'a oraz Boba Lehman'a zmieniło oblicze biotechnologii i pozwoliło na dynamiczny rozwój biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej (89). Oprócz tego, że są niezastąpione w procesie klonowania podczas łączenia DNA insertu z DNA wektora, bez ich udziału nie byłby możliwy również rozwój wielu technik stosowanych w onkologii, immunologii, diagnostyce molekularnej czy metodach sekwencjonowania DNA, opartych np. na technologii stopniowej ligacji (SOLiD). Pomimo ich ogromnego znaczenia w rozwoju inżynierii genetycznej i biotechnologii, tylko nieliczne ligazy DNA zostały dobrze poznane i wprowadzone na rynek. W powszechnym użyciu stosuje się przede wszystkim ATP-zależne ligazy DNA z: faga T4, T7, T3, *Escherichia coli*, czy *Thermus aquaticus* (90).

Rdzeń wszystkich ligaz DNA jest zbudowany z dwóch głównych domen: NT (nukleotydylotransferazy) oraz OB. Miejsce aktywne zlokalizowane jest w domenie NT i składa się z silnie zakonserwowanego motywu (KxDG), w związku z tym pełni ona główną rolę w procesie ligacji oraz oddziałuje z DNA w miejscu jego przerwania. Domena OB umożliwia natomiast oddziaływanie z nieprzerwaną nicią DNA w pobliżu jej nacięcia (91). Ligazy DNA NAD⁺-zależne posiadają dodatkową, unikalną domenę odpowiedzialną za wiązanie NAD⁺. Wiele ligaz DNA, w tym ligazy z *Pyrococcus spp.*, posiadają dodatkową domenę wiążącą DNA, domenę DBD (DNA-binding domain), która oddziałuje z domeną OB i otacza substratowe DNA. Domena DBD zbudowana jest z 6 α -helis, które tworzą wiele powtarzających się motywów HhH (helix-hairpin-helix) (92). Strukturę ligazy DNA *Pyrococcus furiosus* przedstawia rysunek 16 (93).



Rysunek 16. Struktura krystalograficzna ligazy DNA *Pyrococcus furiosus* z zaznaczonymi głównymi domenami oraz z zaznaczoną na fioletowo C-końcową helisą (93)

Domena DBD posiada zdolność wiązania jedno- jak i dwuniciowego DNA. Badania przeprowadzone na domenie DBD z *Pyrococcus abyssi* wskazują na jej stosunkowo dużą termostabilność (inaktywacja po inkubacji 15 min w 95°C). Dodanie

jej do mieszaniny reakcyjnej prowadzi do poprawy zdolności amplifikacji DNA w obecności jednego z inhibitorów krwi – heparyny, oraz poprawy wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA (94).

ROZDZIAŁ 5

MATERIAŁY

1. Materiały podstawowe

- Kolby o pojemności 100 ml, 500 ml i 2000 ml
- Końcówki do pipet automatycznych – MedLab, Polska
- Minikolumny do izolacji plazmidowego i genomowego DNA – A&A Biotechnology, Polska
- Minikolumny do Gel-Out – A&A Biotechnology, Polska
- Płytki Petriego - MedLab, Polska
- Probówki typu Falcon 15 ml i 50 ml – BD Biosciences, USA
- Probówki typu Eppendorf 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml i 2 ml – MedLab, Polska
- Worek dializacyjny VISKING dialysis tubing – SERVA, Niemcy

2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Aparat do elektroforezy agarozowej – DNA-Gdańsk, Polska
- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej – DNA-Gdańsk, Polska
- Autoklaw – PrestigeMedical, UK
- Apart FPLC AKTA Purifier – GE Healthcare, USA
- Butle i kolby szklane – Simax, Czechy
- Ciepłarka laboratoryjna TB2 – Pozamer, Polska
- Filtry wirówkowe Amicon Ultra-15 – Millipore, USA
- Kolumna chromatograficzna HisTrap™ – GE Healthcare, USA
- Kolumna chromatograficzna HiLoad Superdex 250 Prep Grade – GE Healthcare, USA
- Kolumny do zagęszczania Amincon Ultra-15 – Millipore, USA
- Kuchenka mikrofalowa AMM 17 E 70 – Amica, Polska
- Mieszadło magnetyczne – ATM, Polska
- Mikrowirówka Eppendorf Centrifuge 5415 D – Eppendorf, Niemcy



- Pehametr – Elmetron, Polska
- Pipety automatyczne o pojemności: 0,1-2 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l – HTL, Polska
- Pipeta automatyczna o pojemności 0,5-5 ml – Eppendorf, Niemcy
- Sonifikator Soniprep 150 MSE – SANYO, USA
- Spektrofotometr BioPhotometer D30 – Eppendorf, Niemcy
- Spektrofotometr NanoDrop 2000 – ThermoFisherScientific, USA
- Sterylizator – WAMED, Polska
- Termoblok Red Hot 35 – DNA-Gdańsk II s.c., Polska
- Termocykler gradientowy Veriti 96-dołkowy – ThermoFisherScientific, USA
- Termocykler MyGo Pro do real-time PCR - IT-IS International Ltd., UK
- Transiluminator Foto/UV 21 – Fotodyne, USA
- Waga laboratoryjna – Axis, Polska
- Wirówka Eppendorf Centrifuge 5415D – Eppendorf, Niemcy
- Wirówka Sorvall RC-58 – Du Pont, USA
- Worteks – DHN, Polska
- Wytrząsarka 2002 – DNA-Gdańsk II s.c., Polska
- VersaDoc do dokumentacji i densytometrycznej analizy żeli – Bio-Rad, USA
- Zasilacz prądu stałego Thunder – DNA-Gdańsk II s.c., Polska

3. Odczynniki chemiczne

- Agar bakteriologiczny – Difco Laboratories, USA
- Agaroz – Prona, Hiszpania
- Akrylamid – Sigma, USA
- Arabinoza – Sigma, USA
- Barwnik Coomassie Brilliant Blue R – Fluka, USA
- Barwnik fluorescencyjny EvaGreen – Jena Bioscience, Niemcy
- β -merkaptoetanol – Sigma, USA
- Błękit bromofenolowy – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Benzonaza – Merck, USA
- Bromek etydyny 1 mg/ml – Sigma, USA
- Chlorek magnezu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek sodu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek wapnia – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek potasu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek niklu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Diwodorofosforan sodu - Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- DTT – Sigma, USA
- EDTA – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Ekstrakt drożdżowy – Difco Laboratories, USA
- Etanol – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Hemoglobina – Sigma, USA



- Heparyna – Sigma, USA
- Imidazol – Sigma, USA
- IPTG – Sigma, USA
- Krew ludzka – Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska
- Kwas octowy – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Kwas chlorowodorowy – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Kwas fosforowy (V) – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Laktoferyna – Sigma, USA
- Metanol – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Nadsiarczan (VI) amonu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- *N, N'*-metyleno-bis-akrylamid – Sigma, USA
- *N, N'*-dimetyloformamid – Sigma, USA
- Oligo d(T)₇₆ – Sigma, USA
- Pepton – Difco Laboratories, USA
- SDS – Sigma, USA
- TEMED – Sigma, USA
- Tris – Sigma, USA
- Triton X-100 – Fluka, USA
- Tween 20 – Sigma, USA
- Wodorofosforan (V) sodu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska

4. Pożywki i podłoża mikrobiologiczne

Tabela 4. Skład podłoży mikrobiologicznych

Składnik	LB (Luria-Bertani)	LA (Luria-Bertani Agar)
Ekstrakt drożdżowy	5 g	5 g
Pepton K	10 g	10 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	-	10 g
Woda destylowana	1000 ml	1000 ml

W celu zapewnienia jałowości podłoży poddawano je sterylizacji w autoklawie (20 min, 121°C). Ich skład modyfikowano w zależności od potrzeb, poprzez dodatek antybiotyków lub IPTG o niezmiennych, podanych niżej stężeniach końcowych:

- Kanamycyna (50 µg/ml)
- Chloramfenikol (50 µg/ml)
- IPTG (1 mM)

5. Markery

Markery wielkości DNA:

- Marker GeneRuler™ 75 -20000: 75, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000, 10000, 20000 pz – ThermoFisherScientific, USA
- Marker GeneRuler™ 250-10000: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz - ThermoFisherScientific, USA
- Marker 100-500: 100, 200, 300, 400, 500 – Blirt, Polska
- Marker 100-1000: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz – Blirt, Polska
- Marker HyperLadder II: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 - Bioline, UK

Marker masy cząsteczkowej białek:

- Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder 14,4-116 kDa: 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116 kDa – ThermoFisherScientific, USA

6. Odczynniki do reakcji PCR

- 10 × stężony bufor KL 8,8 – Blirt, Polska
- 2 × stężony bufor Marathon – A&A Biotechnology, Polska
- 5 × stężony bufor HF – ThermoFisherScientific, USA
- 10 × stężony bufor Shark – Blirt, Polska
- 10 × stężony bufor TaqNova – Blirt, Polska
- 10 × stężony bufor Taq – ThermoFisherScientific, USA
- 50 mM chlorek magnezu – Blirt, Polska
- Trifosforany deoksynukleozydów: 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP – Roche, Szwajcaria
- Polimeraza DNA Marathon – A&A Biotechnology, Polska
- Polimeraza DNA HyperNova – Blirt, Polska
- Polimeraza DNA Taq – ThermoFisherScientific, USA
- Woda jałowa
- Startery (10 μM roztwory w wodzie) – Sigma, USA

Tabela 5. Składy komercyjnych buforów do PCR użytych w optymalizacji buforu reakcyjnego dla fuzyjnych polimeraz DNA

	Skład	pH (w 25°C)
Maraton 2 ×	5 mM MgCl ₂	9,0
	100 mM Tris	
	40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
	10% DMSO	
Shark 10 ×	200 mM Tris-HCl	8,3
	100 mM KCl	
	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
	1% Triton X-100	



TaqNova 10 ×	100 mM Tris-HCl	8,8
	500 mM KCl	
	0,8% (v/v) Nonidet P40	
Taq 10 ×	750 mM Tris-HCl	8,8
	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
	0,1% (v/v) Tween 20	

Stosowane startery:

Tabela 6. Startery do konstrukcji fuzyjnych polimeraz DNA

Lp.	Nazwa	Sekwencja	Długość [nt]	T _m [°C]
1	RB69SSB-F1	5' AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA ATATGTTTAAACGTA AAAAGTACCGCAGAC CTCG	16	56,2
2	RB69SSB-Ł-Taq-R1	5' TCCTCCAGGGC GTCGACCCCTCCGCTTCC TAGACCAGCTAACAGGTCATCGA	23	55,3
3	TaqStoffel-Ł-RB69SSB-F2	5' TAGCTGGTCTA GGAAGCGGAGGGGTCGAC GCCCTGGAGGAGGCC	16	56,2
4	TaqStoffel-R2 (uniwersalny)	5' GCAAGCTTGTTCGACGAGCTCGAATTCGGAT CCTTAATGTTGGTGGTGGTGGTCTCCTTGGC GGAGGCCAG	19	57,6
5	TtePriB-F1	5' ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA TATGCGAGGTAATTTTTAGAAAACAATACCG TCAC	32	58,0
6	TtePriB-Ł-Taq-R1	5' TCCTCCAGGGC GTCGACCCCTCCGCTTCC TTCTGTTTTTTGCAATTCCTTTTCCACTAC	30	54,8
7	TaqStoffel-Ł-TtePriB-F2	5' AAAAAACAGAA GGAAGCGGAGGGGTCGAC GCCCTGGAGGAGGCC	16	56,2
8	NeqSSB-F1	5' ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA TATGATGAAGAGGAACTAATACAATAATAA TAGAAAAAACT	39	58,2
9	NeqSSB-Ł-Taq-R1	5' TCCTCCAGGGC GTCGACCCCTCCGCTTCC ATCGGCCTCTCCTTTAAAAGCTTTTA	26	54,8
10	TaqStoffel-Ł-NeqSSB-F2	5' GAGAGGCCGAT GGAAGCGGAGGGGTCGAC GCCCTGGAGGAGGCC	16	56,2
11	DBD-F1	5' ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA TATGCCATTGTGGGCTTTATCTTCAACCA	25	56,0
12	DBD-Ł-Taq-R1	5' TCCTCCAGGGC GTCGACCCCTCCGCTTCCGAA AGCCAATAAAGCCAATGCTTGC	25	54,0
13	TaqStoffel-Ł-DBD-F2	5' TATTGGCTTTC GGAAGCGGAGGGGTCGACGC CCTGGAGGAGGCC	16	56,2

T_m – temperatura topnienia starterów obliczona przy pomocy programu Oligo Calc:

Oligonucleotide Properties Calculator [Met. 30] na podstawie algorytmu: $T_m = 64.9 + 41 \times (yG+zC-16.4) / (wA+xT+yG+zC)$ gdzie w,x,y,z określają odpowiednio ilość nukleotydów A,T,G,C

Podkreślono sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych

Kolorem czerwonym oznaczono sekwencje komplementarne do genu

Na żółtym tle oznaczono sekwencje linkera



Na niebieskim tle oznaczono sekwencje plazmidu pET-30 Ek/LIC
Na różowym tle oznaczono sekwencję domeny oligohistydynowej

Tabela 7. Startery do testów molekularnych fuzyjnych polimeraz DNA

Lp.	Nazwa	Sekwencja	Długość [nt]	Tm [°C]
1.	pET_up	5'GATGCGTCCGGCGTAGA	17	51,9
2.	pET_ter	5'TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20	51,8
1.	SpaO	5'AGAGCGTACCGAAGCGTCAC	20	55,9
2.	1KB	5'GGACAAGGTCGCTGAAGCCTTCG	23	60,6
3.	300/800	5'TCTCCAGCGTCCGGAGTTCT	20	55,9
4.	500/1000	5'GCTCCTGATACGTAACCTTGTCGCC	25	61,0
5.	L1	5'CAAGGCATCCACCGT	15	44,7
6.	G1	5'GAAGTCGTAACAAGG	15	39,2
7.	P	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGC	24	62,5
8.	pET_F	5'GATGCTGCTGGCTACCCTG	19	55,4
9.	pET_R	5'TCAAGAACTCTGTAGCACCGC	21	54,4
10.	Eco_F	5'GCACCATCAACAATAAAGGCGC	22	54,8
11.	R5	5'TTCCGCTAATGCCATGGTGATAG	23	55,3
12.	R8	5'AACGATGCGATATAGCCGACAC	22	54,8
13.	R10	5'GCACCATCAACAATAAAGGCGC	22	54,8
14.	Nuc1	5'GCGATTGATGGTGATACGGTT	21	52,4
15.	Nuc2	5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	24	57,4
16.	CCR5_F	5'CTTCATTACACCTGCAGCTCT	21	52,4
17.	CCR5_R	5'CACAGCCCTGTCCCTCTTCTTC	22	58,6
18.	Myc_F	5'CCGCCGTTACCACCCTTACCACCGTT	26	64,3
19.	Myc_R	5'GCACCGACCCACCAGCGGC	20	64,1

Tabela 8. Startery wykorzystywane do utworzenia produktów markerowych w oznaczeniu procesywności

Nazwa	Sekwencja	Długość [nt]
T	5'TATCGGTCCATGAGACAAGCTTGCTTGCCAGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC	54
P1	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG	25
P2	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGG	26
P3	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGC	27
P4	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCA	28
P5	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAA	29
P6	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAG	30
P7	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGC	31
P8	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCA	32
P9	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAA	33
P10	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAG	34
P11	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGC	35
P12	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCT	36
P13	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTT	37
P14	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTG	38
P15	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGT	39

P16	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTC	40
P17	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCT	41
P18	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCTC	42
P19	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCTCA	43
P20	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCTCAT	44
P21	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCTCATG	45
P22	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGCTCATGG	46

7. Enzymy restrykcyjne i ich bufor do reakcji trawienia

Tabela 9. Enzymy restrykcyjne stosowane w reakcjach trawienia

Enzym restrykcyjny	Sekwencja rozpoznania	Bufor reakcyjny	Temperatura trawienia [°C]
<i>Bam</i> HI	5'...G [↓] GATCC ...3'	CutSmartBuffer	37
<i>Nde</i> I	5'...C [↓] ATATG...3'	CutSmartBuffer	37
<i>Xho</i> I	5'...C [↓] TCGAG...3'	CutSmartBuffer	37

Enzymy restrykcyjne oraz bufor do reakcji trawienia – New England BioLabs, USA

Bufor CutSmart:

- 20 mM Tris-octan pH 7,9
- 10 mM octan magnezu
- 50 mM octan potasu
- 100 µg/ml BSA

8. Odczynniki do reakcji Gibsona

- OverLap Assembly mix - A&A Biotechnology, Polska:
 Mix enzymów OverLap Assembly
 5 × stężony bufor OverLap Assembly
 dNTPs (10 mM)
 Woda jałowa

9. Odczynniki do rozdzielania DNA za pomocą elektroforezy agarozowej

- Agaroz
- Bromek etydyny 1 mg/ml
- Bufor 50 × TAE
- Bufor obciążający do nanoszenia próbek

Tabela 10. Skład buforów stosowanych w elektroforezie agarozowej.

Bufor	Objętość końcowa	Skład	
		Nazwa	Ilość/stężenie
Bufor rozdzielający 50 × TAE	1000 ml	Tris	242 g
		0,5 M EDTA	100 ml
		Kwas octowy	57,1 ml
		Woda destylowana	Do 1000 ml
Roztwór do nanoszenia próbek	-	Ficoll 400	20%
		EDTA	0,1 M
		Ksylen cyjanu	0,25%

10. Odczynniki do rozdziłu białek za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Żel poliakrylamidowy, zagęszczający 5% (2 ml):

- Woda 1,4 ml
- 30% mieszanina akrylamidów 0,33 ml
 - Akrylamid 29 g
 - N, N'*-metylenobisakrylamid 1 g
 - Woda destylowana 70 ml
- 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,25 ml
- 10% SDS 0,02 ml
- 10% APS 0,02 ml
- TEMED 0,002 ml

Żel poliakrylamidowy, rozdzielający 10% (10 ml):

- Woda 4 ml
- 30% mieszanina akryloamidów 3,3 ml
 - Akrylamid 29 g
 - N, N'*-metylenobisakrylamid 1 g
 - Woda destylowana 70 ml
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 2,5 ml
- 10% SDS 0,1 ml
- 10% APS 0,1 ml
- TEMED 0,008 ml

Roztwór barwiący:

- Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25 g
- Metanol 10 ml
- Kwas octowy lodowaty 40 ml
- Woda destylowana 50 ml

Roztwór 1 × Tris-Glicyna:

- Glicyna 18,8 g
- Tris-HCl 3,02 g
- 10% SDS 10 ml
- Woda destylowana 900 ml

Roztwór do nanoszenia próbek na żel 5 × stężony:

- 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,6 ml
- Glicerol 5 ml
- 10% SDS 2 ml
- β-merkaptoetanol 0,5 ml
- 1% błękit bromofenyłowy 1 ml
- Woda destylowana 0,9 ml

11. Bufory do oczyszczania białek

Bufor do zawieszania A₀:

- 50 mM Tris-HCl pH 9,0
- 500 mM KCl
- 0,1% Triton X-100
- 5 mM imidazol pH 9,0

Bufor do oczyszczania A:

- 50 mM Tris-HCl pH 9,0
- 500 mM KCl
- 5 mM imidazol pH 9,0

Bufor do oczyszczania B:

- 50 mM Tris-HCl pH 9,0
- 500 mM KCl
- 40 mM imidazol pH 9,0

Bufor do oczyszczania C:

- 50 mM Tris-HCl pH 9,0
- 500 mM KCl
- 300 mM imidazol pH 9,0

Bufor do dializy D:



- 100 mM Tris-HCl pH 8,0
- 100 mM KCl
- 0,2 mM EDTA

Bufor do przechowywania polimerazy DNA E:

- 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- 50 mM KCl
- 1 mM DTT
- 0,1 mM EDTA
- 1% Tween 20
- 1% Nonidet X-100
- 50% glicerol

Inne:

- Bufor do regeneracji kolumny (2% SDS + 0,5 M EDTA)
- Chlorek niklu
- 20% etanol

12. Odczynniki do filtracji żelowej

Bufor do chromatografii żelowej:

- 150 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl pH 8,0

13. Szczepy bakteryjne, DNA plazmidowe i genomowe

- Szczep *Escherichia coli* BL RIL – Invitrogen, USA
- Szczep *Escherichia coli* TOP10 – Invitrogen, USA
- DNA *Mycobacterium tuberculosis* – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Szczep *Thermus aquaticus* DSM625 – DSMZ, Niemcy
- Szczep *Pyrococcus furiosus* DSM3638 – DSMZ, Niemcy
- Szczep *Staphylococcus aureus* MSSA – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Plazmid rekombinantowy pBAD/NeqSSB – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Plazmid rekombinantowy pBAD/RB69SSB – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Plazmid rekombinantowy pBAD/TtePriB – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej



- Wektor ekspresyjny pET-30 Ek/LIC – Novagen, USA
- Plazmid pET-30a(+) – Novagen, USA
- Plazmid pET-28a(+) – Novagen, USA

14. Odczynniki do izolacji genomowego DNA

- Bufor lizujący GL – Bioline, UK
- Bufor G1 – Bioline, UK
- Bufor G2 – Bioline, UK
- Proteinaza K – Bioline, UK
- Bufor do Proteinazy PR – Bioline, UK
- Bufor płuczający GW1 – Bioline, UK
- Bufor płuczający GW2 – Bioline, UK
- Bufor do elucji G – Bioline, UK

15. Odczynniki do izolacji plazmidowego DNA

- Roztwór do zawieszania L1 – A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór lizujący L2 – A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór neutralizujący GL3 – A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór płuczający W – A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór płuczający A1 – A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór do elucji (TE) – A&A Biotechnology, Polska

16. Odczynniki do oczyszczania DNA z żelu agarozowego i po reakcjach trawienia enzymatycznego

- Roztwór R7SI do rozpuszczania agarozy - A&A Biotechnology, Polska
- Roztwór płuczający A1 - A&A Biotechnology, Polska
- Izopropanol - A&A Biotechnology, Polska
- 3 M octan sodu pH 5,5 - A&A Biotechnology, Polska
- Woda jałowa do elucji

17. Zestaw do oznaczania jednostkowości polimeraz DNA

Zestaw EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit firmy Biotium (USA) posiadający w swoim składzie:

- 2 × stężony mix EvaEZ Polymerase Activity



18. Pozostałe bufor i roztwory

- Bufor TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
- Bufor 10 mM Tris-HCl pH 8,5
- 0,1 M roztwór chlorku wapnia

ROZDZIAŁ 6

METODY

1. Izolacja genomowego DNA

Izolację genomowego DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu „Genomic DNA Mini Kit” firmy Bioline postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta [Mat. 14].

2. Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu „Plasmid Mini Kit” firmy A&A Biotechnology postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta [Mat. 15].

3. Elektroforetyczny rozdział DNA w żelu agarozowym

Rozdział DNA przeprowadzono przy pomocy żelu agarozowego 1%, 1,5% lub 2% z dodatkiem bromku etydyny (o końcowym stężeniu 0,1 mg/ml) z użyciem aparatu do elektroforezy agarozowej wypełnionym buforem $1 \times$ TAE [Mat. 9]. Do studzienek nanoszono od 5 do 20 μ l próbki DNA z dodatkiem 5 μ l buforu obciążającego [Mat. 9]. Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach: 120 V, 30-45 min. Wynik obserwowano pod lampą UV przy długości fali 302 nm.

4. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE

Elektroforezę SDS-PAGE poprzedzono denaturacją białek, prowadzoną poprzez poddanie działaniu czynnika denaturującego i wysokiej temperatury (10 min, 99°C). Rozdział prowadzono przez 70-90 min pod napięciem 160 V.

4.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Przygotowanie żelu polegało na wylaniu 10% żelu rozdzielającego, a następnie 5% żelu zagęszczającego [Mat. 10] między szklane szyby z grzebieniami pozwalającymi na uformowanie studzienek, uszczelnione specjalnymi gumkami i spięte klipsami. Po zastygnięciu żel umieszczano w aparacie do elektroforezy z buforem 1 × Tris – Glicyna [Mat. 10] i nanoszono na żel uprzednio przygotowane próbki.

4.2. Przygotowanie próbek do elektroforezy białkowej

Hodowle bakteryjne poddawano wirowaniu, a uzyskany osad zawieszano w 100 µl buforu TE. Do 20 µl tak uzyskanego lizatu dodano 5 µl buforu do nanoszenia [Mat. 10] i inkubowano przez 10 min w 99°C. Tak przygotowane próbki nanoszono do studzienek z żelem i rozdzielano.

4.3. Barwienie i odbarwienie żeli poliakrylamidowych

Żele poliakrylamidowe po zakończonym rozdziale wyjmowano z pomiędzy szyb i umieszczano w roztworze barwiącym [Mat. 10] na ok. 5 min. Następnie odbarwiano poprzez kilkukrotne gotowanie w wodzie.

5. Izolacja DNA z żelu agarozowego

Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzono przy użyciu zestawu „Gel-Out Concentrator” firmy A&A Biotechnology postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta [Mat. 16]. Tak przygotowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

6. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych przeprowadzono zestawem „Gel-Out Concentrator” firmy A&A Biotechnology postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta [Mat. 16]. Tak przygotowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.



7. Amplifikacja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA

Otrzymanie DNA insertu przeznaczonego do klonowania polegało na przeprowadzeniu dwóch niezależnych reakcji PCR, które doprowadziły do otrzymania konstruktów RB69SSB-TaqStoffel, NeqSSB-TaqStoffel, TtePriB-TaqStoffel lub DBD-TaqS. Pierwsza z reakcji amplifikacji (PCR 1) pozwoliła na otrzymanie produktu PCR o sekwencji nukleotydowej odpowiadającej sekwencji genu kodującego białko wiążące DNA (NeqSSB, RB69SSB, TtePriB lub DBD) z dodatkową sekwencją łącznika oraz komplementarną do 11 początkowych nukleotydów genu kodującego polimerazę DNA. Otrzymany w drugiej reakcji PCR (PCR 2) produkt zawierał sekwencję nukleotydową genu kodującego polimerazę DNA z dodatkowymi nukleotydami łącznika oraz 11 dodatkowymi nukleotydami komplementarnymi do końcowej sekwencji nukleotydowej genu kodującego białko wiążące DNA na N-końcu. Matrycę DNA do reakcji PCR stanowiło wyizolowane genomowe DNA lub DNA plazmidu rekombinantowego [Mat. 13]. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR przedstawiają tabele 11-14.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR 1

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	15,5
Bufor KL 8,8 10 \times stężony	2,5
MgCl ₂ [50 mM]	1
dNTPs [10 mM]	2,5
Starter X-F1 [10 μ M]	1
Starter X-R1 [10 μ M]	1
Polimeraza DNA HyperNova (Blirt) [1 U/ μ l]	0,5
Genomowe DNA/plazmidowe DNA [100 ng/ μ l]	1
Objętość końcowa	25

Tabela 12. Profil temperaturowo-czasowy PCR 1

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	300	1
Denaturacja	94	30	
Przyłączanie starterów	56	30	35
Elongacja	72	30	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR 2

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	15,5
Bufor KL 8,8 10 \times stężony	2,5
MgCl ₂ [50 mM]	1
dNTPs [10 mM]	2,5
Starter X-F2 [10 μ M]	1
Starter X-R2 [10 μ M]	1
Polimeraza DNA HyperNova (Blirt) [1 U/ μ l]	0,5

Genomowe DNA <i>Thermus aquaticus</i> [100 ng/μl]	1
Objętość końcowa	25

Tabela 14. Profil temperaturowo-czasowy PCR 2

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	300	1
Denaturacja	94	30	
Przyłączanie starterów	56	30	35
Elongacja	72	90	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	∞	1

Produkty PCR tych dwóch reakcji amplifikacji posłużyły jako DNA insertów w reakcji Gibsona z wykorzystaniem zestawu OverLap Assembly mix (A&A Biotechnology)[Mat. 8].

8. Reakcje trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia DNA wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC i DNA plazmidów rekombinantowych prowadzono przez 120 min w temperaturze 37°C. Reakcje przeprowadzono z użyciem enzymów restrykcyjnych z dodatkiem odpowiednich buforów zalecanych przez producenta [Mat. 7].

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej w przypadku trawienia DNA wektora ekspresyjnego

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
DNA wektora pET-30 Ek/LIC [250 ng/μl]	25
Bufor CutSmart 10 ×	3
Enzym <i>Bam</i> HI [20 U]	1
Enzym <i>Nde</i> I [20 U]	1
Objętość końcowa	30

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej w przypadku trawienia DNA plazmidów rekombinantowych – analiza restrykcyjna

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
DNA plazmidu rekombinantowego [250 ng/μl]	17
Bufor CutSmart 10 ×	2
Enzym <i>Bam</i> HI lub <i>Xho</i> I [20 U]	1
Objętość końcowa	20

9. Reakcja Gibsona

Reakcja Gibsona z wykorzystaniem zestawu OverLap Assembly mix [Mat. 8] prowadzono w termocyklerze [Mat. 2] w 50°C przez 60 min. Skład mieszaniny przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcji Gibsona

Składnik	Ilość [μ l]
Bufor 5 × OverLap Assembly (A&A Biotechnology)	4
dNTPs [10 μ M]	2
Enzymy OverLap Assembly (A&A Biotechnology)	2
Woda jałowa	3
DNA insertu I [150 ng/ μ l]	3
DNA insertu II [150 ng/ μ l]	3
DNA wektora [150 ng/ μ l]	3
Objętość końcowa	20

DNA insertu I – gen kodujący białko wiążące DNA

DNA insertu II – gen kodujący polimerazę DNA TaqStoffel

DNA wektora – plazmidowe DNA pET-30 Ek/LIC po trawieniu enzymem *Bam*HI

Po reakcji całą mieszaninę (20 μ l) dodano do 100 μ l komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 [Met. 11].

10. Hodowle bakteryjne

10.1. Hodowle w pożywce płynnej

Hodowlę szczepów bakteryjnych *E. coli* TOP10 [Mat. 13] prowadzono w podłożu płynnym LB bez dodatku antybiotyku, w wytrząsarce w temperaturze 37°C przez ok. 16 h [Mat. 2]. Komórki *E. coli* TOP10 z DNA plazmidu rekombinantowego hodowane były w podłożu LB z dodatkiem kanamycyny (50 μ g/ml). W celu uzyskania ekspresji, komórki *E. coli* BL RIL [Met. 11] transformowano plazmidem rekombinantowym. Hodowla zaszczepiana była eżą z płytki lub przez dodatek hodowli płynnej do LB z dodatkiem chloramfenikolu i kanamycyny [Mat. 4].

10.2. Hodowle na podłożu stałym

Komórki *E. coli* TOP10 [Mat. 13] po transformacji wysiewane były na podłoże stałe LA z dodatkiem kanamycyny, natomiast komórki *E. coli* BL RIL [Mat. 13] na płytki z dodatkiem kanamycyny i chloramfenikolu [Mat. 4]. Tak wysiane płytki inkubowano przez ok. 16 h w 37°C, a następnie przechowywano w 4°C.

11. Transformacja komórek *E. coli* rekombinantowym DNA

11.1 Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*

Komórki *E. coli* TOP10 lub *E. coli* BL RIL [Mat. 13] zaszczepiono w 2 ml LB [Mat. 4, Met. 10.1]. Hodowlę prowadzono przez 16 h w 37°C i odmłodzono w 50 ml LB do osiągnięcia $OD_{600} = 0,2 - 0,3$. Otrzymaną hodowlę zwirowano (10 min, 3000 obr/min,

4°C), a osad zawieszono w 50 ml zimnego (4°C) 100 mM chlorku wapnia [Mat. 3]. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano w lodzie przez 16 h i ponownie zwirowano (10 min, 3000 obr/min, 4°C), a otrzymany osad zawieszono w 1 ml 100 mM schłodzonego chlorku wapnia [Mat. 3]. Tak przygotowane komórki kompetentne przechowywano w lodzie.

11.2 Transformacja komórek kompetentnych *E. coli*

Mieszaninę po reakcji Gibsona [Met. 9] (lub wyizolowane DNA plazmidów rekombinantowych [Met. 12]) dodano do 100 µl komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 (lub *E. coli* BL RIL [Mat. 13]) [Met. 11.1]. Otrzymaną mieszaninę inkubowano w lodzie przez 40 min. Po tym czasie inkubacji przeprowadzono szok termiczny polegający na umieszczeniu wyżej wymienionej mieszaniny na 60 s w termobloku o temperaturze 42°C, a następnie inkubowano przez 2 min w lodzie. Po szoku termicznym do mieszaniny dodano 600 µl LB [Mat. 4] i poddano inkubacji w temperaturze 37°C przez 60 min. Po tym czasie mieszaninę zwirowano (10 min, 1800 obr/min), odrzucono 500 µl przesączu, osad zawieszono w pozostałej ilości supernatantu i wysiano na płytce z podłożem LA z dodatkiem kanamycyny lub kanamycyny i chloramfenikolu [Mat. 4]. Płytki inkubowano przez ok. 16 h w 37°C.

12. Sprawdzenie obecności DNA insertu

12.1 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą analizy restrykcyjnej

Wstępną selekcję otrzymanych klonów przeprowadzono stosując analizę wielkości plazmidów rekombinantowych w stosunku do DNA wektora (retardacja w żelu agarozowym) a następnie zastosowano analizę restrykcyjną.

Wyizolowane plazmidowe rekombinantowe DNA [Met. 2] oraz DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC [Met. 13] poddano rozdzielni elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3] w celu potwierdzenia opóźnienia migracji plazmidów rekombinantowych względem DNA plazmidu ekspresyjnego (pET-30 Ek/LIC). DNA opóźnionych plazmidów rekombinantowych poddano następnie analizie restrykcyjnej po zastosowaniu reakcji trawienia enzymem *Bam*HI [Mat. 7, Met. 8] przez 2 h w 37°C. Produkty reakcji trawienia analizowano przy pomocy rozdzielni elektroforetycznej w 1% żelu agarozowym [Mat. 9, Met. 3].

12.2 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą sekwencjonowania

W celu określenia poprawności klonowania oraz wykluczenia ewentualnych mutacji punktowych w DNA insertu, otrzymane DNA plazmidów rekombinantowych poddano sekwencjonowaniu w firmie Genomed (Polska) przy użyciu starterów pET_up i pET_ter [Mat. 6]. Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu GeneDoc 2.7.0 oraz ClustalX2 [Met. 30].

13. Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne

13.1 Optymalizacja warunków ekspresji

Pożywkę płynną LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu [Mat. 4] zaszczepiono szczep bakterii *E. coli* BL RIL, zawierającym plazmid rekombinantowy i hodowano je przez ok. 16 h w 37°C. Następnie hodowlę odmłodzono w 20 ml LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu [Mat. 4]. Hodowlę prowadzono w 30°C do czasu osiągnięcia $OD_{600} = 0,3 - 0,4$. Po tym czasie przeprowadzono indukcję IPTG o końcowym stężeniu 1 mM [Mat. 4] i pobierano 1 ml próbki po 5 h i 16 h od indukcji. Próbkę zwirowano (2 min, 5000 obr/min) i zawieszano w 100 μ l TE [Mat. 18], a następnie przeprowadzono ich rozdział w żelu poliakrylamidowym [Mat. 10, Met. 4].

13.2 Ekspresja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA w objętości 1000 ml pożywki

Szczepy bakteryjne *E. coli* BL RIL zawierające plazmid rekombinantowy zaszczepiono w pożywkę płynną LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu [Mat. 4] i hodowano w wytrząsarce [Mat. 2] przez ok. 16 h w 37°C. Hodowlę odmłodzono w 1 l LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu [Mat. 4]. Hodowlę prowadzono w 30°C do czasu osiągnięcia $OD_{600} = 0,3 - 0,4$. Po tym czasie przeprowadzono indukcję z zastosowaniem IPTG o stężeniu końcowym 1 mM [Mat. 4]. Hodowlę bakteryjną zwirowano (12 min, 5000 obr/min) po 5 h od indukcji. Otrzymany osad gotowy do dalszego oczyszczania przechowywano w temperaturze -20°C.

14. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii metalopowinowactwa

Pierwszy etap oczyszczania fuzyjnych polimeraz DNA został przeprowadzony na kolumnie ze złożem His-Trap (GE Healthcare) [Mat. 2]. Proces ten składał się z następujących etapów:

- Osad hodowli bakteryjnej zawieszono w 15 ml buforu A₀ [Mat. 11] i poddano sonikacji w lodzie (5 × 60 s, 23 kHz, amplituda 5 μ m).
- Lizat komórkowy zwirowano (20 min, 14000 obr/min).
- Uzyskany przesącz zawierający białka gospodarza poddano termicznej denaturacji (15 min, 80°C) i zwirowano (20 min, 14000 obr/min).
- Kolumnę zawierającą ok. 5 ml złoża His-Trap zrównoważono 50 ml buforu A [Mat. 11], a następnie naniesiono otrzymany po wirowaniu supernatant zawierający preparat białkowy.
- Złoże płukano 200 ml buforu A [Mat. 11] w celu usunięcia zanieczyszczeń preparatu innymi białkami.
- Białka eluowano 30 ml buforu B (w przypadku fuzyjnych polimeraz DNA) lub buforem C (w przypadku polimerazy DNA TaqStoffel) [Mat. 11].

- Frakcje zebrano i poddano rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE [Mat. 10, Met. 4].
- Po zakończeniu oczyszczania, złoże zregenerowano przepłukując je 2% SDS i 50 mM EDTA oraz nanosząc roztwór chlorku niklu, złoże przechowywano w 20% roztworze etanolu [Mat. 11].

15. Usuwanie DNA z preparatów białkowych

W celu usunięcia śladowych ilości bakteryjnego DNA, preparaty białkowe uzyskane po oczyszczaniu z użyciem metody chromatografii metalopowinowactwa poddano działaniu benzonazy [Mat. 3], która posiada zdolność trawienia wszystkich rodzajów kwasów nukleinowych. Dodano do niego 1 M $MgCl_2$ do końcowego stężenia 5 mM oraz 5 U benzonazy [Mat. 3] i inkubowano przez 1 h w 37°C. Po tym czasie dokonano dezaktywacji termicznej benzonazy poprzez inkubację w 95°C przez 15 min.

16. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii żelowej

W kolejnym etapie oczyszczania fuzyjnej polimerazy DNA oraz polimerazy DNA TaqStoffel zastosowano chromatografię żelową (sączenie molekularne), która umożliwiła usunięcie benzonazy z preparatu białkowego. Kolumnę chromatograficzną HiLoad 16/600 Superdex 75 Prep Grade (GE Healthcare) [Mat. 2] podłączoną do systemu AKTA Purifier (GE Healthcare) [Mat. 2], przemyto jałową wodą destylowaną (250 ml, 0,8 ml/min), a następnie zrównoważono buforem do sączenia molekularnego [Mat. 12] (100 ml, 0,8 ml/min). Wykonano serię rozdzielów chromatograficznych 2,5 ml próbek zawierających kolejno: NeqSSB-TaqS, RB69SSB-TaqS, TtePriB-TaqS, DBD-TaqS oraz TaqStoffel. Każdorazowo przez kolumnę przepuszczano 40 ml buforu do sączenia molekularnego [Mat. 12] przy stałej prędkości przepływu 0,8 ml/min. Po przeprowadzeniu sączenia molekularnego wszystkich białek, kolumnę przemyto 150 ml jałowej wody destylowanej i 100 ml 20% etanolu [Mat. 3] przy stałej prędkości przepływu 0,8 ml/min. 20 μ l tak oczyszczonego preparatu rozdzielano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3] w celu sprawdzenia obecności DNA w próbce.

17. Dializa oczyszczonych preparatów białkowych

Preparaty białkowe wolne od DNA poddano dializie w buforze D [Mat. 1, Mat. 11] w stosunku co najmniej 1:50. Proces prowadzono w 2 l kolbie [Mat. 1] przez 48 h w 4°C, przy wykorzystaniu mieszadła magnetycznego [Mat. 2]. Po trzykrotnej dializie, białka zatężono przy pomocy kolumnienek filtracyjnych (Millipore) o punkcie odcięcia 10 kDa [Mat. 2]. Następnie do buforu dodano pozostałe składniki służące stabilizacji (bufor E) w celu przechowywania preparatu w temperaturze -20°C [Mat. 11].



18. Badanie pozostałości kwasów nukleinowych w preparatach białkowych

Sprawdzenie pozostałości DNA *E. coli* w oczyszczonych preparatach fuzyjnych polimeraz DNA zostało przeprowadzone trzema metodami: rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3], pomiar spektrofotometryczny przy pomocy aparatu NanoDrop 2000 (ThermoFisherScientific) [Mat. 2] oraz amplifikacja fragmentu DNA polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA *E. coli*.

18.1. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA metodą elektroforetyczną

Metoda ta polegała na rozdziale elektroforetycznym oczyszczonych preparatów białkowych (20 µl) w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3]. W przypadku stwierdzenia braku obecności DNA w badanych polimerazach DNA, poddano je dodatkowym testom tzn. spektrofotometrycznym oraz z użyciem reakcji PCR opisanych poniżej.

18.2. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA metodą spektrofotometryczną

Badanie polegało na pomiarze ilości jedno- i dwuniciowego DNA w preparatach białkowych za pomocą spektrofotometru NanoDrop (ThermoFisherScientific) [Mat. 2] nanosząc po 1 µl próbki. W przypadku braku wykrytego DNA, polimerazy DNA poddano badaniu z użyciem reakcji PCR.

18.3. Badanie obecności DNA w preparatach fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem reakcji PCR

Metoda ta polegała na przeprowadzeniu reakcji amplifikacji fragmentu DNA regionu 16S-23S rDNA *Escherichia coli* z zastosowaniem badanych polimeraz DNA (tabela 18 i 19) i starterów L1, G1 [Mat. 6]. Detekcję przeprowadzano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3]. Równocześnie przeprowadzono reakcję PCR przy użyciu 1 U komercyjnej polimerazy DNA TaqNova (Blirt) oraz polimerazy Phusion (ThermoFisherScientific) [Mat. 6]. Kontrolnie, dla każdej z polimeraz DNA, przeprowadzono reakcję PCR w warunkach przedstawionych w tabeli 18 i 19 z dodatkiem 10 ng genomowego DNA *E. coli* (kontrola pozytywna).

Tabela 18. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	15	
Przyłączanie starterów	56	15	25

Elongacja	72	15	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa	11,9
Bufor Shark pH 8,3 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter L1 [10 μM]	0,8
Starter G1 [10 μM]	0,8
Fuzyjna polimeraza DNA	1
Genomowe DNA <i>E. coli</i> [100 ng/μl]	-
Objętość końcowa	20

19. Określenie optymalnych warunków amplifikacji fuzyjnych polimeraz DNA

19.1 Dobór optymalnego buforu

Dobór optymalnego buforu do amplifikacji DNA dla badanych polimeraz DNA ustalono z użyciem reakcji PCR stosując dostępne komercyjnie bufony [Mat. 6]. Reakcję prowadzono z użyciem starterów SapO oraz 300/800 [Mat. 6] z wykorzystaniem jako matrycy DNA plazmidu pET-30a(+) [Mat. 13] w seryjnych 2-krotnych rozcieńczeniach polimerazy DNA. Warunki reakcji przedstawiono w tabelach 20 i 21. Wyniki amplifikacji DNA obserwowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 20. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	15	
Przyłączanie starterów	55	15	25
Elongacja	72	15	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 21. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa	×
Bufor Shark pH 8,3 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter SpaO [10 μM]	0,8
Starter 300/800 [10 μM]	0,8



Fuzyjna polimeraza DNA	1/0,5/0,25/0,125
Plazmidowe DNA pET-30a(+) [120 ng/ μ l]	0,1
Objętość końcowa	20

19.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu

Określenia wpływu jonów Mg^{2+} na amplifikację DNA dokonano z wykorzystaniem reakcji PCR [Mat. 6, Met. 19.1], którą prowadzono przy wzrastającym stężeniu soli $MgCl_2$ (0-9 mM) w buforze reakcyjnym wybranym jako optymalny dla badanych polimeraz DNA metodą opisaną w pkt. 19.1 metod. Detekcji dokonano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

19.3. Dobór optymalnego stężenia chlorku potasu lub siarczanu (VI) amonu

Zbadano wpływ stężenia soli KCl (10-90 mM) oraz $(NH_4)_2SO_4$ (10-90 mM) na wydajność reakcji PCR [Mat. 6, Met. 19.1] z wykorzystaniem badanych polimeraz DNA w odpowiednim buforze reakcyjnym, wybranym jako optymalny dla badanych polimeraz DNA metodą opisaną w pkt. 19.1 metod. Detekcji dokonano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

19.4. Dobór optymalnego pH buforu reakcyjnego

Optymalne pH buforu reakcyjnego określono stosując zakres pH od 7,2 do 9,0 (z zachowaniem optymalnego składu buforu dla badanych polimeraz DNA) [Mat. 6, Met. 19.1]. Detekcji dokonano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

20. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych polimeraz DNA

Aktywność enzymatyczna (U/ μ l) badanych preparatów została określona za pomocą komercyjnego zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit firmy Biotium [Mat. 17]. Zestaw ten wykorzystuje zależność poziomu fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji DNA.

Wyznaczenie jednostek aktywności badanych polimeraz było oparte na określeniu ilości nukleotydów wbudowanych w czasie 30 min dla izotermicznej reakcji prowadzonej w temperaturze optymalnej dla polimerazy DNA (TaqPol 72°C). Reakcje izotermiczne prowadzono w aparacie do real-time PCR [Mat. 2] według poniższej procedury:

1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej zgodnie z zaleceniami producenta stosując seryjne 2-krotne rozcieńczenia badanych polimeraz DNA (tabela 22). Pomiaru fluorescencji dokonywano z wykorzystaniem aparatu do real-time PCR zgodnie z profilem reakcji producenta zestawu przedstawionym w tabeli 23.

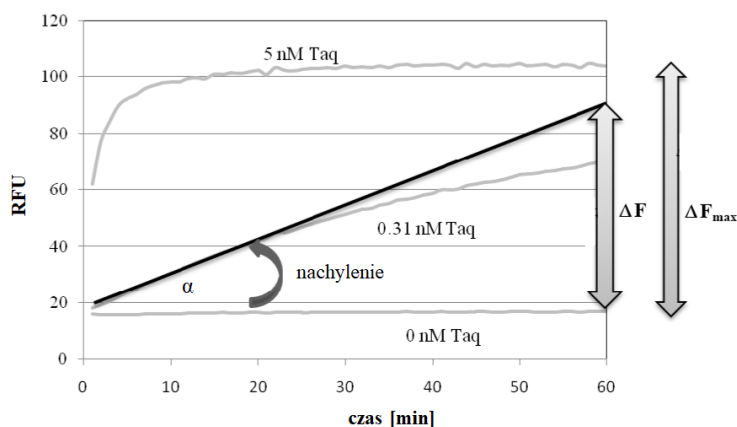
Tabela 22. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	×
2 × stężony mix EvaEZ Polymerase Activity	5
Fuzyjna polimeraza DNA	1/0,5/0,25.../0,0075
Objętość końcowa	10

Tabela 23. Profil temperaturowo-czasowy izotermicznej reakcji wydłużania startera

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Szybkość grzania [$^{\circ}$ C/s]	Ilość cykli
Elongacja	72	13	4	200

- Sporządzenie wykresu zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji i wyznaczenie krzywej, która w jak największym stopniu zbliżona jest do linii prostej.
- Wyznaczenie nachylenia krzywej i różnicy fluorescencji (ΔF) :
 $\Delta F = \text{tg}\alpha \times t$
 $\text{tg}\alpha$ – nachylenie krzywej [RFU/min]
 t – czas [min]
- Wyznaczenie maksymalnej różnicy poziomu fluorescencji (ΔF_{max}), co przedstawione zostało na rysunku 17.

**Rysunek 17.** Wykres zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji z zaznaczonym kątem nachylenia krzywej (α), różnicą fluorescencji krzywej, która w jak największym stopniu zbliżona jest do linii prostej (ΔF) oraz maksymalnej różnicy fluorescencji (ΔF_{max}) (rysunek producenta)

- Wyznaczenie ilości przyłączonych nukleotydów podczas reakcji według wzoru:
 $n = (\Delta F / \Delta F_{\text{max}}) \times 0,135 \text{ nmol}$
 n – ilość przyłączonych nukleotydów
0,135 nmol – ilość dostępnych nukleotydów w mieszaninie reakcyjnej. Reakcję prowadzono w 10 μ l, a nie 20 μ l jak proponuje producent, dlatego ilość nukleotydów została zmniejszona 2-krotnie.

6. Określenie jednostkowości zgodnie z definicją wskazującą, że 1 jednostka polimerazy DNA (1 U) to ilość polimerazy DNA, która jest w stanie wbudować 10 nmol dNTP w temperaturze 72°C w czasie 30 minut (35)

Stąd:

$$u = n \times \frac{1}{N}$$

u – ilość jednostek aktywności polimerazy DNA [U]

N – ilość nukleotydów wynosząca 10 nmol

21. Określenie termostabilności fuzyjnych polimeraz DNA

W celu określenia termostabilności badanych polimeraz DNA postępowano zgodnie z protokołem, opisanym przez Dąbrowski i Kur (95), inkubując polimerazy DNA w temperaturze 95°C i 99°C w czasie od 0 do 60 min, a następnie przeprowadzając reakcję PCR. Reakcję prowadzono w optymalnym buforze reakcyjnym dla badanych polimeraz DNA [Met. 19] z użyciem starterów SpaO oraz 300/800 [Mat. 6] z wykorzystaniem jako matrycy DNA plazmidu pET-30a(+) [Mat. 13]. Warunki reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabelach 20 i 24. Detekcji dokonano przy pomocy rozdziła elektroforetycznego w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa	11,8
Bufor pH 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter SpaO [10 μM]	0,8
Starter 300/800 [10 μM]	0,8
Polimeraza DNA [1 U/μl]	1
Plazmidowe DNA pET-30a(+) [120 ng/μl]	0,1
Objętość końcowa	20

22. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych polimeraz DNA

Procesywność badanych polimeraz DNA określono z wykorzystaniem izotermicznej reakcji z zastosowaniem aparatu do real-time PCR [Mat. 2]. Reakcję przeprowadzono w termobloku wyposażonym w klapę grzejną [Mat. 2] w oparciu o procedurę przedstawioną w publikacji Elshawadfy i współpracowników (96). Reakcję przeprowadzono w optymalnej dla polimerazy DNA Taq temperaturze wydłużania 72°C. Zastosowano definicję procesywności rozumianej jako ilość nukleotydów wbudowywanych podczas jednej reakcji katalitycznej (97).

W celu zapewnienia warunków jednokrotnego przyłączenia się polimerazy DNA do nici DNA reakcję prowadzono w obecności „pułapki” – heparyny, która



wykazuje wysokie powinowactwo do polimerazy DNA (98). Reakcję przeprowadzono w termobloku według poniższej przedstawionych etapów:

1. Inkubacja mieszaniny reakcyjnej z polimerazą DNA w 50°C przez 5 min o składzie przedstawionym w tabeli 25.

Tabela 25. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	43
Bufor pH 8,0 10 ×	10
dNTPs [10 mM]	20
Starter P [10 μ M]	4
Starter T [10 μ M]	4
Barwnik EvaGreen	3
Polimeraza DNA 1 U/ μ l	1
Objętość końcowa	85

2. Inicjacja reakcji przez dodanie 15 μ l Mg^{2+} [50 mM] oraz 15 μ l heparyny [0,6 mg/ μ l] i przeniesienie do termobloku o temperaturze 72°C.

3. Pobieranie po 10 μ l próbki w różnych odstępach czasu: 0, 1, 2, 5 i 10 min i schłodzenie w lodzie.

4. Detekcja otrzymanych fragmentów DNA.

Detekcję uzyskanych fragmentów DNA przeprowadzono przy użyciu termocyklera MyGo [Mat. 3]. Dla powstających produktów DNA w różnym czasie wyznaczano temperaturę topnienia. Reakcja była prowadzona w warunkach temperaturowo-czasowych przedstawionych w tabeli 26.

Tabela 26. Warunki temperaturowo-czasowe reakcji

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Szybkość grzania/chłodzenia [°C/s]
Denaturacja	95	10	5
Etap początkowy	60	60	4
Etap końcowy	97	1	0,201

Wyznaczenie procesywności badanych polimeraz DNA polegało na porównaniu temperatury topnienia produktów powstających w reakcji amplifikacji. Wyższa temperatura ich topnienia świadczyła o powstaniu dłuższego fragmentu DNA, a tym samym większej procesywności badanych polimeraz DNA. Precyzyjne określenie procesywności polegało na porównaniu uzyskanych profili temperaturowych badanych polimeraz DNA z wcześniej otrzymanymi profilami fragmentów DNA o ściśle określonej długości służących jako markery. Wyznaczenie ilości wbudowanych nukleotydów było możliwe dzięki wyznaczeniu temperatury topnienia amplikonów. W celu uzyskania profili topnienia fragmentów DNA markerowych przeprowadzono reakcje hybrydyzacji (warunki przedstawiono w tabeli 27) matrycy DNA (oligomer T) [Mat. 6, tabela 7] ze starterami (kolejno P1, P2..., P22) komplementarnymi do oligomeru T dłuższymi względem siebie kolejno o 1, 2, 3..., 22 nukleotydy [Mat. 6, tabela 8], a tak uzyskane

zhybrydizowane fragmenty DNA poddano procesowi topnienia (tabela 26). Otrzymane wyniki dla fragmentów DNA markerowych i sekwencje użytych starterów, które posłużyły otrzymaniu markerów przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 27. Warunki temperaturowo-czasowe procesu hybrydyzacji

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Szybkość grzania/chłodzenia [°C/s]
Denaturacja	99	1	5
Hybrydyzacja	4	∞	1

Tabela 28. Temperatury topnienia fragmentów DNA markerowych

Ilość dobudowanych dNTPs	Temperatura topnienia zhybrydizo- wanego DNA [°C]	Sekwencja startera
(Matryca DNA)	-	3'CCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGACCGTTCGTTCGAACAGAGTACCTG GCTAT
1 nt	73,34	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG
2 nt	74,27	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGG
3 nt	74,97	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGC
4 nt	75,84	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCA
5 nt	75,96	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAA
6 nt	76,21	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAG
7 nt	76,39	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGC
8 nt	76,68	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCA
9 nt	77,31	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAA
10 nt	77,65	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAG
11 nt	77,89	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGC
12 nt	78,03	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCT
13 nt	78,22	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTT
14 nt	78,53	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTG
15 nt	78,64	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGT
16 nt	78,75	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTG
17 nt	79,61	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCT
18 nt	79,94	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTC
19 nt	80,42	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCA
20 nt	80,72	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCAT
21 nt	81,23	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCATG
22 nt	82,06	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCATGG

23. Oznaczenie szybkości syntezy DNA dla fuzyjnych polimeraz DNA

Badanie szybkość syntezy DNA, rozumianej jako ilość nukleotydów wbudowywanych przez 1 U polimerazy DNA w ciągu jednej sekundy (nt/s) (74), przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR stosując różne czasy wydłużania od 5 s do 60 s. Jako matrycy DNA użyto plazmidowego DNA pET-30a(+) oraz starterów w następujących konfiguracjach: startery SpaO i 300/800 (produkt DNA 300 pz), startery SpaO i 500/1000 (produkt DNA 500 pz), startery 1KB 500/1000 (produkt DNA 1000 pz), oczekując produktów o długości 300 pz, 500 pz i 1000 pz zgodnie z warunkami podanymi w tabelach 29 i 30. Detekcji dokonano przy pomocy rozdzielania elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 29. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	15	
Przyłączanie starterów	55	15	25
Elongacja	72	5/10/15...60	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 30. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa	11,8
Bufor pH 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter SpaO lub 1KB [10 μM]	0,8
Starter 300/800 lub 500/1000 [10 μM]	0,8
Polimeraza DNA 1 U/μl	1
Plazmidowe DNA pET-30a(+) [120 ng/μl]	0,1
Objętość końcowa	20

24. Badanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA

Badanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA prowadzono przy użyciu reakcji PCR w oparciu o protokół opisany przez Halley i Prezioso (99). Reakcję PCR prowadzono w warunkach zoptymalizowanych dla polimerazy DNA [Met. 19], z wykorzystaniem jako matrycy plazmidowego DNA pET-28a(+) oraz starterów pET_F i pET_R [Mat. 6].

Oczekiwana wielkość produktu PCR to 1264 pz. Reakcję prowadzono z zastosowaniem 10-krotnych seryjnych rozcieńczeń plazmidowego DNA pET-28a(+) w zakresie od 10-krotnego do 10 000 000-krotnego rozcieńczenia, zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabelach 31 i 32. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].



Tabela 31. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	15	
Przyłączanie starterów	55	15	25
Elongacja	72	60	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 32. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa	x
Bufor pH 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter pET_F [10 mM]	0,8
Starter pET_R [10 mM]	0,8
Polimeraza DNA 1 U/μl	1
Plazmidowe DNA pET-28a(+) [300 ng/ul]	10 ⁻¹ -10 ⁻⁷
Objętość końcowa	20

25. Określenie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA przez fuzyjne polimerazy DNA

Wydajność amplifikacji długich fragmentów DNA przez badane polimerazy DNA zbadano w oparciu o metodę zaproponowaną przez Kwona i współpracowników (100). Do reakcji PCR wykorzystano jako matrycę genomowe DNA *E. coli* [Mat. 13] oraz startery pozwalające na otrzymanie trzech różnej długości produktów: 5 kpz (startery Eco_F i R5), 8 kpz (startery Eco_F i R8) oraz 10 kpz (startery Eco_F i R10) [Mat. 6]. Zastosowano ten sam profil temperaturowo-czasowy z uwzględnieniem jedynie różnych czasów elongacji (60s na 1kpz). Otrzymane produkty rozdzielano w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3]. Profil reakcyjny i skład mieszaniny przedstawiają tabele 33 i 34.

Tabela 33. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	30	
Przyłączanie starterów	56	30	30
Elongacja	72	60 s/kpz	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 34. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	11,8
Bufor pH 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter Eco_F [10 mM]	0,8
Starter R5 lub R8 lub R10 [10 mM]	0,8
Polimeraza DNA 1 U/ μ l	1
Genomowe DNA <i>E. coli</i> [100 ng]	0,1
Objętość końcowa	20

26. Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC

Aby określić zdolność badanych polimeraz DNA do amplifikacji DNA bogatego w pary GC wykorzystano jako matrycę genomowe DNA wyizolowane z *Mycobacterium tuberculosis* [Mat. 13, 14, Met. 1]. Do reakcji PCR użyto startery Myc_F i Myc_R [Mat. 6], które pozwoliły na otrzymanie fragmentu DNA wielkości 301 pz o zawartość 78% par GC. Reakcje prowadzono w warunkach zoptymalizowanych dla badanych polimeraz DNA ze wzrastającą ilością polimerazy DNA. Warunki temperaturowo-czasowe oraz skład mieszaniny podano w tabelach 35 i 36. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 35. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja	95	15	
Przyłączanie starterów	64	15	35
Elongacja	72	15	
Wydłużanie końcowe	72	120	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 36. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	×
Bufor pH 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter Myc_F [10 mM]	0,8
Starter Myc_R [10 mM]	0,8
Polimeraza DNA 1 U/ μ l	1-8*
Genomowe DNA <i>M. tuberculosis</i> [50 ng/ μ l]	1
Objętość końcowa	20

* dla polimerazy DNA referencyjnej TaqStoffel użyto do reakcji PCR 1 – 8 U polimerazy, dla fuzyjnych polimeraz DNA 1 - 3 U.

27. Badanie odporności fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory

27.1 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji w obecności laktoferyny i heparyny jako inhibitorów z krwi

Określenie wrażliwości badanych polimeraz DNA na inhibitory przeprowadzono za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem plazmidowego DNA pET-30a(+) [Mat. 13], starterów SpaO i 300/800 [Mat. 6] oraz dodatku poszczególnych inhibitorów – laktoferyny (w zakresie stężeń 0,84 μg - 54 μg) i heparyny (w zakresie stężeń 4,7 ng - 600 ng) [Mat. 3]. Reakcję prowadzono w warunkach przedstawionych w tabelach 37 i 38. Otrzymane produkty rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 37. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	15	
Przyłączanie starterów	55	15	25
Elongacja	72	15	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 38. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μl]
Woda jałowa + inhibitor	11,8
Bufor 8,0 10 \times	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter SpaO [10 μM]	0,8
Starter 300/800 [10 μM]	0,8
Polimeraza DNA 1U	1
Plazmidowe DNA pET-30a(+) [100 ng/ μl]	0,1

27.2 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji w obecności krwi pełnej

Odporność polimeraz DNA na hamujące działanie krwi pełnej zostało przeprowadzone z wykorzystaniem techniki PCR z zastosowaniem różnych źródeł matrycowego DNA: plazmidowe DNA, genomowe DNA, DNA pochodzące bezpośrednio z hodowli bakteryjnej oraz z wykorzystaniem krwi jako źródła DNA (z limfocytów).

27.2.1 Wykorzystanie plazmidowego DNA jako matrycy DNA w reakcji PCR w obecności krwi

Eksperyment przeprowadzono analogicznie do badania odporności na inhibitory z krwi [Met. 27.1] stosując wzrastające stężenie krwi [Mat. 3] od 0,2% (lub

0,3%) do 10%. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy przedstawiono w tabelach 37 i 38. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

27.2.2 Wykorzystanie genomowego DNA jako matrycy DNA w reakcji PCR w obecności krwi

Eksperyment odporności na inhibitory z krwi przeprowadzono z wykorzystaniem oczyszczonego genomowego DNA *Staphylococcus aureus* [Mat. 13] analogicznie jak w badaniu z plazmidowym DNA [Met. 27.2.1]. Amplifikacji poddano fragment genu *nucA* *Staphylococcus aureus* stosując startery Nuc1 i Nuc2 [Mat. 6] (101) i warunki amplifikacji przedstawione w tabelach 37 i 39. Otrzymane produkty rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 39. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa + inhibitor	11,8
Bufor 8,0 10 \times	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter Nuc1 [10 μ M]	0,8
Starter Nuc2 [10 μ M]	0,8
Polimeraza DNA 1 U	1
Genomowe DNA <i>S. aureus</i> [100 ng/ μ l]	0,1

27.2.3 Wykorzystanie DNA pochodzącego z hodowli bakteryjnej jako matrycy w reakcji PCR w obecności krwi

Eksperyment przeprowadzono analogicznie do badania odporności na inhibitory z krwi wykorzystując oczyszczone genomowe DNA [Met. 27.2.2] z tą różnicą, że matrycowe DNA zostało zastąpione 5 μ l hodowli bakteryjnej *Staphylococcus aureus* (OD₆₀₀ = 0,50) [Mat. 13] uprzednio inkubowanej 5 min w temperaturze 99°C. Warunki temperaturowo-czasowe oraz skład mieszaniny przedstawiają tabele 37 i 40. Otrzymane produkty rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 40. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa + inhibitor	6,9
Bufor 8,0 10 \times	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter Nuc1 [10 μ M]	0,8
Starter Nuc2 [10 μ M]	0,8
Polimeraza DNA 1 U	1
Hodowla bakteryjna <i>S. aureus</i> [OD ₆₀₀ = 0,50]	5



27.2.4 Wykorzystanie DNA pochodzącego z krwi jako matrycy w reakcji PCR

Eksperyment został przeprowadzony w oparciu o metodę przedstawioną przez Kermekchiev i współpracowników (68). Odporność na krew pełną została zbadana z użyciem starterów CCR5_1 i CCR5_2 [Mat. 6] komplementarnych do sekwencji ludzkiego genu *CCR5* (102) bez dodatku matrycy DNA z zewnątrz (tabela 40). Matrycą w reakcji PCR było DNA zawarte w limfocytach krwi. Reakcję prowadzono stosując seryjne dwukrotne rozcieńczenia krwi w mieszaninie reakcyjnej. Badany zakres stężenia krwi w mieszaninie wynosił od 0,15% do 10%. Warunki temperaturowo-czasowe oraz skład mieszaniny przedstawiają tabele 37 i 41. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3]

Tabela 41. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa + krew pełna	11,9
Bufor 8,0 10 ×	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter CCR5_1 [10 μ M]	0,8
Starter CCR5_2 [10 μ M]	0,8
Polimeraza DNA 1 U	1

28. Wpływ białek fuzyjnych rekombinantowych polimeraz DNA na amplifikację w warunkach wysokich temperatur hybrydyzacji starterów

Zbadano wpływ fuzyj białek wiążących się do DNA w rekombinantowych polimerazach w warunkach wysokich temperatur hybrydyzacji starterów stosowanych w celu podniesienia specyficzności reakcji. Jako matrycę do amplifikacji zastosowano fragment genu *CCR5* kodującego ludzki receptor dla β -chemokin. Materiałem wyjściowym było wyizolowane genomowe DNA ludzkie [Mat. 14. Met. 1]. Przeprowadzono serię reakcji PCR w warunkach zmiennej temperatury przyłączania starterów, podnosząc ją co 1°C począwszy od temperatury optymalnej 55°C do temperatury 72°C. Warunki temperaturowo-czasowe oraz skład mieszaniny przedstawiają tabele 42 i 43. Otrzymane produkty PCR rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3].

Tabela 42. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	60	1
Denaturacja	94	30	
Przyłączanie starterów	56	55,0/ 56,2,...72,0	25
Elongacja	72	15	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 43. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość [μ l]
Woda jałowa	11,8
Bufor pH 8,0 10 \times	2
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	2
Starter CCR5_1 [10 μ M]	0,8
Starter CCR5_2 [10 μ M]	0,8
Genomowe DNA ludzkie [120 ng/ μ l]	0,1
Polimeraza DNA 1 U	1

29. Badanie oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA i dsDNA

W celu wykazania zdolności badanych polimeraz DNA do wiązania różnych rodzajów DNA oraz wskazania ich preferencji do wiązania jedno- lub dwuniciowego DNA przeprowadzono test EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay). Test przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Olszewskiego i współpracowników (86). Badaną polimerazę DNA inkubowano z dodatkiem 10 pmol oligonuklotydów d(T)₇ [Mat. 3] znakowanych fluorescencyjnie na końcu 5' i 2,5 pmol produktu PCR o długości 100 pz przez 10 min w temperaturze pokojowej. Zastosowano następujące zakresy stężeń dla polimeraz DNA: 3,3 – 211,2 pmol dla fuzyjnych polimeraz DNA, 24,6 – 1574,4 pmol dla referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Po inkubacji całą mieszaninę rozdzielono w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3].

30. Używane programy komputerowe

- Vector NTI 6.0,
- Plasma DNA,
- Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator,
- NEBcutter 2.0,
- Expasy,
- ClustalX2,
- GeneDoc 2.7.0,
- GelAnalyzer,
- MolBiol.

ROZDZIAŁ 7

WYNIKI

Badania przedstawione w niniejszej pracy miały na celu zbadanie wpływu fuzji białek wiążących się do DNA z polimerazą DNA *Thermus aquaticus* na jej właściwości istotne w amplifikacji techniką PCR tj.: procesywność, czułość, wrażliwość na inhibitory, termostabilność, wydajność amplifikacji DNA w obecności tzw. Trudnych matryc itp. Cechy te są istotne dla reakcji PCR, która znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce molekularnej i inżynierii genetycznej.

Zaprojektowano 4 fuzyjne polimerazy DNA składające się z białka NeqSSB, RB69SSB, TtePriB i domeny wiążącej DNA (DBD), połączonych za pomocą sześćioaminokwasowego linkera z N-końcem polimerazy DNA TaqStoffel, tym samym zastępując domenę 5'→3' egzonukleolityczną w natywnej polimerazie DNA Taq. Pierwszy etap prac obejmował optymalizację otrzymywania i oczyszczania fuzyjnych polimeraz DNA: NeqSSB-TaqS, DBD-TaqS, RB69SSB-TaqS oraz TtePriB-TaqS, a także referencyjnej polimerazy DNA TaqStoffel. W drugim etapie badań opracowano metodykę niezbędną do charakterystyki fuzyjnych polimeraz DNA. Wyniki badań porównywano z rezultatami uzyskanymi dla referencyjnej polimerazy TaqStoffel. Następnie wskazano potencjalne zastosowania otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA oraz wyłoniono fuzyjną polimerazę DNA o najkorzystniejszych cechach pod względem jej użyteczności. Określono również cechy jakimi powinno odznaczać się białko jako kandydat do fuzji, co ma w przyszłości ułatwić racjonalne projektowanie innych fuzyjnych polimeraz DNA.

I. Otrzymywanie fuzyjnych polimeraz DNA

Rozdział ten przedstawia wyniki pracy związanej z otrzymaniem czterech różnych fuzyjnych polimeraz DNA TaqStoffel, które za pomocą sześćioaminokwasowego łącznika o sekwencji Gly – Ser – Gly – Gly – Val – Asp (77) połączono z jednym z białek (lub domeną) wiążącym kwasy nukleinowe: RB69SSB (pochodzącym z bakteriofaga RB69), TtePriB (z *Thermoanaerobacter tengcongensis*), NeqSSB (wyizolowanym z *Nanoarchaeum equitans*) oraz domeną DBD ligazy *Pyrococcus furiosus*. Otrzymywanie

fuzyjnych polimeraz DNA było związane z: klonowaniem metodą Gibsona, ekspresją genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA oraz ich oczyszczaniem.

1. Klonowanie genów kodujących białka RB69SSB- TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS

Klonowanie genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA miało na celu otrzymanie plazmidów ekspresyjnych pET-30-RB69SSB-TaqS, pET-30-NeqSSB-TaqS, pET-30-TtePriB-TaqS oraz pET-30-DBD-TaqS, a następnie transformacje komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP10.

1.1. Izolacja genomowego DNA

Wyizolowano genomowe DNA z mikroorganizmów *Thermus aquaticus* oraz *Pyrococcus furiosus* [Mat. 14, Met. 1], które stanowiły matryce DNA do reakcji PCR [Met. 7]. Otrzymano genomowe DNA o stężeniu ok. 100 ng/ul.

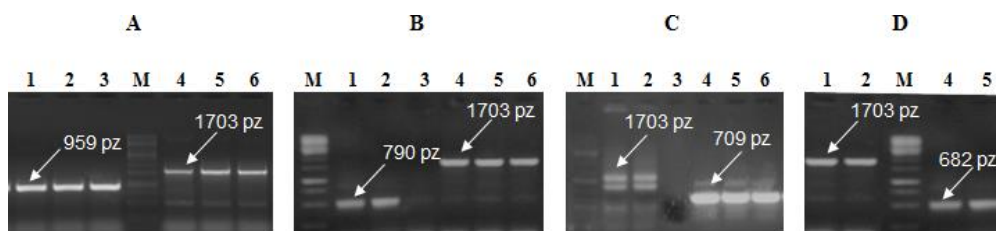
1.2 Amplifikacja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA

Przeprowadzono po dwie niezależne reakcje PCR, które doprowadziły do otrzymania pełnych konstruktów fuzyjnych polimeraz DNA: RB69SSB-TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS.

W pierwszej reakcji uzyskano produkt PCR o sekwencji nukleotydowej genu kodującego białko RB69SSB, NeqSSB, TtePriB lub DBD z dodatkową sekwencją łącznika oraz sekwencją komplementarną do 11 początkowych nukleotydów genu kodującego N-koniec polimerazy DNA TaqStoffel. Produkty amplifikacji posiadały odpowiednio długość 959, 790, 709 i 682 pz.

Drugi produkt PCR (o sumarycznej długości 1703 pz) zawierał sekwencję nukleotydową genu kodującego polimerazę DNA TaqStoffel poprzedzoną dodatkowymi nukleotydami łącznika oraz 11 dodatkowymi nukleotydami komplementarnymi do sekwencji nukleotydowej genu kodującego C-koniec białka fuzyjnego.

W reakcjach tych użyto par odpowiednio zaprojektowanych starterów [Mat. 6, Met. 7]. Otrzymane produkty reakcji PCR rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydydy [Met. 3, Mat. 9] (Rysunek 18).



Rysunek 18. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR w 1,5% żelu agarozowym.

M – marker wielkości DNA GeneRuler™ (75 – 20000 pz) [Mat. 5]

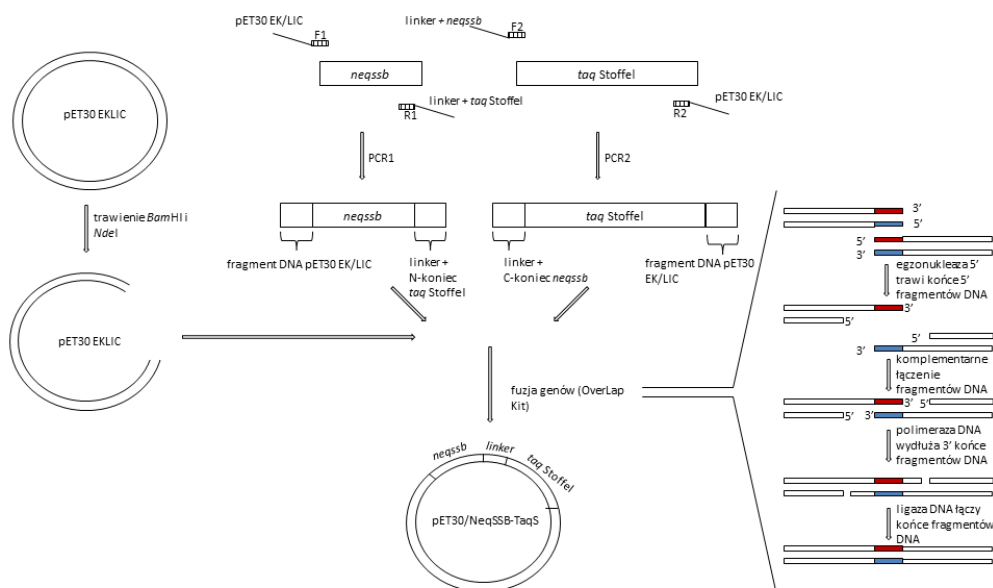
A: 1 – 3 – produkty amplifikacji genu *rb69ssb*



- 4 – 6 – produkty amplifikacji genu *taqstoffer*
- B: 1 – 2 – produkty amplifikacji genu *neqssb*
4 – 6 – produkty amplifikacji genu *taqstoffer*
- C: 1 – 2 – produkty amplifikacji genu *taqstoffer*
4 – 6 – produkty amplifikacji genu *tteprib*
- D: 1 – 2 – produkty amplifikacji genu *taqstoffer*
4 – 5 – produkty amplifikacji genu *dbd*

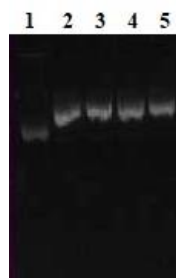
1.3 Klonowanie genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA do DNA wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC

Konstrukcja rekombinantowych plazmidów DNA zawierających geny kodujące białka RB69SSB-TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS obejmowała wycięcie produktów PCR z żelu agarozowego i oczyszczenie DNA metodą Gel-Out [Met. 5], reakcję trawienia DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC enzymami restrykcyjnymi *Bam*HI i *Nde*I [Met. 8] oraz reakcję fuzji genów z użyciem DNA insertów (kodujących białko fuzyjne i polimerazę DNA TaqStoffel) i DNA plazmidu [Met. 9]. Schemat klonowania na przykładzie DNA plazmidu zawierającego gen kodujący fuzyjną polimerazę DNA NeqSSB-TaqS przedstawiono na rysunku 19. Komórki kompetentne *E. coli* TOP10 transformowano tak otrzymanym plazmidem rekombinantowym [Met. 11], wysiewano na podłoże LA z dodatkiem kanamycyny [Mat. 4.] i hodowano ok. 16 h w 37°C. Otrzymane na podłożu stałym kolonie bakteryjne przenoszono na podłoże płynne LB z dodatkiem kanamycyny [Mat. 4] i prowadzono hodowlę w wytrząsarce [Mat. 2] w 37°C przez 16 godzin [Mat. 4, Met 10].



Rysunek 19. Schemat klonowania metodą Gibsona na przykładzie DNA plazmidu rekombinantowego zawierającego gen kodujący fuzyjną polimerazę DNA NeqSSB-TaqS [opracowanie własne]

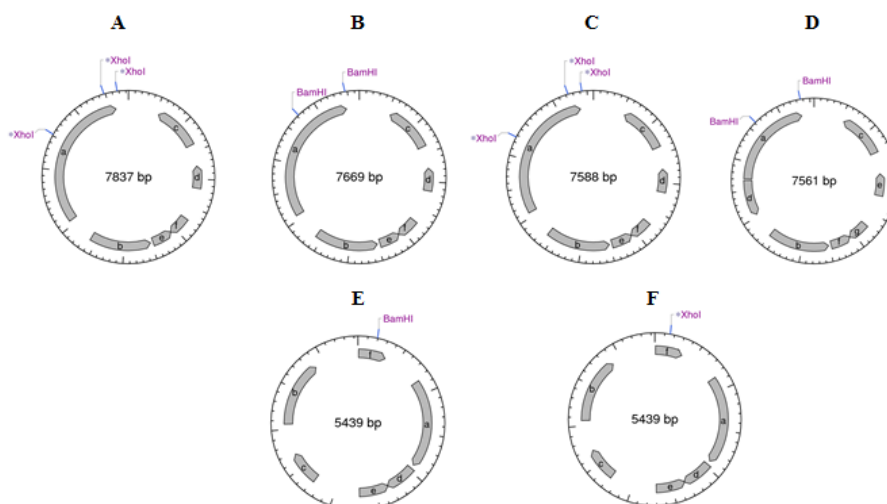
Hodowlę bakteryjną zwirowano i wyizolowano z niej plazmidowe DNA [Met. 2]. W oparciu o rozdział elektroforetyczny [Met. 3, Mat. 9] sprawdzono czy wykazują one opóźnienie względem wyjściowego DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC (rysunek 20).



Rysunek 20. Rozdział elektroforetyczny wyizolowanego DNA plazmidów rekombinantowych w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Met. 3, Mat. 9]. Na żel agarozowy nanoszono po 5 μ l DNA

- 1 – DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC (o wielkości 5439 pz)
- 2 – wyizolowane DNA plazmidu rekombinantowego RB69SSB-TaqS (o wielkości 7837 pz)
- 3 – wyizolowane DNA plazmidu rekombinantowego NeqSSB-TaqS (o wielkości 7669 pz)
- 4 – wyizolowane DNA plazmidu rekombinantowego TtePriB-TaqS (o wielkości 7588 pz)
- 5 – wyizolowane DNA plazmidu rekombinantowego DBD-TaqS (o wielkości 7561 pz)

W celu potwierdzenia czy DNA plazmidów rekombinantowych wykazujących opóźnioną migrację w żelu agarozowym zawiera właściwą wklonowaną sekwencję, poddano je analizie restrykcyjnej [Met. 12.1] z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych *Bam*HI lub *Xho*I [Mat. 7]. W przypadku DNA plazmidów rekombinantowych miejsce rozpoznania dla wyżej wymienionych enzymów znajduje się w co najmniej dwóch miejscach, podczas gdy w przypadku DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC występuje tylko jedno miejsce. Mapy plazmidów otrzymanych dzięki wykorzystaniu programu *NebCutter* [Met. 30] przedstawia rysunek 21.



Rysunek 21. Mapy plazmidów rekombinantowych oraz plazmidu pET-30 Ek/LIC z zaznaczonymi miejscami cięcia przez enzymy restrykcyjne [Met. 8]

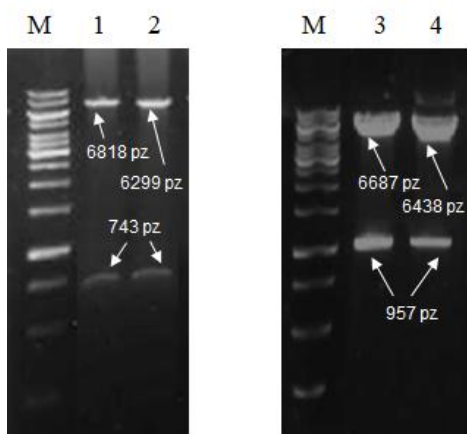


- A – mapa plazmidu pET30-RB69SSB-TaqS z miejscami cięcia dla enzymu *XhoI*
- B – mapa plazmidu pET30-NeqSSB-TaqS z miejscami cięcia dla enzymu *BamHI*
- C – mapa plazmidu pET30-TtePriB-TaqS z miejscami cięcia dla enzymu *XhoI*
- D – mapa plazmidu pET30-DBD-TaqS z miejscami cięcia dla enzymu *BamHI*
- E – mapa plazmidu pET-30 Ek/LIC z miejscem cięcia dla enzymu *BamHI*
- F – mapa plazmidu pET-30 Ek/LIC z miejscem cięcia dla enzymu *XhoI*

Po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi otrzymane fragmenty DNA rozdzielono metodą elektroforetyczną w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Met. 3, Mat. 9]. Otrzymane fragmenty DNA były zgodne z oczekiwanymi:

- dla pET30-RB69SSB-TaqS: 6687 pz, 957pz oraz 196 pz
- dla pET30-NeqSSB-TaqS: 6299 pz, 743 pz
- dla pET30-TtePriB-TaqS: 6438 pz, 957 pz, 196 pz
- dla pET30-DBD-TaqS: 6818 pz, 743 pz

Wynik rozdziału elektroforetycznego fragmentów DNA powstałych po reakcji trawienia przedstawia rysunek 22.



Rysunek 22. Wynik rozdziału elektroforetycznego fragmentów DNA powstałych po trawieniu enzymem restrykcyjnym (*BamHI* lub *XhoI*) w 1% żelu agarozowym

- M – marker wielkości DNA GeneRuler™ (75 – 20000pz) [Mat. 5]
- 1 – fragmenty DNA po trawieniu DNA plazmidu DBD-TaqS enzymem *BamHI*
- 2 – fragmenty DNA po trawieniu DNA plazmidu NeqSSB-TaqS enzymem *BamHI*
- 3 – fragmenty DNA po trawieniu DNA plazmidu RB69SSB-TaqS enzymem *XhoI*
- 4 – fragmenty DNA po trawieniu DNA plazmidu TtePriB-TaqS enzymem *XhoI*

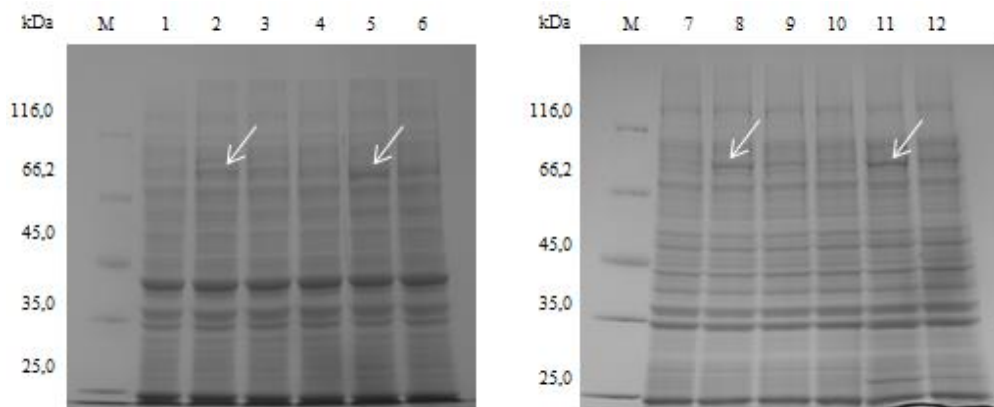
Wyniki analizy restrykcyjnej potwierdziły otrzymanie 4 plazmidów rekombinantowych: pET30-RB69SSB-TaqS, pET30-NeqSSB-TaqS, pET30-TtePriB-TaqS, pET30-DBD-TaqS, które zostały następnie poddane sekwencjonowaniu [Met. 12.2]. Porównanie sekwencji genu kodującego fuzyjną polimerazę DNA NeqSSB-TaqS przedstawia rysunek 23.



potwierdzono poprawność sekwencji DNA plazmidów rekombinantowych: pET30-RB69SSB-TaqS, pET-30-TtePriB-TaqS oraz pET30-DBD-TaqS.

2. Ekspresja genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA w komórkach bakteryjnych *E. coli* BL RIL

W celu uzyskania białek fuzyjnych, komórki *E. coli* BL RIL [Mat. 13, Met. 11.1] poddano transformacji z użyciem DNA plazmidów rekombinantowych pET30-RB69SSB-TaqS, pET30-NeqSSB-TaqS, pET-30-TtePriB-TaqS oraz pET30-DBD-TaqS [Met. 11.2] i przeprowadzono produkcję pożądaných białek fuzyjnych. Pierwszym etapem była pilotażowa produkcja białek pozwalająca zoptymalizować warunki ekspresji genów docelowych [Met. 13.1]. 2 ml pożywki LB z antybiotykami – kanamycyną i chloramfenikolem [Mat. 4] zaszczepiono kolonią *E. coli* zawierającą plazmidy rekombinantowe. Hodowle prowadzono przez 16 h w 37°C, a następnie przeniesiono do 100 ml LB zawierającego wyżej wymienione antybiotyki [Mat. 4]. Po osiągnięciu przez hodowle $OD_{600} = 0,3 - 0,5$ dodawano IPTG do końcowego stężenia 1 mM [Mat. 4]. Po indukcji hodowle prowadzono jeszcze przez 5 h i 16 h, po czym zwirowano (10 min, 5000 obr/min). Rezultaty produkcji białek analizowano za pomocą białkowej elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) [Mat. 10, Met. 4] (rysunek 24). Masa molekularna białek obliczona przy pomocy programu komputerowego Expasy [Met. 30] wynosiła: dla RB69SSB- TaqS - 93,8 kDa, dla TtePriB- TaqS - 86,5 kDa, dla NeqSSB- TaqS - 89,9 kDa, dla DBD-TaqS - 86,1 kDa.



Rysunek 24. Rozdziały elektroforetyczne przedstawiające wyniki produkcji fuzyjnych polimeraz DNA w 10% żelu poliakrylamidowym [Mat. 10, Met. 4]

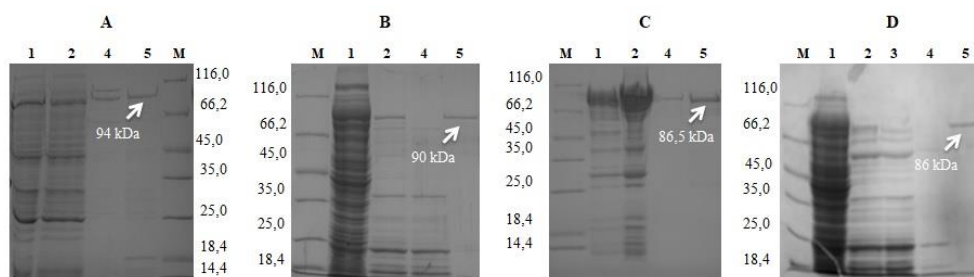
- M – Białkowy marker wielkości (14,6 – 116 kDa) [Mat. 5]
- 1 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-RB69SSB-TaqS przed indukcją
- 2 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-RB69SSB-TaqS, 5 h po indukcji 1 mM IPTG
- 3 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-RB69SSB-TaqS, 16 h po indukcji 1 mM IPTG
- 4 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-TtePriB-TaqS przed indukcją
- 5 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-TtePriB-TaqS, 5 h po indukcji 1 mM IPTG
- 6 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-TtePriB-TaqS, 16 h po indukcji 1 mM IPTG
- 7 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-NeqSSB-TaqS przed indukcją
- 8 - Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-NeqSSB-TaqS, 5 h po indukcji 1 mM IPTG

- 9 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-NeqSSB-TaqS, 16 h po indukcji 1 mM IPTG
 10 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-DBD-TaqS przed indukcją
 11 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-DBD-TaqS, 5 h po indukcji 1 mM IPTG
 12 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-DBF-TaqS, 16 h po indukcji 1 mM IPTG

Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że najbardziej wydajną produkcję białek rekombinantowych uzyskano po 5 h hodowli od czasu indukcji. W tak zoptymalizowanych warunkach przeprowadzono produkcję wszystkich fuzyjnych polimeraz DNA na większą skalę (w 1000 ml LB) [Mat. 4, Met. 13.2].

3. Oczyszczanie rekombinantowych białek RB69SSB-TaqS, NeqSSB-TaqS, TtePriB-TaqS oraz DBD-TaqS za pomocą chromatografii metalopowinowactwa

Po uzyskaniu ekspresji genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA w hodowlach o objętości 1000 ml każda, zwirowano je i lizaty komórkowe poddano dezintegracji komórek ultradźwiękami, termicznej denaturacji białek gospodarza i ponownemu odwirowaniu [Met. 14]. Tak otrzymane supernatanty naniesiono na kolumny do chromatografii metalopowinowactwa ze złożem His-Trap [Mat. 2, Met. 14]. Frakcje po elucji fuzyjnych polimeraz DNA zebrano, poddano analizie elektroforetycznej w warunkach SDS-PAGE [Mat. 10, Met. 4], a następnie dializie w buforze D [Mat. 11, Met. 17]. Wyniki rozdzielów elektroforetycznych przedstawiających stopień oczyszczenia i stężenie białek po każdym etapie oczyszczania przedstawia rysunek 25.



Rysunek 25. Rozdział elektroforetyczny [Mat. 10, Met. 4] przedstawiający wyniki oczyszczania białek: A – RB69SSB-TaqS, B – NeqSSB-TaqS, C – TtePriB-TaqS oraz D – DBD-TaqS na kolumnie ze złożem His-Trap.

M – Białkowy marker wielkości (14,4 – 116 kDa) [Mat. 5]

1 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-X-TaqS po sonikacji

2 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-X-TaqS po denaturacji białek gospodarza

3 – Lizat komórkowy po przejściu przez kolumnę

4 – Frakcja po płukaniu buforem A (200 ml)

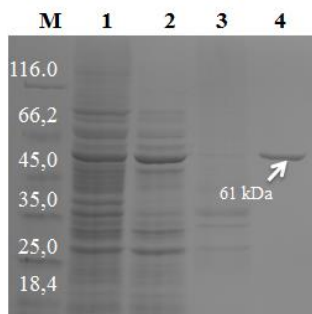
5 – Frakcja po elucji buforem B (30 ml)

X – RB69SSB, NeqSSB, TtePriB lub DBD-TaqS

W analogiczny sposób jak wyżej wymienione fuzyjne polimerazy DNA (co opisano w rozdziale wyniki pkt. 1-3) otrzymano białko referencyjne, którym jest



polimeraza DNA TaqStoffel. Frakcje otrzymane podczas oczyszczania [Met. 14] polimerazy DNA TaqStoffel przedstawia rysunek 26.

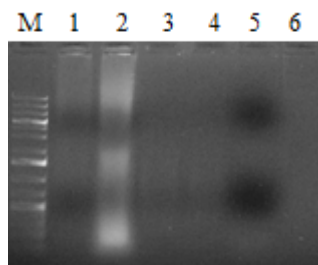


Rysunek 26. Rozdział elektroforetyczny [Mat. 10, Met. 4] przedstawiający wyniki oczyszczania polimerazy DNA TaqS na kolumnie ze złożem His-Trap

- M – Białkowy marker wielkości (14,4 – 116 kDa) [Mat. 5]
- 1 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-TaqS po sonikacji
- 2 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-TaqS po denaturacji białek gospodarza
- 3 – Frakcja po płukaniu buforem B (200 ml)
- 4 – Frakcja po elucji buforem C (30 ml)

4. Usuwanie genomowego DNA *E. coli* z preparatów białkowych

Fuzyjne polimerazy DNA posiadające nową domenę wykazującą naturalną zdolność do wiązania DNA, dlatego otrzymane preparaty są dodatkowo zanieczyszczone pozostałością genomowego DNA *E. coli*. Może mieć to wpływ na spadek wydajności amplifikacji w reakcji PCR oraz stanowić problem kontaminacji przy amplifikacji genów zakonserwowanych ewolucyjnie dla większości bakterii np. operonu *rrn*. Do określenia stopnia zanieczyszczenia polimerazy DNA genomowym DNA *E. coli* zastosowano rozdział elektroforetyczny preparatu białkowego w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Met. 18.1] oraz pomiar spektrofotometryczny za pomocą urządzenia NanoDrop [Met. 18.2].



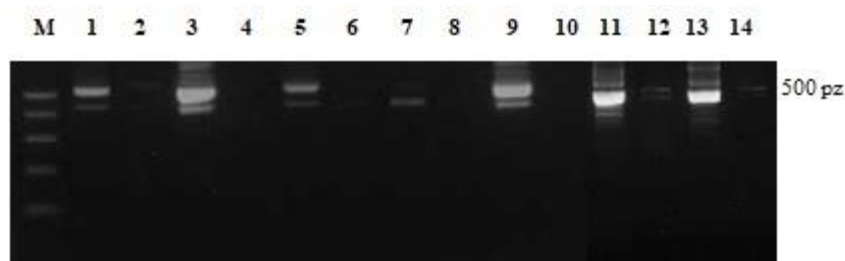
Rysunek 27. Wynik rozdziału elektroforetycznego oczyszczonych metodą metalopowinowactwa próbek fuzyjnych polimeraz DNA w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Met. 3, Mat. 9] M –Marker GeneRuler™ 75 -20000 [Mat. 5]

- 1 – 20 μ l preparatu polimerazy DNA NeqSSB-TaqS bez trawienia benzonazą
- 2 – 20 μ l preparatu polimerazy DNA RB69SSB-TaqS bez trawienia benzonazą

- 3 – 20 µl preparatu polimerazy DNA NeqSSB-TaqS po 1 godzinie trawienia benzonazą
- 4 – 20 µl preparatu polimerazy DNA RB69SSB-TaqS po 1 godzinie trawienia benzonazą
- 5 – 20 µl preparatu polimerazy DNA TtePriB-TaqS po 1 godzinie trawienia benzonazą
- 6 – 20 µl preparatu polimerazy DNA DBD-TaqS po 1 godzinie trawienia benzonazą

Wynik rozdziału przedstawiony na rysunku 27 (ścieżka 1 i 2) oraz wyniki pomiaru spektrofotometrycznego wskazywały na obecność DNA w preparatach białkowych. W celu pozbycia się bakteryjnego DNA, preparaty białkowe poddano działaniu benzonazy zgodnie z protokołem opisanym w metodach [Mat. 3, Met. 15] i ponownie sprawdzono spektrofotometryczne oraz w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (rysunek 27, ścieżka 3, 4, 5, 6) [Mat. 9, Met. 3]. Przy użyciu obu metod nie wykryto tym razem pozostałości bakteryjnego DNA.

Dodatkowo w celu weryfikacji uzyskanego wyniku zastosowano bardziej czułą metodę detekcji DNA w preparatach białkowych opartą o reakcję PCR [Met. 18.3]. Polimerazy DNA produkowane w komórkach bakteryjnych mogą stać się przypadkowymi „dawcami” matrycy DNA. Jako cel molekularny wybrano fragment DNA polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA z *E. coli* o wielkości ok. 500 pz. Przeprowadzono również reakcje dla komercyjnych polimeraz DNA TaqNova (Blirt) oraz Phusion (ThermoFisherScientific) oraz kontrolnie reakcje PCR w tych samych warunkach dla wszystkich badanych polimeraz DNA z dodatkiem wyizolowanej matrycy DNA *E. coli* [Met. 18.3]. Wynik przedstawiono na rysunku 28.



Rysunek 28. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR powstałych w wyniku amplifikacji fragmentu DNA polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA z *E. coli* w 1,5% żelu agarozowym [Met. 3, Mat. 9] w celu wykrycia zanieczyszczenia badanych polimeraz DNA pozostałościami bakteryjnego DNA. Ścieżki 2,4,6, 8, 10,12, 14 traktowane są jako kontrole negatywne na obecność matrycowego DNA

M- marker DNA 100-500 [Mat. 5]

1 – 1 µl polimerazy DNA Phusion (ThermoFisherScientific) na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

2 – 1 µl polimerazy DNA Phusion na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

3 – 1 µl polimerazy DNA NeqSSB-TaqS na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

4 – 1 µl polimerazy DNA NeqSSB-TaqS na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

5 – 1 µl polimerazy DNA TtePriB-TaqS na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

6 – 1 µl polimerazy DNA TtePriB-TaqS na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

7 – 1 µl polimerazy DNA RB69SSB-TaqS na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

8 – 1 µl polimerazy DNA RB69SSB-TaqS na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

9 – 1 µl polimerazy DNA DBD-TaqS na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

10 – 1 µl polimerazy DNA DBD-TaqS na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

11 – 1 µl polimerazy DNA TaqStoffel na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

12 – 1 µl polimerazy DNA TaqStoffel na 20 µl reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

13 – 1 µl polimerazy DNA Hypernova (Blirt) na 20 µl reakcji PCR z dodatkiem genomowego DNA *E. coli*

14 - 1 μ L polimerazy DNA Hypernova na 20 μ L reakcji PCR bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

Duża czułość metody pozwala wykryć śladowe ilości DNA w preparatach białkowych mimo negatywnego wyniku w testach wykorzystujących rozdział w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Met. 18.1] oraz opartych na pomiarze spektrofotometrycznym [Met. 18.2]. Fakt, że zanieczyszczenie preparatów DNA jest na porównywalnym poziomie z preparatami komercyjnymi pozwala uznać trawienie benzonazą za efektywne. Niemniej, należy mieć na względzie, że do amplifikacji bakteryjnych genów operonu *rrn* powinniśmy używać polimeraz nierekombinantowych, które zmniejszają ryzyko kontaminacji.

5. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii żelowej

Według zaleceń producenta benzonazy – firmy Merck, najlepszym sposobem pozbycia się nukleazy z preparatu jest oczyszczanie chromatograficzne. Obecność domeny oligohistydynowej na końcu DNazy nie pozwala na wykorzystanie chromatografii metalopowinowactwa, dlatego przeprowadzone zostało sączenie molekularne zgodnie z opisaną wcześniej procedurą [Met. 16]. Znaczne różnice w masie molekularnej benzonazy (ok. 30 kDa) oraz fuzyjnej polimerazy DNA (ok. 90 kDa) pozwoliły na efektywne rozdzielenie obu białek w wyniku sączenia molekularnego z wykorzystaniem systemu AKTA Purifier [Mat. 2]. Zebrane frakcje po oczyszczaniu na kolumnie HiLoad Superdex 200 Prep Grade [Mat. 2] poddano dializie buforem D [Met. 17], zagęszczono z wykorzystaniem kolumn wirowniczych Amicon Ultra-15 [Mat. 2] i dodano pozostałe składniki buforu E. Uzyskano preparaty białkowe o stopniu czystości ok. 98%, a ich końcową wydajność otrzymywania z 1 litra hodowli bakteryjnej przedstawia tabela 44.

Tabela 44. Zestawienie wydajności otrzymywania polimeraz DNA

Polimeraza DNA	Wydajność [mg białka/l hodowli]	Wydajność [nmol białka/l hodowli]
RB69SSB-TaqS	5,0	53,2
NeqSSB-TaqS	3,5	38,9
TtePriB-TaqS	3,0	34,88
DBD-TaqS	4,0	46,5
TaqS	6,0	98,4

II. Charakterystyka fuzyjnych polimeraz DNA

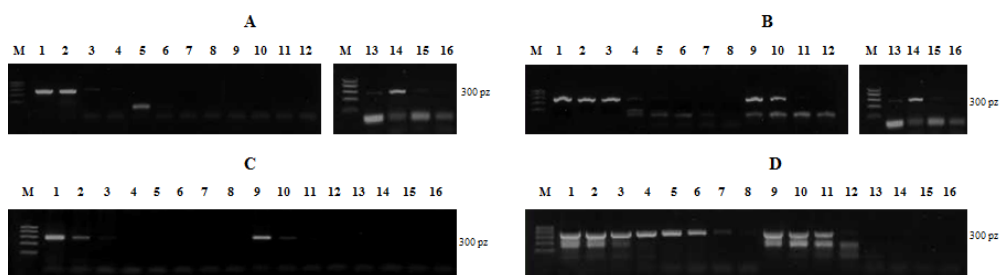
W niniejszym rozdziale opisano molekularną charakterystykę fuzyjnych polimeraz DNA opartą o porównanie uzyskanych wyników z wynikami dla referencyjnej polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (TaqStoffel, TaqS). Analizie badawczej poddano tak istotne w technikach amplifikacji DNA cechy polimeraz DNA jak: termostabilność,

procesywność, szybkość elongacji, czułość, wydajność amplifikacji długich fragmentów DNA, zdolność amplifikacji matryc DNA bogatych w GC, odporność na inhibitory z próbek klinicznych oraz tolerancję na stężenie różnych soli. Analiza ta została poprzedzona doбором optymalnego buforu do reakcji amplifikacji DNA oraz wyznaczeniem ilości jednostek aktywności polimeraz DNA, co było niezbędne dla uzyskania miarodajnych wyników.

6. Określenie optymalnych warunków amplifikacji fuzyjnych polimeraz DNA

6.1. Dobór optymalnego buforu

Zdolność fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji oraz ich wydajność zbadano w różnych, dostępnych komercyjnie buforach: Marathon pH 9,0 (A&A Biotechnology), TaqNova pH 8,8 (Blirt), Shark pH 8,3 (Blirt) oraz Taq (NH₄)₂SO₄ pH 8,8 (ThermoScientific) [Mat. 6]. Zastosowano seryjne 2-krotne rozcieńczenia badanych polimeraz DNA. Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem opisanym w pkt. 19.1 metod. Wynik rozdziału elektroforetycznego otrzymanych produktów PCR przedstawia rysunek 29.



Rysunek 29. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] fragmentów DNA powstałych w wyniku reakcji PCR z udziałem polimeraz DNA RB69SSB-TaqS (A), NeqSSB-TaqS (B), TtePriB-TaqS (C), DBD-TaqS (D) przy użyciu różnych buforów: 1-4 Shark, 5-8 Taq (NH₄)₂SO₄, 9-12 Marathon, 13-16 TaqNova

M – marker 100-500 [Mat. 5]

1, 5, 9, 13 – 1 μl polimerazy DNA

2, 6, 10, 14 – 0,5 μl polimerazy DNA

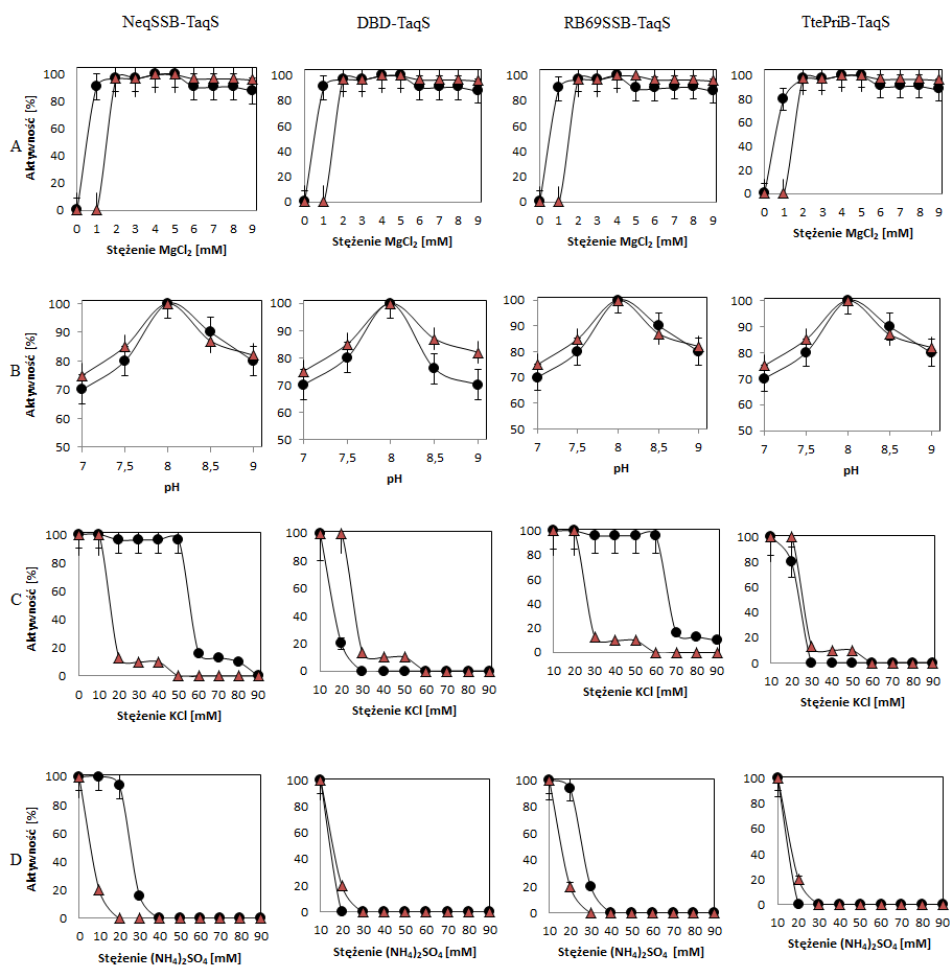
3, 7, 11, 15 – 0,25 μl polimerazy DNA

4, 8, 12, 16 – 0,125 μl polimerazy DNA

Powyższe wyniki dowodzą, że wszystkie fuzyjne polimerazy DNA wykazują najwyższą aktywność w buforze Shark o pH 8,3 [Mat. 6]. Podobny wynik uzyskano dla referencyjnej polimerazy DNA TaqS. W związku z powyższym w dalszej charakterystyce polimeraz DNA wykorzystano bufor Shark.

6.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu, chlorku potasu i siarczanu (VI) amonu oraz optymalnego pH buforu reakcyjnego

Na aktywność i wydajność amplifikacji DNA w reakcji PCR zasadniczy wpływ ma skład buforu reakcyjnego, a przede wszystkim odpowiednie pH, skład soli oraz jonów magnezowych. W oparciu o dobrany w poprzednich doświadczeniach bufor Shark [Mat. 6, Met. 19.1, Wyn. 6.1] określono wpływ jonów magnezu, pH buforu oraz soli KCl i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na działanie badanych polimeraz DNA [Met. 19.2, 19.3, 19.4]. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach przedstawionych w pkt. 19 metod. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach (rysunek 30).



Rysunek 30. Wykresy przedstawiające wpływ stężenia jonów magnezu (A), pH buforu (B), stężenia soli KCl (C), stężenia soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D) na wydajność amplifikacji DNA prowadzonej przy pomocy fuzyjnej polimerazy DNA. Czarne znaczniki przedstawiają wyniki dla fuzyjnej polimerazy DNA, czerwone dla referencyjnej polimerazy DNA TaqStoffel. Słupki błędów zakończone odnoszą się do fuzyjnych polimeraz DNA, a słupki błędów niezakończone do polimerazy DNA TaqS. Aktywność określono przy pomocy programu GelAnalyzer [Met. 30] na podstawie intensywności uzyskanych produktów PCR w żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3]

Na podstawie uzyskanych wyników określono optymalne warunki działania badanych polimeraz DNA oraz wyznaczono zakres stężeń tolerowanych soli. Zbiorcze wyniki przedstawia tabela 45.

Tabela 45. Zakres optymalnych warunków działania polimeraz DNA oraz ich tolerancji na stężenie soli w buforze reakcyjnym

	NeqSSB-TaqS	DBD-TaqS	RB69SSB-TaqS	TtePriB-TaqS	TaqS
Optymalne stężenie MgCl ₂	1-9 mM	1-9 mM	1-9 mM	1-9 mM	2-9 mM
Optymalne pH	8,0-8,3	8,0-8,3	8,0-8,3	8,0-8,3	8,0-8,3
Max. stężenie KCl	50 mM	10 mM	60 mM	20 mM	20 mM
Max. stężenie (NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM	10 mM	20 mM	10 mM	10 mM

Przeprowadzone badania pozwoliły zoptymalizować skład buforu reakcyjnego z określeniem stężeń stosowanych soli magnezu dla badanych polimeraz DNA. Skład buforu używany we wszystkich dalszych eksperymentach w niniejszej pracy przedstawiono w tabeli 46.

Tabela 46. Optymalny skład buforu reakcyjnego dla fuzyjnych polimerazy DNA i referencyjnej polimerazy DNA TaqS

Składnik	Stężenie
Tris-HCl pH 8.0	20 mM
KCl	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
Triton X-100	0,1%
MgCl ₂	4 mM

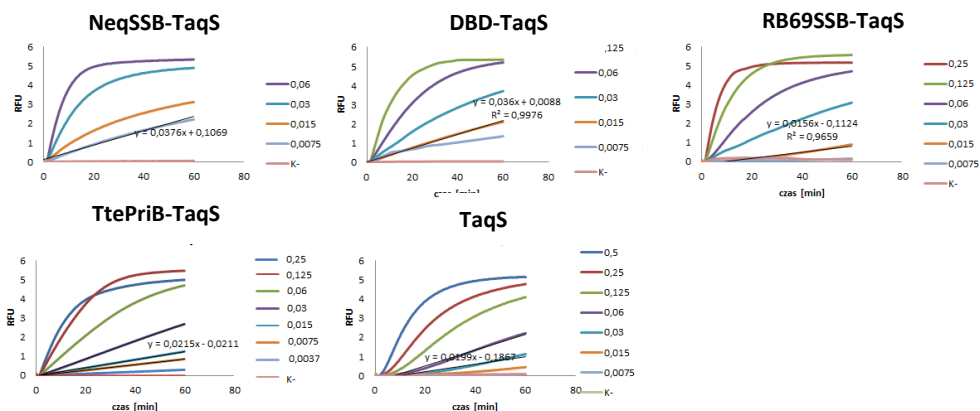
7. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych polimeraz DNA

Ilość jednostek aktywności badanych polimeraz DNA została określona przy użyciu komercyjnego testu do oznaczania aktywności EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit firmy Biotium [Mat. 3] zgodnie z protokołem przedstawionym w metodach [Met. 20]. Reakcja prowadzona była w warunkach izotermicznych w optymalnej dla polimerazy DNA Taq temperaturze wydłużania 72°C, a ilość jednostek aktywności wyznaczono zgodnie z poniższą definicją.

1 jednostka aktywności [1 U] to ilość polimerazy DNA, która jest w stanie inkorporować 10 nmol nukleotydów w czasie 30 min w jej optymalnej temperaturze działania (103).

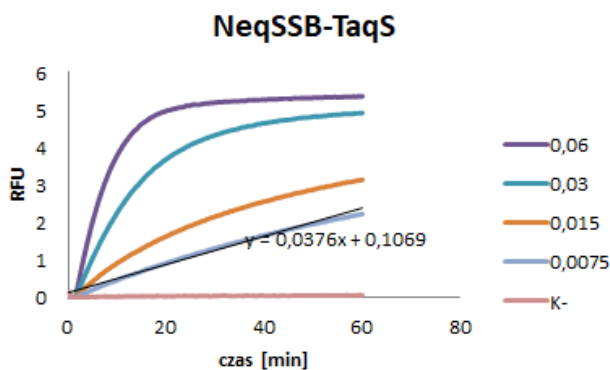
Aktywna polimeraza DNA dobudowując kolejne nukleotydy syntetyzowała DNA dając dwuniciowy produkt PCR, który oddziałując z barwnikiem EvaGreen

powodował wzrost intensywności fluorescencji. Literatura wskazuje, że poziom fluorescencji barwnika jest skorelowany z aktywnością polimerazy DNA i ilością wbudowanych nukleotydów (103) (104) (105). Wykresy zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji przedstawiono na rysunku 31.



Rysunek 31. Wykresy zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu amplifikacji DNA dla polimeraz DNA. Legenda przypisuje krzywym ilość użytej do reakcji polimerazy DNA w μl

Z powstałego wykresu zależności fluorescencji od czasu wyznaczono maksymalną różnicę w poziomie fluorescencji (ΔF_{max}) dla maksymalnych stężeń polimerazy DNA w momencie wysycenia układu oraz nachylenie krzywej ($\text{tg}\alpha$), która w jak największym stopniu zbliżona była do linii prostej. Przykładowe obliczenia dla jednej z fuzyjnych polimeraz DNA przedstawiono poniżej.



$$\Delta F = \text{tg}\alpha \times t = 0,0376 \frac{\text{RFU}}{\text{min}} \times 30 \text{ min} = 1,128 \text{ RFU}$$

$$n = \frac{\Delta F}{\Delta F_{\text{max}}} \times 0,135 \text{ nmol} = \frac{1,128 \text{ RFU}}{5,3 \text{ RFU}} \times 0,135 \text{ nmol} = 0,0287 \text{ nmol}$$

$$u = n \times \frac{1}{N} = \frac{0,0287 \text{ nmol}}{10 \text{ nmol}} = 0,0029 \text{ U w } 0,0075 \text{ } \mu\text{l polimerazy DNA}$$

Stąd ilość jednostek aktywności polimerazy DNA NeqSSB – TaqS w 1 μl wynosi:

$$\frac{0,0029 \text{ U}}{0,0075 \text{ } \mu\text{l}} = \mathbf{0,39 \frac{U}{\mu\text{l}}}$$

W analogiczny sposób obliczono ilość jednostek aktywności pozostałych polimeraz DNA, co przedstawiono w tabeli 47.

Tabela 47. Porównanie ilości jednostek aktywności (w przeliczeniu na 1 μl) fuzyjnych polimeraz DNA oraz referencyjnej polimerazy DNA TaqStoffel

Polimeraza DNA	Ilość jednostek aktywności
NeqSSB-TaqS	0,39 U/ μl
DBD-TaqS	0,18 U/ μl
RB69SSB-TaqS	0,08 U/ μl
TtePriB-TaqS	0,23 U/ μl
TaqS	0,05 U/ μl

Określenie ilości jednostek aktywności polimeraz DNA posłużyło określeniu aktywności specyficznej otrzymanych preparatów, przedstawionej w tabeli 48, rozumianej jako ilość jednostek aktywności polimerazy DNA otrzymanej z 1 mg lub 1 nmol białka (106). Badane polimerazy DNA doprowadzono do stężenia 1 U/ μl w celu przeprowadzenia ich dalszej charakterystyki molekularnej.

Tabela 48. Porównanie aktywności specyficznej otrzymanych polimeraz DNA

Polimeraza DNA	Aktywność specyficzna	
	[U/mg]	[U/nmol]
RB69SSB-TaqS	2000	188
NeqSSB-TaqS	2200	198
TtePriB-TaqS	1700	147
DBD-TaqS	1600	138
TaqS	2000	122

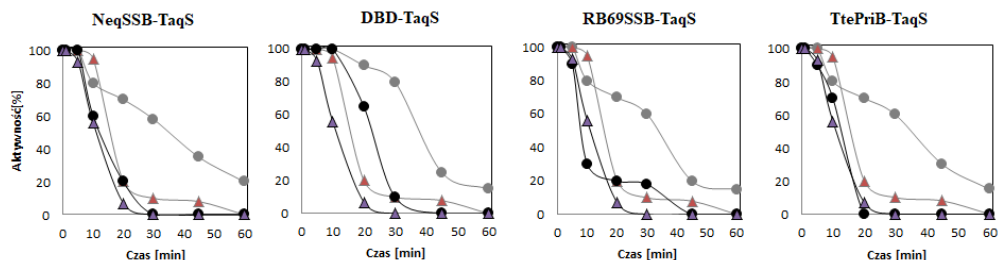
8. Określenie termostabilności fuzyjnych polimeraz DNA

Termostabilność otrzymanych polimeraz DNA zbadano w oparciu o metodykę przedstawioną przez Dąbrowskiego i Kur (95) opisaną w pkt. 21 metod. Badane polimerazy DNA inkubowano w temperaturze 95°C i 99°C w czasie od 0 do 60 min i przeprowadzano reakcję PCR [Met. 21], a otrzymane fragmenty DNA rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3]. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach poniżej (rysunek 32).

Przeprowadzone eksperymenty wskazują na zwiększenie termostabilności w 95°C przez wszystkie fuzyjne polimerazy DNA oraz wydłużenie czasu półtrwania w temperaturze 99°C polimeraz NeqSSB-TaqS oraz DBD-TaqS w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Otrzymane wykresy pozwoliły ponadto na



wyznaczenie czasu półtrwania otrzymanych polimeraz DNA, które przedstawiono w tabeli 49.



Rysunek 32. Wykresy przedstawiające zmianę aktywności fuzyjnych polimeraz DNA w czasie inkubacji w temperaturze 95°C i 99°C w porównaniu z referencyjną polimerazą DNA TaqS. Okrągłe znaczniki przedstawiają wyniki dla fuzyjnej polimerazy DNA, trójkątne dla referencyjnej polimerazy DNA TaqStoffel. Znaczniki okrągłe w kolorze szarym oraz trójkątne w kolorze czerwonym odnoszą się do inkubacji w temperaturze 95°C, znaczniki okrągłe w kolorze czarnym oraz trójkątne w kolorze szarym odnoszą się do inkubacji w temperaturze 99°C. Aktywność określono przy pomocy programu GelAnalyzer [Met. 30] na podstawie intensywności uzyskanych produktów PCR w żelu agarozowym z bromkiem etydydy [Mat. 9, Met. 3]

Tabela 49. Porównanie czasów półtrwania fuzyjnych polimeraz DNA oraz referencyjnej polimerazy DNA TaqS w temperaturze 95°C i 99°C

	NeqSSB-TaqS	DBD-TaqS	RB69SSB-TaqS	TtePriB-TaqS	TaqS
Czas półtrwania w 95°C	35 min	40 min	30 min	30 min	20 min
Czas półtrwania w 99°C	15 min	25 min	10 min	10 min	10 min

9. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych polimeraz DNA

Procesywność polimeraz DNA wyznaczono w oparciu o metodę opisaną przez Elshawadfy’a i współpracowników (96) [Met. 22] zgodnie z poniższą definicją.

Procesywność to ilość nukleotydów wbudowywanych podczas jednej reakcji katalitycznej, przez jedną cząsteczkę polimerazy DNA (97).

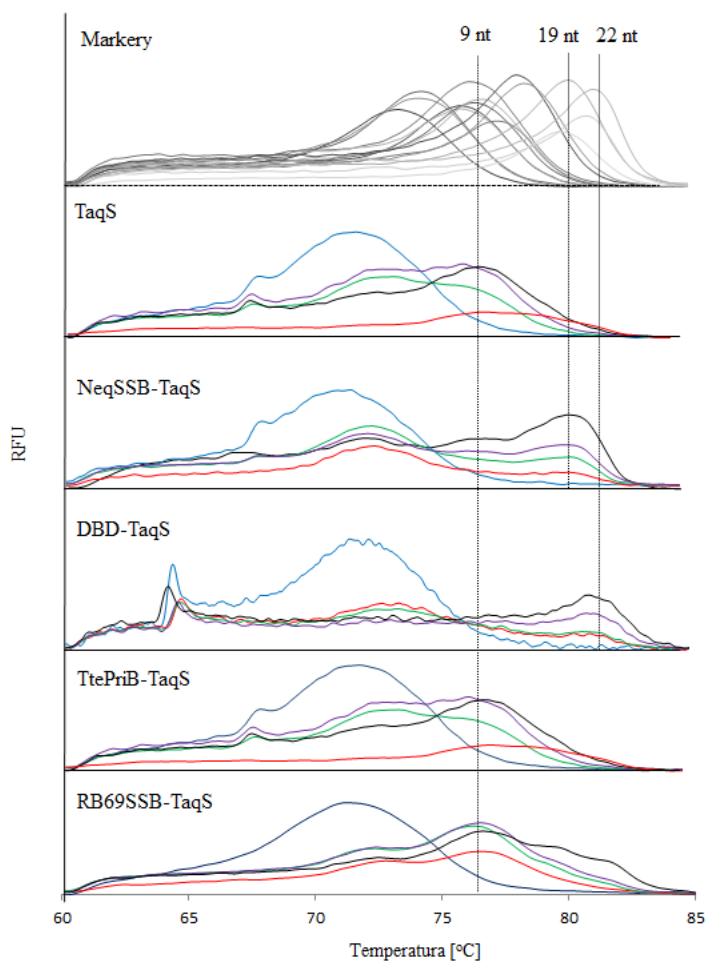
W celu zapewnienia warunków opisanych w definicji (jednokrotnego przyłączenia się polimerazy DNA do nici DNA) reakcję prowadzono w obecności 10-krotnie niższego stężenia polimerazy DNA niż w poprzednio opisanych reakcjach PCR oraz z dodatkiem wielokrotnego nadmiaru „pułapki” – heparyny, o zdecydowanie większym powinowactwie do polimerazy DNA niż polimeraza DNA do DNA (98). Zgodnie z protokołem przedstawionym w pkt. 22 metod, startery, matrycę DNA i badaną polimerazę DNA w odpowiednim buforze poddano pre-inkubacji, co miało skutkować przyłączeniem się polimerazy DNA do matrycy DNA. Reakcję zainicjowano poprzez jednoczesne dodanie jonów magnezu i heparyny do mieszaniny oraz

podniesienie temperatury do 72°C – optymalnej temperatury wydłużania dla polimerazy DNA Taq. Obecność kilkasetkrotnie większego stężenia heparyny w stosunku do polimerazy DNA zapewniło oddysocjowanej polimerazie DNA (po jednokrotnej reakcji polimeryzacji), efektywne „wyłapanie” przez heparynę i uniemożliwienie jej kolejnego przyłączenia się do DNA oraz zajścia kolejnej reakcji katalitycznej. Próbki pobierane w różnych odstępach czasu od momentu zainicjowania reakcji poddano detekcji z wykorzystaniem aparatu do real-time PCR [Mat. 2]. Pomiar temperatury topnienia (z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) powstałych fragmentów DNA i porównanie uzyskanych wyników z temperaturami topnienia produktów markerowych o znanej długości [Met. 22, tabela 28] pozwoliło na wyznaczenie ilości nukleotydów wbudowanych przez polimerazę DNA w czasie jednej reakcji katalitycznej. Sposób detekcji otrzymanych fragmentów DNA odbiega od literaturowej metody detekcji (96), gdzie korzystano z rozdźwięku elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym. W przypadku pomiaru temperatury topnienia z użyciem aparatu do real-time PCR otrzymywano wyższy próg detekcji niż w przypadku stosowania metody opartej na rozdźwięku elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym, do określenia różnicy w długości produktów na poziomie kilku nukleotydów. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 33.

Określenie procesywności badanych polimeraz DNA polegało na porównaniu temperatur topnienia produktów reakcji amplifikacji oraz porównaniu uzyskanych profili temperaturowych badanych polimeraz DNA z wcześniej otrzymanymi profilami fragmentów DNA o ściśle określonej długości służących jako markery [Met. 22, tabela 28]. Temperatura topnienia produktu powstałego w wyniku działania polimerazy DNA NeqSSB-Taqs to 80,49°C, DBD-Taqs - 82,03°C, TtePriB-Taqs - 77,10°C, RB69SSB-Taqs - 77,03°C, a referencyjnej polimerazy DNA Taqs - 77,06°C co wskazuje na procesywność równą odpowiednio 19 nukleotydów, 22 nt i po 9 nt dla TtePriB-Taqs, RB69SSB-Taqs i Taqs (tabela 50). Wzrost procesywności w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA wykazały dwie fuzyjne polimerazy DNA: DBD-Taqs oraz NeqSSB-Taqs. Fakt, że w miarę wydłużania czasu inkubacji nie powstaje kolejny fragment DNA o wyższej temperaturze topnienia pozwala uznać, że heparyna związała wszystkie oddysocjowane i niezwiązane z matrycą cząsteczki polimerazy DNA, co trwale zablokowało zajście kolejnej reakcji polimeryzacji.

Tabela 50. Porównanie procesywności badanych polimeraz DNA wyrażonej w temperaturze topnienia powstałych fragmentów DNA oraz ilości dobudowanych nukleotydów w jednej reakcji katalitycznej

	NeqSSB-Taqs	DBD-Taqs	RB69SSB-Taqs	TtePriB-Taqs	TaqStoffel
Temperatura topnienia fragmentów DNA	80,49°C	82,03°C	77,03°C	77,10°C	77,06°C
Ilość dobudowywanych nukleotydów	19 nt	22 nt	9 nt	9 nt	9 nt



Rysunek 33. Wykres przedstawiający porównanie temperatur topnienia fragmentów DNA powstałych po izotermicznej reakcji wydłużania przez fuzyjne polimerazy DNA z referencyjną polimerazą DNA TaqS. U góry zaznaczono ilości nukleotydów, o które wydłużone zostało matrycowe DNA. Kolorem niebieskim zaznaczono krzywą topnienia próbki przed zainicjowaniem reakcji - 0 min (powstały produkt to dimer starter-matryca DNA), kolorem czerwonym krzywą po czasie 30 s od zainicjowania reakcji, kolorem zielonym po 1 min, kolorem fioletowym po 2 min i kolorem czarnym po 5 min inkubacji w 72°C

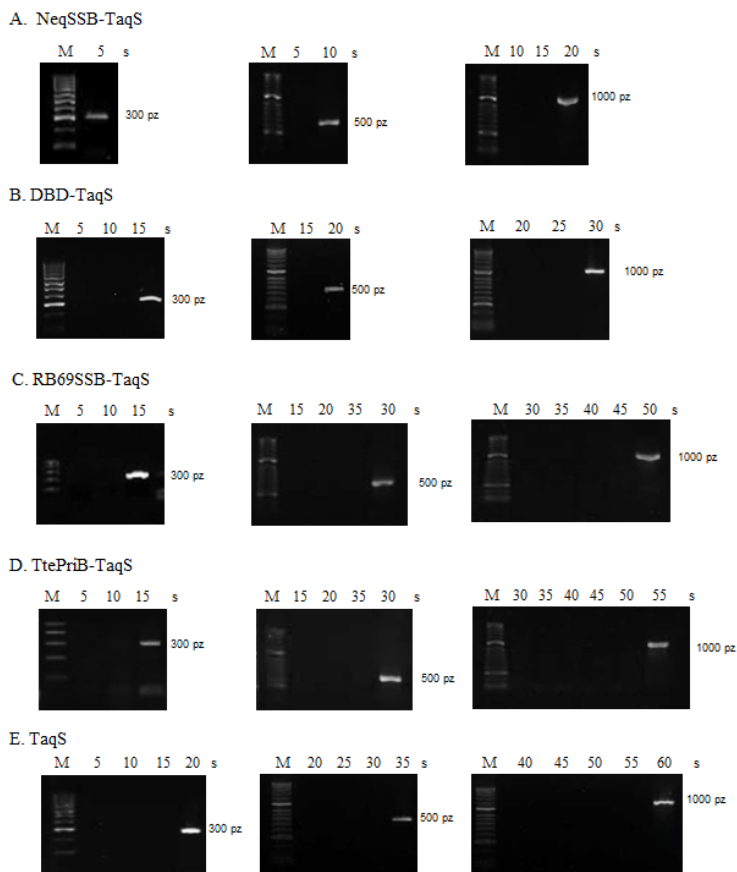
10. Oznaczenie szybkości syntezy DNA fuzyjnych polimeraz DNA

Szybkość syntezy badanych polimeraz DNA oznaczono w oparciu o metodę przedstawioną przez Lee i współpracowników (74) zgodnie z definicją.

Szybkość elongacji to ilość nukleotydów wbudowywanych przez 1 U polimerazy DNA w ciągu jednej sekundy [nt/s] (74)



Badania prowadzono przy pomocy reakcji PCR, w której zastosowano różne czasy wydłużania (od 5 s do 60 s) i trzy różne pary starterów, które pozwoliły na otrzymanie fragmentów DNA o długości 300 pz, 500 pz i 1000 pz zgodnie z warunkami podanymi w pkt. 23 metod. Otrzymany wynik dla każdej z badanych polimeraz DNA przedstawia rysunek 34.



Rysunek 34. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający wyniki reakcji PCR o coraz dłuższym czasie elongacji prowadzącym do otrzymania fragmentów DNA o długości 300 pz, 500 pz i 1000 pz. Produkty PCR otrzymane przy użyciu polimerazy DNA NeqSSB-TaqS (A), produkty PCR otrzymane przy użyciu polimerazy DNA DBD-TaqS (B), produkty PCR otrzymane przy użyciu polimerazy DNA RB69SSB-TaqS (C), produkty PCR otrzymane przy użyciu polimerazy DNA TtePriB-TaqS (D), produkty PCR otrzymane przy użyciu referencyjnej polimerazy DNA TaqS (E). Nad ścieżkami wskazano czasy elongacji zastosowane w reakcji PCR

Powyższe wyniki wskazują na większą szybkość syntezy DNA przez fuzyjne polimerazy DNA w stosunku do polimerazy DNA TaqS. Największy wzrost szybkości wykazały polimerazy DNA NeqSSB-TaqS oraz DBD-TaqS, dla których synteza produktów o długości 1000 pz wymagała czasu elongacji odpowiednio 20 s i 30 s. Pozostałe fuzyjne polimerazy DNA wykazywały niewielkie różnice w szybkości elongacji w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA. Tabela porównania szybkości syntezy DNA przez badane polimerazy DNA przedstawia tabela 51.



Tabela 51. Zestawienie wyników szybkości elongacji fuzyjnych polimeraz DNA oraz referencyjnej polimerazy DNA TaqS

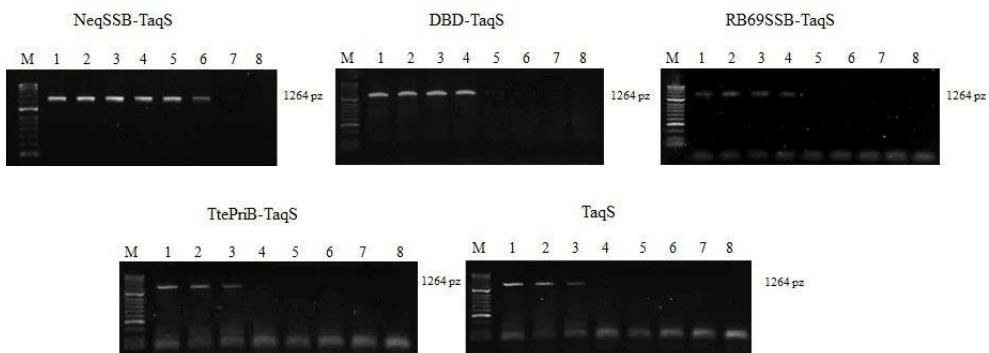
	300 pz	500 pz	1000 pz	Szybkość elongacji
NeqSSB-TaqS	5 s	10 s	20 s	50 nt/s
DBD-TaqS	15 s	20 s	30 s	33 nt/s
RB69SSB-TaqS	15 s	30 s	50 s	20 nt/s
TtePriB-TaqS	15 s	30 s	55 s	18 nt/s
TaqS	20 s	35 s	60 s	16 nt/s

11. Badanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA

Określenie czułości polimeraz DNA przeprowadzono w oparciu o metodę przedstawioną przez Halley'a i Prezioso (99), którzy definiują ją jako:

Czułość polimerazy DNA to graniczna ilość matrycy DNA, która może być wydajnie amplifikowana w reakcji PCR przez 1 U polimerazy DNA (99).

W badaniu posłużono się reakcją PCR, która prowadzona była zgodnie z warunkami przedstawionymi w pkt. 24 metod stosując seryjne 10-krotne rozcieńczenia matrycy DNA. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 35.



Rysunek 35. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający porównanie czułości fuzyjnych polimeraz DNA z polimerazą DNA TaqS. Produkty PCR powstały poprzez amplifikację matrycy DNA w seryjnych 10-krotnych jej rozcieńczeniach

M – marker DNA HyperLadder II [Mat. 5]

- 1 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 300 ng matrycy DNA
- 2 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 30 ng matrycy DNA
- 3 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 3 ng matrycy DNA
- 4 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 0,3 ng matrycy DNA
- 5 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 0,03 ng matrycy DNA
- 6 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 3 pg matrycy DNA
- 7 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 0,3 pg matrycy DNA
- 8 – produkt PCR otrzymany przy zastosowaniu 0,03 pg matrycy DNA

Wyniki eksperymentu wskazują na tysiąckrotnie wyższą czułość polimeraz DNA NeqSSB-TaqS oraz dziesięciokrotnie wyższą polimeraz DNA DBD-TaqS i RB69SSB-

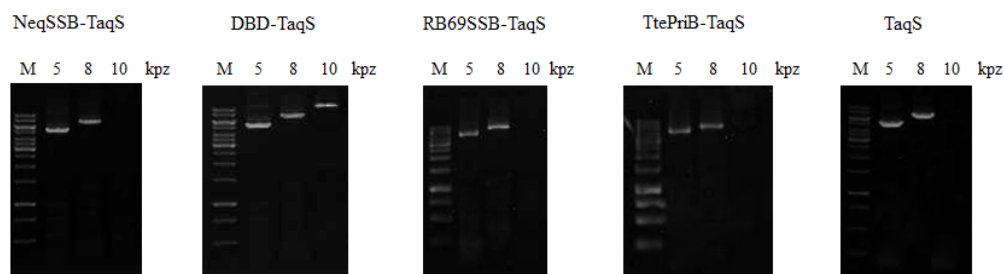
TaqS w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Jedynie fuzyjna polimeraza DNA TtePriB-TaqS wykazywała czułość na poziomie polimerazy DNA TaqS. Zestawienie końcowych wyników przedstawia tabela 52.

Tabela 52. Zestawienie wyników przedstawiających czułość polimeraz DNA jako ilość użytej matrycy DNA na 20 μ l mieszaniny reakcyjnej z zastosowaniem 1 U polimerazy DNA

	NeqSSB-TaqS	DBD-TaqS	RB69SSB-TaqS	TtePriB-TaqS	TaqStoffel
Czułość polimerazy DNA	3 pg	0,3 ng	0,3 ng	3 ng	3 ng

12. Określenie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA przez fuzyjne polimerazy DNA

Wydajność badanych polimeraz DNA w amplifikacji długich produktów została zbadana w oparciu o metodę przedstawioną przez Kwona i współpracowników (100). Zgodnie z pkt. 25 metod przeprowadzono trzy reakcje PCR pozwalające na otrzymanie fragmentów DNA o długości 5 kpz, 8 kpz i 10 kpz. Reakcję prowadzono w tych samych warunkach temperaturowo-czasowych z uwzględnieniem różnic w czasie elongacji (60 sekund na 1 kpz) [Met. 25]. Otrzymane produkty PCR rozdzielone w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiono na rysunku 36.



Rysunek 36. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający porównanie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA przez polimerazy DNA NeqSSB-TaqS, DBD-TaqS, RB69SSB-TaqS oraz TtePriB-TaqS w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Wyżej wymienione polimerazy DNA użyto do amplifikacji produktów PCR o wielkości 5 kpz, 8 kpz i 10 kpz wykorzystując jako matrycę genomowe DNA *E. coli*. Nad ścieżkami wskazano długości oczekiwanych produktów PCR

M – marker DNA GeneRuler™ 250-10000 [Mat. 5]

5 – oczekiwany produkt PCR 5 kpz

8 – oczekiwany produkt PCR 8 kpz

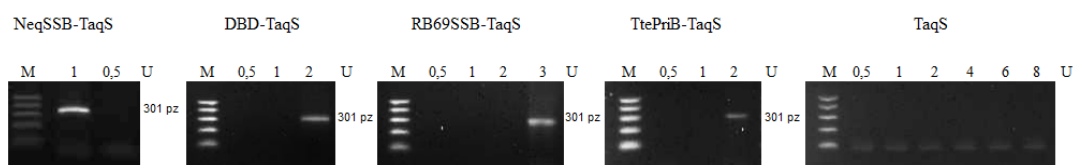
10 – oczekiwany produkt PCR 10 kpz

Wyniki elektroforezy otrzymanych fragmentów DNA wykazały, że jedynie w przypadku fuzyjnej polimerazy DNA DBD-TaqS powstawał produkt PCR o wielkości

10 kpz. Pozostałe fuzyjne polimerazy DNA, podobnie jak referencyjna TaqS zamplifikowały fragmenty DNA o maksymalnej długości do 8 kpz.

13. Badanie zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC przez fuzyjne polimerazy DNA

Zdolność fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji sekwencji bogatych w pary GC sprawdzono z wykorzystaniem reakcji PCR na matrycy DNA wyizolowanej z *Mycobacterium tuberculosis* [Mat. 13, Met. 26]. Otrzymane produkty o długości 301 pz i zawartości 78% par GC rozdzielano w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3]. Wynik doświadczenia przedstawiono na rysunku 37.



Rysunek 37. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający porównanie zdolności amplifikacji DNA bogatego w pary GC przez fuzyjne polimerazy DNA NeqSSB-Taqs, DBD-Taqs, RB69SSB-Taqs oraz TtePriB-Taqs oraz referencyjną polimerazę DNA Taqs. Nad ścieżkami wskazano ilość jednostek aktywności polimeraz DNA użytych w reakcji PCR

M – marker DNA 100-500 [Mat. 5]

0,5 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji DNA z użyciem 0,5 U polimerazy DNA

1 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji DNA z użyciem 1 U polimerazy DNA

2 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji DNA z użyciem 2 U polimerazy DNA

3 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji DNA z użyciem 3 U polimerazy DNA

4 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji DNA z użyciem 4 U polimerazy DNA

6 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji z DNA z użyciem 6 U polimerazy DNA

8 – produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji z DNA z użyciem 8 U polimerazy DNA

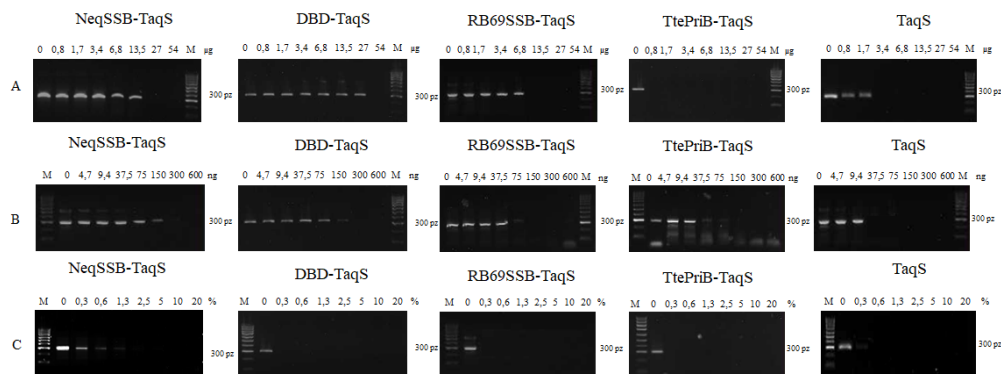
Powyższe badania wskazują na przewagę polimeraz fuzyjnych w amplifikacji matryc bogatych w pary GC. Przy zachowaniu warunków przedstawionych w pkt. 26 metody wystarczy zastosować odpowiednio 1 U, 2 U lub 3 U polimerazy DNA NeqSSB-Taqs, DBD-Taqs/TtePriB-Taqs lub RB69SSB-Taqs, aby zamplifikować fragment DNA o zawartości 78% par GC. W tych samych warunkach polimeraza DNA Taqs nie jest zdolna przeprowadzić efektywnej amplifikacji nawet przy użyciu 8 U referencyjnej polimerazy DNA.

14. Badanie odporności fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory

14.1 Badanie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do amplifikacji DNA w obecności inhibitorów z krwi i krwi pełnej

Badając odporność fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory z krwi przeprowadzono reakcje PCR w obecności dwóch inhibitorów: laktoferyny (w zakresie

stężeń 0,84 μg - 54 μg) i heparyny (w zakresie stężeń 4,7 ng - 600 ng) zgodnie z protokołem przedstawionym w pkt. 27.1 metod. Podobny test przeprowadzono dla krwi pełnej badając zakres od 0,3% do 10% krwi w mieszaninie reakcyjnej [Met. 27.2.1]. Otrzymane fragmenty DNA rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3], a wyniki przedstawiono na rysunku 38.



Rysunek 38. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający porównanie odporności polimeraz DNA na inhibitory: laktoferyna (A), heparyna (B), krew pełna (C). Nad ścieżkami wskazano ilość dodawanego do reakcji PCR inhibitora. M – marker DNA HyperLadder II [Mat. 5]

Powyższe eksperymenty wskazują wyższą odporność fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory (heparyna, laktoferyna, krew pełna) w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Najwyższą odporność w stosunku do laktoferyny i heparyny wykazały kolejno polimerazy DNA NeqSSB-Taqs, DBD-Taqs oraz RB69SSB-Taqs. Fuzyjna polimeraza DNA TtePriB-Taqs wykazała poprawę odporności tylko w przypadku heparyny, a jedyną polimerazą DNA odporną na krew pełną była NeqSSB-Taqs. Szczegółowe wyniki maksymalnych tolerowanych stężeń inhibitora przedstawiono w tabeli 53.

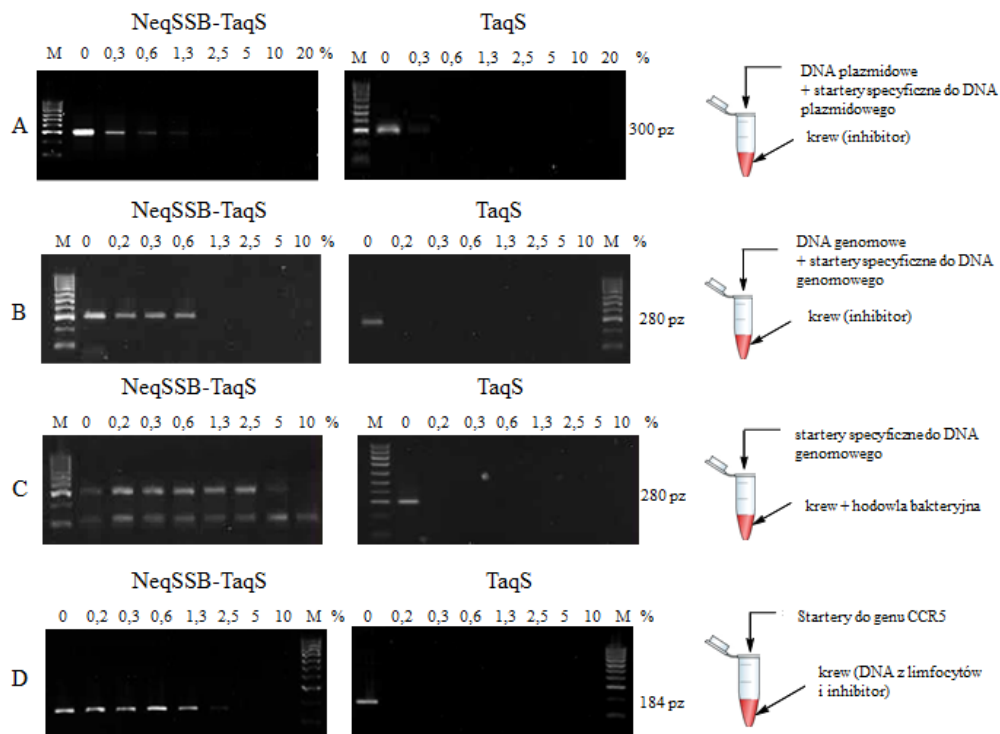
Tabela 53. Zestawienie wyników odporności polimeraz DNA na inhibitory przedstawione w postaci maksymalnych tolerowanych przez badane polimerazy DNA stężeń inhibitora w próbce reakcyjnej

	NeqSSB-Taqs	DBD-Taqs	RB69SSB-Taqs	TtePriB-Taqs	TaqStoffel
Laktoferyna	1,35 mg/ml	2,7 mg/ml	0,34 mg/ml	<0,4 mg/ml	0,085 mg/ml
Heparyna	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,47 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Krew	1,3%	<0,3%	<0,3%	<0,3%	<0,3%

14.2 Badanie zdolności fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-Taqs do amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej w różnych konfiguracjach matrycowego DNA

W oparciu o metodykę przedstawioną w pkt. 27.2 przeprowadzono reakcje PCR z różnymi wariantami źródeł matrycowego DNA w reakcji PCR: plazmidowe DNA,

genomowe DNA, DNA pochodzące bezpośrednio z hodowli bakteryjnej oraz z wykorzystaniem krwi jako źródła DNA (z limfocytów). Badaniu poddano jedynie fuzyjną polimerazę DNA NeqSSB-Taqs (oraz referencyjną polimerazę DNA Taqs), gdyż tylko ona wykazywała odporność na obecność krwi w mieszaninie reakcyjnej [Wyn. 14.1]. Wyniki odniesiono do referencyjnej polimerazy DNA Taqs i przedstawiono na rysunku 39.



Rysunek 39. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający porównanie odporności fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-Taqs w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Taqs. Wyniki przedstawiają produkty PCR powstałe w reakcji amplifikacji DNA z dodatkiem wzrastającego stężenia krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej. (A) Wynik amplifikacji fragmentu DNA z wykorzystaniem jako matrycy plazmidowego DNA [Met. 27.2.1], (B) wynik amplifikacji genu *nucA* z wykorzystaniem genomowego DNA *S. aureus* [Met. 27.2.2], (C) wynik amplifikacji genu *nucA* bezpośrednio z hodowli bakteryjnej *S. aureus* [Met. 27.2.3], (D) wynik amplifikacji ludzkiego genu *CCR5* bez dodatku matrycy DNA z zewnątrz (krew pełni funkcję inhibitora i jednocześnie źródła matrycy DNA) [Met. 27.2.4]. Nad ścieżkami wskazano stężenie końcowe krwi pełnej dodanej do mieszaniny reakcyjnej PCR. M – marker DNA HyperLadder II [Mat. 5]

Otrzymane wyniki wskazują na zdecydowaną różnicę w zdolności do amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej przez fuzyjną polimerazę DNA NeqSSB-Taqs w stosunku do referencyjnej polimerazy Taqs. We wszystkich przebadanych wariantach polimeraza DNA NeqSSB-Taqs wykazała większą odporność na obecność inhibitora w mieszaninie reakcyjnej, jednak w zależności od stosowanego źródła matrycy DNA wyniki nieco się różniły, na co miała wpływ przede wszystkim dostępność matrycy DNA – jej stężenie i liczba kopii genu. Największą inhibicję zaobserwowano stosując jako matrycę genomowe DNA *S. aureus* (1,3% krwi pełnej

hamuje reakcję) oraz DNA plazmidowe (hamowanie reakcji PCR przy 2,5% krwi). Największą odporność na obecność krwi w mieszaninie zanotowano w przypadku zastosowania DNA pochodzącego bezpośrednio z hodowli bakteryjnej (całkowite hamowanie reakcji przy 10% krwi) oraz w sytuacji, gdy krew pełniła rolę inhibitora i źródła matrycy DNA jednocześnie (hamowanie przy 5% krwi w próbce). W ostatnim wariancie na wydajność amplifikacji miało wpływ nie tylko stężenie inhibitora, ale i zmieniające się równocześnie stężenie matrycy DNA w próbce reakcyjnej.

III. Oddziaływanie fuzyjnych polimeraz DNA z kwasami nukleinowymi

W niniejszym rozdziale przedstawiono dwa rodzaje eksperymentów, które miały na celu przedstawienie zdolności fuzyjnych polimeraz DNA do oddziaływania z jedno- i dwuniciowym DNA w porównaniu z polimerazą referencyjną oraz określenie wpływu białka wiążącego DNA na proces hybrydyzacji oligonukleotydów do matrycy DNA.

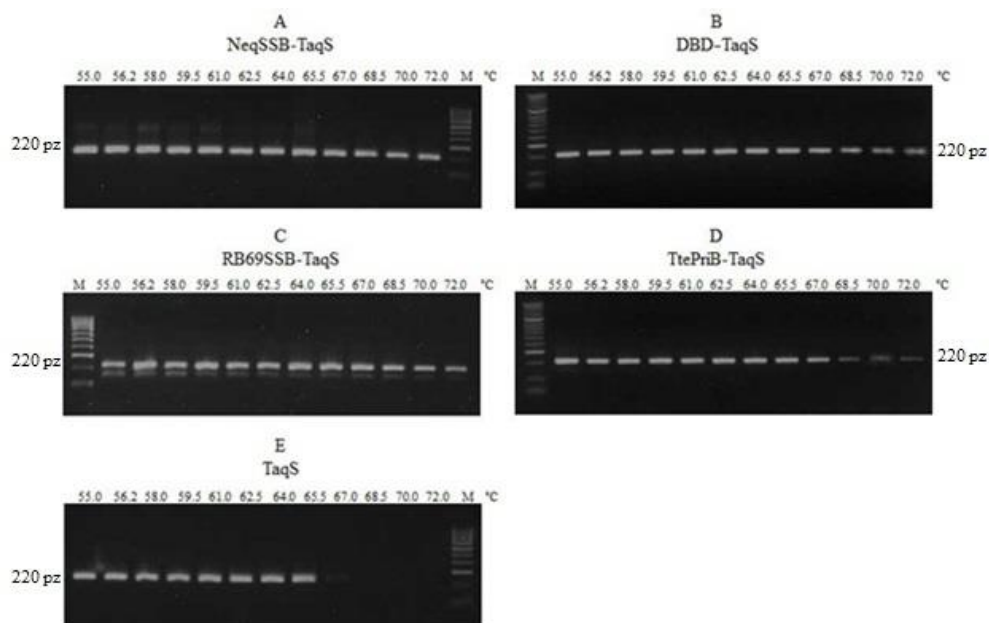
15. Wpływ białek fuzyjnych polimeraz DNA na amplifikację w warunkach wysokich temperatur hybrydyzacji starterów

Cechą wspólną, charakterystyczną dla białek wykorzystanych do fuzji z polimerazą DNA jest ich zdolność do wiązania DNA i jego stabilizacji. Cechy te mogą mieć znaczenie w reakcji amplifikacji DNA na etapie hybrydyzacji startera do matrycy DNA. W celu sprawdzenia wpływu fuzyjnych polimeraz DNA na proces hybrydyzacji startera przeprowadzono test zgodnie z protokołem przedstawionym w pkt. 28 metod.

Eksperymenty oparte były na reakcji PCR. W pracy wykorzystano genomowe DNA ludzkie do amplifikacji fragmentu genu *CCR5* (produkt amplifikacji o długości 220 pz). Przeprowadzono szereg eksperymentów, w których parametrem zmiennym była temperatura hybrydyzacji starterów w zakresie od 55°C do 72°C w cyklach reakcji PCR. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 40.

Wyniki wskazują, że wszystkie fuzyjne polimerazy DNA są zdolne do przeprowadzenia reakcji PCR nawet w temperaturze 72°C, podczas gdy optymalna temperatura przyłączania starterów wynosiła 55°C. W przypadku referencyjnej polimerazy DNA TaqS uzyskano produkt PCR przy maksymalnej temperaturze przyłączania starterów wynoszącej 65,5°C. Obecność w fuzyjnej polimerazie DNA dodatkowego białka o naturalnej zdolności wiązania DNA najprawdopodobniej stabilizuje jednoniciową matrycę DNA lub dwuniciową strukturę powstałą w wyniku hybrydyzacji matrycy DNA z oligonukleotydem dzięki czemu reakcja PCR może zachodzić w wyższej temperaturze.

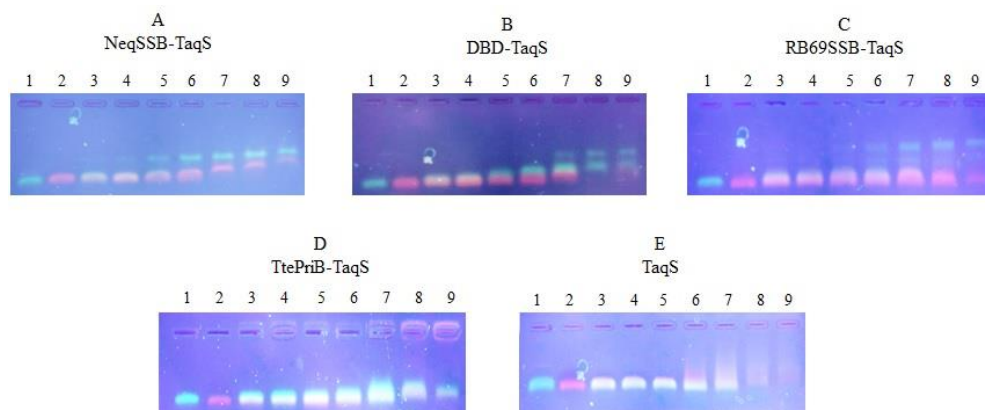




Rysunek 40. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] produktów PCR uzyskanych w wyniku amplifikacji genu *CCR5* we wzrastającej temperaturze przyłączenia starterów od 55°C do 72°C. Wynik amplifikacji genu *CCR5* z użyciem 1 U polimerazy DNA NeqSSB-Taqs (A), DBD-Taqs (B), RB69SSB-Taqs (C), TtePriB-Taqs (D) oraz Taqs (E). Nad ścieżkami wskazano zastosowane temperatury przyłączenia starterów w reakcji PCR. M – marker DNA HyperLadder II

16. Badanie oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA i dsDNA

Test EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay) miał na celu sprawdzenie zdolności badanych polimeraz DNA do wiązania kwasów nukleinowych oraz wykazania różnic w powinowactwie do jedno- i dwuniciowego DNA. Test przeprowadzono w oparciu o metodykę opisaną przez Olszewskiego i współpracowników (86) [Met. 29]. Kolor różowy przedstawia kompleksy powstałe z udziałem dwuniciowego DNA (produkt PCR o wielkości 100 pz), natomiast zielony jednoniciowego DNA (znakowany fluorescencyjnie oligonukleotyd d(T)₇₆ [Mat. 3]). Wyniki rozdziału elektroforetycznego [Mat. 9, Met. 3] DNA poddanego kompleksowaniu z badanymi polimerazami DNA zgodnie z metodyką opisaną w pkt. 29 metod przedstawia rysunek 41.



Rysunek 41. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny [Mat. 9, Met. 3] przedstawiający wyniki testu opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej DNA w obecności polimerazy DNA NeqSSB-TaqS (A), DBD-TaqS (B), RB69SSB-TaqS (C), TtePriB-TaqS (D) oraz TaqS (E) z ssDNA oraz dsDNA. Mieszanina reakcyjna zawierała 10 pmol ($d(T)_{76}$) oraz 2,5 pmol produktu PCR o długości 100 pz dla panelu A, B, C, D ścieżki oznaczają:

- 1 - $d(T)_{76}$
- 2 - 100 pz
- 3 - $d(T)_{76}+100$ pz +3,3 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 4 - $d(T)_{76}+100$ pz +6,6 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 5 - $d(T)_{76}+100$ pz +13,2 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 6 - $d(T)_{76}+100$ pz +26,4 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 7 - $d(T)_{76}+100$ pz +52,8 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 8 - $d(T)_{76}+100$ pz +105,6 pmol fuzyjnej polimerazy DNA
- 9 - $d(T)_{76}+100$ pz +211,2 pmol fuzyjnej polimerazy DNA

Dla panelu E ścieżki oznaczają:

- 1 - $d(T)_{76}$
- 2 - 100 pz
- 3 - $d(T)_{76}+100$ pz +24,6 pmol polimerazy DNA TaqS
- 4 - $d(T)_{76}+100$ pz + 49,2 pmol polimerazy DNA TaqS
- 5 - $d(T)_{76}+100$ pz + 98,4 pmol polimerazy DNA TaqS
- 6 - $d(T)_{76}+100$ pz + 196,8 pmol polimerazy DNA TaqS
- 7 - $d(T)_{76}+100$ pz + 393,6 pmol polimerazy DNA TaqS
- 8 - $d(T)_{76}+100$ pz + 787,2 pmol polimerazy DNA TaqS
- 9 - $d(T)_{76}+100$ pz + 1574,4 pmol polimerazy DNA TaqS

Wyniki testu EMSA wskazują na zwiększoną zdolność wiązania ssDNA lub dsDNA przez fuzyjne polimerazy DNA w stosunku do polimerazy DNA TaqS.

Polimerazy DNA NeqSSB-TaqS oraz DBD-TaqS wykazują wyższe powinowactwo do jedno- jak i dwuniciowego DNA w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. Częściowe wiązanie ssDNA widoczne jest już przy dodaniu 3,3 pmol polimerazy DNA NeqSSB-TaqS (ścieżka 3) oraz 52,8 pmol polimerazy DNA DBD-TaqS (ścieżka 7), natomiast pełne wiązanie przy dodaniu 26,4 pmol polimerazy DNA NeqSSB-TaqS (ścieżka 6). Wiązanie dwuniciowego DNA obserwuje się przy 52,8 pmol (ścieżka 7) fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-TaqS oraz DBD-TaqS. W przypadku fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-TaqS wyraźnie zauważalna jest wyższa preferencja do wiązania ssDNA niż do dsDNA, co jest zgodne z właściwościami białka NeqSSB opisanymi przez Olszewskiego i współpracowników (86).



Polimeraza DNA w fuzji z białkiem RB69SSB w tym zakresie stężeń wykazuje zdolność wiązania jedynie ssDNA. Obserwacje te są odzwierciedleniem właściwości białka RB69SSB, które ma zdolność wiązania tylko jednego rodzaju DNA – ssDNA (83). Wiązanie jednoniciowego DNA zauważalne jest już przy użyciu 13,2 pmol polimerazy DNA (ścieżka 5) i tworzy kompleksy charakterystyczne dla białek SSB (86).

Polimeraza DNA w fuzji TtePriB, podobnie jak samo białko TtePriB (88), wykazuje zdolność wiązania zarówno ssDNA jak i dsDNA, z większą preferencją do formy dwuniciowej. Częściowe wiązanie ssDNA występuje przy dodaniu 52,8 pmol polimerazy DNA (ścieżka 7), a pełne wiązanie dwuniciowego DNA przy 105,6 pmol polimerazy fuzyjnej TtePriB-TaqS (ścieżka 8). Wiązanie dwuniciowego DNA przez polimerazę DNA różni się od opisanych wyżej białek, rysunek 43 wskazuje, że kompleks dsDNA-białko mimo przeprowadzonego rozdziłu elektroforetycznego pozostaje w studziencie żelu. Jest to najprawdopodobniej efekt tego, że powstały kompleks jest bardzo duży, wiele cząsteczek enzymu przyłącza się do jednej nici DNA. Taki sposób wiązania został już zaobserwowany i opisany dla niektórych białek PriB (głównie w odniesieniu do ssDNA) (107), ale również innych białek wiążących dwuniciowe DNA (108)(109).

W przypadku polimerazy DNA TaqS oddziaływanie z DNA zauważane jest dopiero przy użyciu polimerazy DNA o 7,5-krotnie wyższym stężeniu niż fuzyjnej polimerazy DNA o największym powinowactwie do DNA (NeqSSB-TaqS). Polimeraza DNA TaqS dopiero przy 196,8 pmolach (ścieżka 6) wykazuje częściową zdolność wiązania zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA bez wyraźnie wskazanej preferencji. Co więcej, wyniki wskazują na zupełnie inny sposób oddziaływania polimerazy DNA TaqS z DNA. Polimerazy DNA w fuzji z białkami SSB oraz domeną DBD tworzą wyraźne kompleksy charakterystyczne dla oddziaływania białek SSB z DNA (86). W przypadku polimerazy DNA TaqS nie dochodzi do powstawania takich kompleksów.

Powyższe obserwacje świadczą o znacznie zwiększonym powinowactwie polimeraz fuzyjnych do DNA w stosunku do polimerazy referencyjnej Taq, dzięki obecności dodatkowego białka wiążącego DNA.

ROZDZIAŁ 8

WNIOSKI I DYSKUSJA

Obecnie reakcje amplifikacji DNA, w tym zwłaszcza reakcja PCR wykazują bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce, biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej. Efektywność tych reakcji, rozumiana jako wydajność i wierność przeprowadzonej amplifikacji, jest nieodłącznie związana ze stosowaną polimerazą DNA i warunkami w jakich ta reakcja zachodzi. Aby sprostać wymaganiom stawianym przez nowoczesne metody diagnostyczne oraz współczesną inżynierię genetyczną konieczne jest poszukiwanie polimeraz DNA o coraz lepszych właściwościach. Dotychczas wprowadzane modyfikacje w reakcjach PCR to przede wszystkim stosowanie udoskonalonych buforów, wzmacniaczy reakcji PCR lub wprowadzanie mutacji w polimerazach DNA. Modyfikacje składników mieszaniny reakcyjnej lub samego enzymu pozwalają na ulepszenie właściwości polimeraz DNA np. zwiększenie termostabilności, zwiększenie odporności na inhibitory z próbek klinicznych czy środowiskowych. Ponadto w ostatnich latach badania nad fuzyjnymi polimerazami DNA wykazały, że przyłączenie do polimerazy DNA dodatkowego białka wiążącego DNA może wpłynąć na jej właściwości tj. zwiększenie termostabilności, procesywności czy wierności. Jest to stosunkowo nowe i obiecujące podejście w modyfikacji enzymów, które wymaga racjonalnego zaprojektowania układu fuzyjnego oraz przeprowadzenia serii szczegółowych badań, aby uzyskać efektywnie działającą fuzyjną polimerazę DNA o ulepszonych właściwościach.

Jak do tej pory w publikacjach opisanych zostało tylko sześć wariantów fuzyjnych polimeraz DNA z wykorzystaniem jedynie trzech różnych białek wiążących jedno- lub dwuniciowe DNA. Wszystkie uzyskane fuzyjne polimerazy DNA wykazywały kilkakrotnie wyższą procesywność, większe powinowactwo do matrycy DNA, wyższą termostabilność, a w niektórych przypadkach również wierność. Na rynku dostępna jest tylko jedna fuzyjna polimeraza DNA Pfu w fuzyji z białkiem Sso7d wiążącym dwuniciowe DNA. Jest ona najnowszym osiągnięciem w inżynierii genetycznej w przypadku polimeraz DNA stosowanych w technikach amplifikacji kwasów nukleinowych. Jest to jedna z obecnie najpopularniejszych i jednocześnie najdroższych polimeraz DNA, którą produkują największe firmy biotechnologiczne na świecie: ThermoFisherScientific (USA), New England Biolabs (UK), Bio-Rad (USA) oraz Agilent



Technologies (USA). Producenci wskazują na jej unikalne właściwości tj. kilkadziesiąt razy wyższą wierność w stosunku do polimerazy DNA Taq oraz kilkukrotnie w stosunku do polimerazy DNA Pfu, zdolność wydajnej amplifikacji fragmentów DNA do 20 kpz, bardzo wysoką procesywność i szybkość syntezy DNA sięgającą 4 kpz/min oraz zdolność amplifikacji matryc DNA o dużej zawartości par GC. W związku z tym, że jest to jak dotąd jedyna komercyjnie dostępna fuzyjna polimeraza DNA, nie ma na rynku fuzyjnej polimerazy DNA *Thermus aquaticus*. W literaturze brakuje też informacji na temat uzyskania fuzji tej najczęściej stosowanej w diagnostyce molekularnej polimerazy DNA z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA. Dla żadnej z polimeraz DNA nie opisano też fuzji z białkami mającymi zdolność wiązania zarówno z jedno- jak i dwuniciowym DNA. Poza tym, jak do tej pory nie otrzymano fuzyjnej polimerazy DNA Taq połączonej z innym białkiem za pomocą linkera, który umożliwiłby enzymowi pewną elastyczność i minimalizuje niebezpieczeństwo powstania ewentualnej zawady sterycznej. Proponowane rozwiązanie może mieć korzystniejszy wpływ na aktywność fuzyjnych polimeraz DNA niż łączenie ich bezpośrednio z białkiem wiążącym DNA.

Poważnym problemem w reakcji PCR jest ograniczenie aktywności polimerazy DNA z powodu niewłaściwie dobranego składu czy pH buforu do reakcji PCR. Jony potasu (K^+) wpływają na wydajność hybrydyzacji, natomiast jony amonowe (NH_4^+) podnoszą specyficzność reakcji. Niewłaściwy dobór stężenia wolnych jonów Mg^{2+} może wpłynąć na brak amplifikacji lub spadek czułości reakcji. Należy również pamiętać, że w warunkach wysokiej temperatury spada pH buforu, dlatego wyjściowe pH powinno być wyższe niż optymalne. Dąży się do tego, aby nowe polimerazy wykazywały wysoką tolerancję w stosunku do pH buforu. Inną przyczyną zmniejszenia bądź utraty aktywności przez polimerazy DNA są inhibitory pochodzące z próbek klinicznych czy środowiskowych. Ze względu na czułość detekcji bardzo często zalecane jest korzystanie z próbek tylko częściowo oczyszczonych lub wcale nie poddawanych obróbce (nieoczyszczonych). Szczególnie problematyczne są próbki krwi (41), które służą jako materiał do wykrywania sepsy/bakteriemii oraz gleba w badaniach środowiskowych (110). Zapotrzebowanie na przeprowadzanie reakcji PCR na materiale, w którym znajduje się dużo różnych związków będących inhibitorami polimeraz DNA sprawiło, że zaczęto poszukiwać nowych rozwiązań np. poprzez poprawę składu buforów (np. dodatek tzw. wzmacniaczy) lub niwelujących sam efekt inhibicji (111). Na rynku dostępna jest zmodyfikowana polimeraza DNA Taq (Hemo KlenTaq, NEB, UK) charakteryzująca się zwiększoną odpornością na inhibitory zawarte w krwi pełnej (68). Jej modyfikacja polega jedynie na wprowadzeniu mutacji punktowych. Wciąż istnieje zapotrzebowanie na nowe rozwiązania, które zapewnią wyprodukowanie polimerazy DNA nie tylko odpornej na związki hamujące syntezę DNA, ale takiej która będzie wyróżniała się kompleksowo od innych dostępnych komercyjnie polimeraz.

Biorąc pod uwagę zapotrzebowanie na polimerazy DNA o wyżej wymienionych ulepszonych cechach oraz ze względu na otrzymanie przez naukowców niewielkiej liczby wariantów fuzyjnych polimeraz DNA oraz przeprowadzenie wąskiego zakresu badań z nimi związanych, postanowiono uzyskać własne unikalne konstrukty polimerazy DNA TaqS w fuzji z białkami (lub domeną) wiążącymi DNA z udziałem linkera.

Otrzymanie fuzyjnych polimeraz DNA miało na celu wykazanie pozytywnego wpływu fuzji różnych białek wiążących się z DNA na właściwości najbardziej popularnej polimerazy DNA TaqS.

1. Konstrukty fuzyjnych polimeraz DNA

Dobór odpowiednich białek wiążących kwasy nukleinowe wymagał dogłębnego przeglądu literaturowego w celu wytypowania kandydatów, których unikalne cechy i odpowiednia budowa dałyby podstawę sądzić, że wpłyną one pozytywnie na zdolności polimeryzacyjne polimeraz DNA. Ze względu na to, że polimeraza DNA Taq od ok. 30 lat jest wciąż najczęściej używaną w technikach amplifikacji DNA polimerazą, zwłaszcza w diagnostyce molekularnej, postanowiono poddać ją modyfikacjom poprzez połączenie z białkiem wiążącym DNA za pomocą linkera. Jako główny człon fuzyjnej polimerazy DNA wykorzystano polimerazę DNA Taq, której domenę egzonukleolityczną 5'→3' zastąpiono jednym z czterech wytypowanych białek wiążących DNA.

W niniejszej pracy polimerazę DNA połączono z białkiem wiążącym DNA (w czterech różnych wariantach) za pośrednictwem 6-aminokwasowego linkera (Gly – Ser – Gly – Gly – Val – Asp), identycznego jak łącznik zastosowany w fuzyjnej polimerazie DNA składającej się z polimerazy DNA *T. ziligi* i białka SsoSSB opatentowanej przez Lee i współpracowników (77). Do sekwencji linkera autorzy wyżej wymienionej fuzyjnej polimerazy DNA nie wnieśli zastrzeżeń patentowych. Zastosowanie linkera miało zapewnić białku wiążącemu DNA pewną elastyczność w stosunku do polimerazy DNA oraz zminimalizować niebezpieczeństwo powstania ewentualnej zawady sterycznej, co mogłoby zakłócić proces wiązania się z DNA i jego polimeryzację.

W celu utworzenia fuzyjnych polimeraz DNA zastosowano następujące białka: białko RB69SSB pochodzące z bakteriofaga RB69 wiążące jednoniciowe DNA; białko TtePriB mające zdolność wiązania zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA z preferencją do dwuniciowego DNA pochodzące z bakterii *Thermoanaerobacter tengcongensis*; domenę DBD ligazy *Pyrococcus furiosus* o zdolności wiązania dwuniciowego DNA i w mniejszym stopniu jednoniciowego DNA oraz białko NeqSSB pochodzące z archeona *Nanoarchaeum equitans* charakteryzujące się zdolnością wiązania wszystkich rodzajów DNA i RNA. Zastosowane w fuzji białka i domena DBD wydają się być idealnymi kandydatami ze względu na swoje unikalne właściwości – są to stosunkowo małe białka, zdolne do oddziaływania z DNA jako monomer. Ich pochodzenie z termofilnych mikroorganizmów sugeruje, że będą zachowywały stabilność w wysokich temperaturach, co jest niezwykle ważne w przypadku zastosowania w reakcjach PCR, gdzie temperatura denaturacji DNA wynosi powyżej 90°C. Warto zauważyć, że w literaturze przedstawiono pozytywny wpływ białka RB69SSB na amplifikację DNA, jako niezależnego czynnika wzmacniającego reakcję PCR oraz zastosowanego w fuzji z jego rodzimą polimerazą DNA (76), podobnie jak domena DBD, dodawana jako wzmacniacz w reakcji PCR (94). Białka TtePriB oraz NeqSSB to biomakromolekuły o niespotykanej budowie i interesujących właściwościach,



otrzymane i scharakteryzowane w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (86) (88). TtePriB jest jedynym znanym białkiem PriB termostabilnym o budowie monomerycznej. Natomiast NeqSSB to unikalne białko SSB-podobne mające zdolność wiązania wszystkich form kwasów nukleinowych. Ich zdolności do wiązania ssDNA i dsDNA pozwoliły przypuszczać, że mogą być one użyteczne w reakcji PCR.

2. Otrzymywanie fuzyjnych polimeraz DNA

Pierwszym etapem otrzymania fuzyjnych polimeraz DNA było klonowanie metodą Gibsona, która pozwala na jednoczesne klonowanie kilku fragmentów DNA. Warunkiem efektywnego klonowania tą metodą jest zastosowanie odpowiednich starterów [Mat. 6], które pozwolą na otrzymanie DNA insertów z dodatkowymi sekwencjami DNA komplementarnymi do fragmentu DNA (np. plazmidu lub innego insertu), z którym ma być połączone DNA insertu. Metoda ta pozwoliła na otrzymanie czterech konstruktów rekombinantowych: pET30-RB69SSB-Taqs, pET30-NeqSSB-Taqs, pET30-TtePriB-Taqs oraz pET30-DBD-Taqs. Ustalono, że najwydajniejsza ekspresja genu zachodzi po 5 h od indukcji IPTG, natomiast po dłuższym czasie hodowli obserwowano niższy poziom produkcji polimerazy DNA, co najprawdopodobniej świadczy o degradacji docelowych białek fuzyjnych. Rekombinantowe polimerazy DNA oczyszczono dwuetapowo: w pierwszej kolejności stosując termiczną denaturację białek gospodarza *E. coli*, a następnie chromatografię metalopowinowactwa. Aktywność specyficzna oczyszczonych fuzyjnych polimeraz DNA waha się od 1600 U/mg do 2200 U/mg, podczas gdy dla polimerazy DNA Taqs wynosi 1800 U/mg. Wynik ten sugeruje, że fuzja z białkiem wiążącym DNA nie wpływa negatywnie na aktywność katalityczną polimerazy DNA. Użyty bakteryjny system Tabora-Studiera pozwolił na produkcję fuzyjnych polimeraz DNA na poziomie 3 – 5 mg białka/l hodowli. W tych samych warunkach otrzymano 6 mg polimerazy DNA Taqs z litra hodowli. Dodatkowym etapem pozwalającym na otrzymanie w pełni czystego białka rekombinantowego było usunięcie kwasów nukleinowych, które mogłyby oddziaływać z polimerazą DNA, a przede wszystkim z białkami wykorzystanymi do fuzji, które wiążą DNA/RNA. Co więcej, wcześniej uzyskane w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii WCh PG doświadczenia z białkami PriB oraz SSB wskazują, że preparaty nieoczyszczone z DNA, poddane testom wiązania DNA (EMSA) wiążą DNA z dużo mniejszą efektywnością niż te, które poddano trawieniu DNazą. Zastosowanie nukleazy (Benzonaza [Mat. 3]) wymagało jednak usunięcia jej po przeprowadzonym trawieniu kwasów nukleinowych. Termiczna dezaktywacja nukleazy okazała się nieefektywna i po dłuższym czasie przechowywania polimeraz DNA w -20°C ulegała reaktywacji, uniemożliwiając amplifikację DNA podczas reakcji PCR. Dlatego też postanowiono usunąć nukleazę metodą chromatograficzną, przeprowadzając sączenie molekularne preparatów białkowych. Znaczne różnice w masach molekularnych obu białek (Viscolaza ok. 30 kDa, fuzyjna polimeraza DNA ok. 90 kDa) pozwoliły na efektywne pozbycie się nukleazy z preparatu polimeraz DNA. Tak przygotowane fuzyjne polimerazy DNA poddano badaniom molekularnym.

3. Dobór optymalnych warunków amplifikacji DNA dla fuzyjnych polimeraz DNA

Przeprowadzenie testów związanych z badaniem właściwości fuzyjnych polimeraz DNA poprzedzono opracowaniem optymalnych warunków amplifikacji DNA oraz określono aktywność dla każdej polimerazy DNA. W doborze najkorzystniejszego buforu wzorowano się na dostępnych komercyjnych buforach do reakcji PCR dedykowanych przede wszystkim polimerazie DNA Taq, który następnie zoptymalizowano pod względem pH i stężenia soli magnezu. Optymalne warunki buforowe fuzyjnych polimeraz DNA były zbliżone do referencyjnej polimerazy DNA TaqS, za wyjątkiem tolerancji jonów magnezu. Otrzymane fuzyjne polimerazy DNA wykazały się mniejszym zapotrzebowaniem na jony magnezu niż referencyjna polimeraza DNA TaqS. Jednocześnie zaobserwowano zwiększony optymalny zakres ich stężeń jaki może być zastosowany w reakcji PCR. Jest to korzystne zjawisko ze względów praktycznych, gdyż skraca czas optymalizacji reakcji PCR o etap optymalizacji jonów Mg^{2+} . W podobny sposób wykazano również zwiększoną tolerancję dwóch fuzyjnych polimeraz DNA na obecność soli KCl oraz $(NH_4)_2SO_4$ w mieszaninie reakcyjnej. Obecność białka fuzyjnego NeqSSB lub RB69SSB zwiększa tolerancję polimerazy DNA TaqS na te sole 2 – 3-krotnie.

Bardzo istotne było również wyznaczenie ilości jednostek aktywności otrzymanych polimeraz DNA, co pozwoliło na miarodajne porównywanie rekombinantowych enzymów z referencyjną polimerazą DNA. Postanowiono nie posługiwać się stężeniami molowymi polimeraz DNA, gdyż w przypadku badania enzymów posługiwanie się jednostkami aktywności wydaje się bardziej adekwatne. Porównanie ze sobą polimerazy DNA o tej samej ilości jednostek aktywności pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników umożliwiających wykazanie wpływu zastosowanych zmian w badanych polimerazach DNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA.

W celu wyznaczenia ilości jednostek aktywności polimeraz DNA posłużono się dostępnym komercyjnie zestawem EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit firmy Biotium [Mat. 3]. Opiera się on na pomiarze fluorescencji barwnika EvaGreen w izotermicznej reakcji prowadzonej w aparacie do real-time PCR i wykorzystuje zależność poziomu fluorescencji barwnika od aktywności polimerazy DNA i ilości inkorporowanych nukleotydów (103) (104) (105). Wyżej wymieniony sposób ustalenia aktywności jest metodą nową i jeszcze rzadko spotykaną w literaturze dotyczącej charakterystyki polimeraz DNA. Zaletą tej metody, w przeciwieństwie do najczęściej spotykanej w literaturze jest to, że jest ona bardzo precyzyjną, a zarazem bezpośrednią metodą pomiaru aktywności.

4. Właściwości fuzyjnych polimeraz DNA

Przedstawione w niniejszej pracy badania wskazują, że obecność dodatkowego białka lub domeny wiążącej DNA może poprawić podstawowe cechy polimerazy DNA tj. termostabilność, procesywność czy czułość reakcji, które przekładają się na inne jej

właściwości, takie jak zwiększona wydajność amplifikacji długich fragmentów DNA, matryc DNA o dużej zawartości par GC lub wzrost odporność na inhibitory reakcji PCR.

Wydłużenie czasu półtrwania wszystkich otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS (tabela 49, temperatura 95°C) może mieć swoje przełożenie w zwiększonej zdolności tych enzymów do amplifikacji produktów o dużej zawartości par GC (rysunek 37). Zastosowanie każdej z fuzyjnych polimeraz DNA (w ilości od 1 U do 3 U) pozwoliło wydajnie amplifikować DNA o zawartości par GC 78%, podczas gdy w przypadku polimerazy DNA TaqS nie uzyskano produktów reakcji.

Fuzyjne polimerazy DNA, z domeną DBD, bądź z białkiem NeqSSB conajmniej 2-krotnie przewyższają referencyjną polimerazę DNA w szybkości syntezy DNA. Szybkość elongacji wynosiła dla nich odpowiednio 30 s/kpz, 20 s/kpz, a dla polimerazy DNA TaqS 60 s/kpz (tabela 51). W przypadku dwóch wymienionych powyżej fuzyjnych polimeraz DNA zauważalna jest również poprawa procesywności. Tym razem przeprowadzony test wskazał na największą, około 2,5-krotną, poprawę procesywności polimerazy DNA w fuzji z domeną DBD (z 9 nt do 22 nt w jednej reakcji enzymatycznej) (rysunek 33, tabela 50). Wydaje się, że to właśnie poprawa procesywności miała największy wpływ na zwiększenie wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA. Badania wykazały, że polimeraza DNA TaqStoffel jest w stanie amplifikować DNA o wielkości do 8 tysięcy par zasad, podczas gdy fuzyjna polimeraza DNA DBD-TaqS w tych samych warunkach pozwala na uzyskanie produktów PCR o wielkości nawet do 10 tysięcy pz (rysunek 36).

Dużym problemem w diagnostyce i jednocześnie ogromnym wyzwaniem dla twórców nowoczesnych polimeraz DNA jest amplifikacja DNA prowadzona w obecności inhibitorów. Fuzyjne polimerazy DNA, za wyjątkiem polimerazy DNA w fuzji z białkiem TtePriB, ponownie okazały się wykazywać korzystniejsze cechy od referencyjnej polimerazy DNA TaqS (tabela 53). Tolerują one nawet kilkunastokrotnie wyższe stężenie laktoferyny oraz kilkukrotnie wyższe stężenie heparyny w mieszaninie reakcyjnej, które są jednymi z podstawowych inhibitorów w próbkach klinicznych (41). Przyczyną takiej poprawy może być znacząco wyższa czułość fuzyjnych polimeraz DNA, a tym samym większe powinowactwo do matrycy DNA (tabela 52). Wydaje się, że obecność domeny wiążącej kwasy nukleinowe sprawia, że matryca DNA jest selektywnie „wyłapywana” z mieszaniny reakcyjnej i nawet w obecności inhibitorów reakcja PCR może być wydajniej prowadzona. Co więcej, w przypadku związków, których inhibicja polega na chelatowaniu jonów magnezu z mieszaniny reakcyjnej, zdolność wydajnej amplifikacji fuzyjnej polimerazy DNA w nieco niższych stężeniach kofaktora (rysunek 30, tabela 45) może tłumaczyć ich zwiększoną odporność na inhibitory w mieszaninie reakcyjnej. W przypadku zagadnienia dotyczącego odporności na inhibitory na szczególną uwagę zasługuje polimeraza DNA w fuzji z białkiem pochodzącym z archeona *Nanoarchaeum equitans*. Przeprowadzone badania wskazały na jej zdecydowaną poprawę wydajności amplifikacji w obecności krwi pełnej. Żadna inna z otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA nie wykazała poprawy odporności na zawartość w mieszaninie reakcyjnej krwi pełnej (tabela 53). Wstępne badania, wykazujące odporność polimerazy DNA NeqSSB-TaqS na obecność 2,5% krwi pełnej w mieszaninie PCR, zasugerowały przeprowadzenie dodatkowych testów z różnymi



wariantami źródeł matrycowego DNA w reakcji PCR (rysunek 39). W zależności od podejścia wyniki nieco się różniły. Wpływ na to miała przede wszystkim dostępność matrycy DNA rozumiana jako stężenie DNA i liczba kopii amplifikowanego genu. W przypadku reakcji PCR z zastosowaniem genomowego DNA *S. aureus* już 1,3% krwi pełnej hamowało reakcję amplifikacji DNA, podczas gdy przy zastosowaniu jako matrycy DNA plazmidowego DNA o tym samym stężeniu (ale różnej ilości kopii) 2,5% krwi pełnej prowadziło do pełnego hamowania reakcji PCR. Największą odporność na obecność krwi w mieszaninie zaobserwowano w próbce z hodowlą bakteryjną (całkowite hamowanie reakcji przy 10% krwi), gdzie oznaczenie ilości dostępnego matrycowego DNA było bardzo trudne i najpewniej przewyższało ilością kopii wcześniej badane matryce DNA. Hamowanie reakcji na poziomie 5% krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej obserwowano w sytuacji, gdy krew pełniła rolę inhibitora i źródła matrycy DNA. W tym przypadku na wydajność amplifikacji wpływ mało nie tylko rosnące stężenie inhibitora (wpływ negatywny), ale i zwiększające się równocześnie stężenie matrycy DNA w próbce (wpływ pozytywny). Te badania również potwierdzają wysuniętą wcześniej tezę, że odporność polimeraz DNA na hamujące działanie krwi w mieszaninie reakcyjnej zależy od zwiększonej czułości polimerazy DNA i jej powinowactwa do matrycy DNA. Polimeraza DNA w fuzji z białkiem NeqSSB wykazuje największą spośród pozostałych fuzyjnych polimeraz DNA czułość, tzn. 1000-krotnie wyższą niż referencyjna polimeraza DNA TaqS.

Fuzyjne polimerazy DNA okazały się przewyższać referencyjną polimerazę DNA TaqS swoimi cechami użytkowymi. Ogólne wyniki przedstawiające zmianę cech fuzyjnych polimeraz DNA w porównaniu z polimerazą DNA referencyjną przedstawia tabela 54.

Tabela 54. Porównanie cech fuzyjnych polimeraz DNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS. „+” oznacza poprawę cech w stosunku do polimerazy DNA TaqS, „0” brak zmian w porównaniu do polimerazy DNA TaqS, „-” pogorszenie cech w stosunku do polimerazy DNA TaqS. Odcieniami szarości pogrupowano właściwości polimeraz DNA, które w stosunku do siebie mogą wykazywać pewne zależności

NeqSSB-TaqS	DBD-TaqS	RB69SSB-TaqS	TtePriB-TaqS		
++	++	+	+	Termostabilność	
++	+	+	+	Matryce DNA bogate w GC	
+	++	0	0	Procesywność	
0	+	0	0	Wydajność amplifikacji długich fragmentów DNA	
+++	++	+	0	Czułość polimeraz DNA	
++	++	+	0	Laktoferyna	Odporność na inhibitory
+++	+++	+	-	Heparyna	
+	0	0	0	Krew pełna	

5. Oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z kwasami nukleinowymi

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wstępną analizę sposobu oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z kwasami nukleinowymi, wykorzystując w tym celu dwa niezależne testy: badanie wpływu wzrostu temperatury przyłączania starterów na proces ich hybrydyzacji z matrycą DNA oraz badanie oddziaływania

fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA i dsDNA (test EMSA). Uzyskane w powyższych testach wyniki pozwalają stwierdzić, że polepszone cechy fuzyjnych polimeraz DNA w porównaniu z polimerazą DNA TaqS są najprawdopodobniej wynikiem różnic w ich powinowactwie i sposobie wiązania z DNA. Wskazują na to przede wszystkim wyniki uzyskane w teście wiązania DNA. Obecność dodatkowej struktury o zdolności wiązania zarówno z ssDNA jak i dsDNA (NeqSSB, TtePriB, DBD) zwiększyło powinowactwo polimerazy DNA TaqS do obu typów kwasów nukleinowych. W przypadku fuzji z białkiem wiążącym jednoniciowe DNA (RB69SSB) zauważano zwiększone powinowactwo właśnie do ssDNA, a nie do dsDNA, co jest tożsame z właściwościami tego białka w formie natywnej (rysunek 41). Badania wskazują, że powinowactwo polimerazy DNA TaqS do dsDNA, a zwłaszcza ssDNA, jest zdecydowanie niższe niż polimerazy DNA TaqS w fuzji z dodatkowym białkiem. Uzyskanie zauważalnego, ale bardzo ograniczonego oddziaływania polimerazy DNA TaqS z DNA wymagało użycia preparatu białkowego o stężeniu, przy którym fuzyjne polimerazy DNA, a zwłaszcza ta o największym powinowactwie do DNA (NeqSSB-TaqS), wiążą już całkowicie jedno- lub dwuniciowego DNA. Potwierdzają to również badania literaturowe wiązania DNA przez polimerazę DNA oraz inne białka wiążące DNA tj. białka SSB, które wskazują na większe powinowactwo białek SSB do DNA niż w przypadku polimeraz DNA do DNA (112)(113). Co więcej, wiązanie DNA przez polimerazę DNA TaqS odbywa się w zupełnie inny sposób niż wiązanie DNA przez fuzyjne polimerazy DNA. W fuzyjnej polimerazie DNA to białko SSB lub domena DBD odpowiada za tak specyficzne i preferencyjne wiązanie DNA, co sugerują powstałe i widoczne w żelu kompleksy białko-DNA charakterystyczne dla białek SSB (86). Kompleksy tego typu nie występują jednak w przypadku fuzyjnej polimerazy DNA TtePriB-TaqS. Nieopublikowane badania przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii w zespole doktora Marcina Olszewskiego wskazują, że białko TtePriB, jako przedstawiciel białek PriB, wiąże DNA w zupełnie inny sposób (114). Oddziałując z dsDNA tworzy kompleksy białko-DNA na tyle duże (wiele cząsteczek białka PriB przyłącza się do jednej nici DNA), że pozostają one w studzienkach żelu (jak na rysunku 41). Możliwe jest, że taki sposób wiązania DNA przez polimerazę DNA nie jest pożądany w reakcji PCR, stąd brak poprawy cech tej fuzyjnej polimerazy DNA w stosunku do polimerazy DNA bez fuzji w większości z przeprowadzonych testów. Przeprowadzone w ostatnim czasie w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii WCh PG badania nad białkiem TtePriB pod kątem jego aplikacji jako wzmacniacza reakcji PCR wskazują, że białko to nie wpływa pozytywnie na reakcję amplifikacji DNA, co więcej, w pewnych stężeniach ją nawet hamuje (114). Wydaje się, że to właśnie jego specyficzny sposób wiązania z DNA ogranicza jego możliwości jako idealnego kandydata do fuzji z polimerazą DNA.

Powyżej opisane rezultaty testu EMSA ułatwiają interpretację wyników uzyskanych w teście wpływu dodatkowego białka na proces hybrydyzacji startera (rysunek 40). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na zwiększoną zdolność fuzyjnych polimeraz DNA do stabilizacji kompleksu matryca – starter w porównaniu z polimerazą DNA TaqS. Obecność dodatkowego białka wiążącego DNA może stabilizować jednoniciową matrycę DNA lub dwuniciowy kompleks powstały w wyniku hybrydyzacji, a reakcja PCR może zachodzić przy wyższej temperaturze przyłączania startera niż z udziałem referencyjnej polimerazy DNA. Ta stabilizacja prawdopodobnie



sprawia, że reakcja PCR prowadzona z udziałem fuzyjnej polimerazy DNA może zachodzić z wyższą specyficznością.

6. Proponowane aplikacje dla fuzyjnych polimeraz DNA

Otrzymane fuzyjne polimerazy DNA okazały się przewyższać cechami użytkowymi referencyjną polimerazę DNA TaqS. Analiza otrzymanych wyników testów porównawczych wskazuje, że fuzyjne polimerazy DNA mogą z powodzeniem być stosowane jako rozwiązania wielu problemów napotykanym w reakcjach PCR. Otrzymane fuzyjne enzymy to idealne narzędzie w przypadku amplifikacji trudnych matryc DNA, można je bowiem stosować przy powielaniu sekwencji nukleotydowych o dużej zawartości par GC np. dla *Mycobacterium tuberculosis* (wszystkie otrzymane białka fuzyjne), długich fragmentów DNA (białko fuzyjne z domeną DBD), ale także w przypadku badań diagnostycznych z wykorzystaniem próbek klinicznych (głównie białko fuzyjne z NeqSSB, ale również DBD i RB69SSB), gdzie inhibitory stanowią duże wyzwanie.

Problemem w reakcjach PCR jest również powstawanie niespecyficznego produktu PCR, które trudno jest wyeliminować. Długotrwały proces optymalizacji składu mieszaniny reakcyjnej czy poszukiwania odpowiednich sekwencji starterów można zastąpić często innym rozwiązaniem jakim jest podniesienie temperatury przyłączenia startera. Fuzyjne polimerazy DNA dzięki obecności domeny wiążącej DNA, stabilizują w dużym stopniu matrycę DNA lub dwuniciowy kompleks starter – matryca DNA i pozwalają na znaczne podniesienie temperatury hybrydyzacji bez spadku wydajności amplifikacji DNA. W konsekwencji umożliwiają amplifikację oczekiwanego fragmentu DNA przy minimalnej optymalizacji warunków reakcji.

Fuzyjne polimerazy DNA, zwłaszcza w fuzji z białkami NeqSSB oraz DBD, dzięki swojej wysokiej procesywności mogą pozwolić na szybszą diagnostykę molekularną wielu chorób wywołanych przez mikroorganizmy. Jednym z głównych trendów diagnostyki medycznej jest przyspieszenie procedury identyfikacji mikroorganizmów w badanej próbce, a przez to szybsze postawienie poprawnej diagnozy i włączenie poprawnego leczenia (antybiotykoterapii).

Zwiększona procesywność, siła wiązania DNA oraz zdolność amplifikacji długich matryc pozwala przypuszczać, że fuzyjne polimerazy DNA znajdą zastosowanie do różnicowania szczepów bakteryjnych lub grzybiczych z wykorzystaniem metod typowania genetycznego typu "fingerprint" np. w reakcji RAPD (ang. Random Amplification of Polymorphic DNA) czy MP PCR (ang. PCR Melting Profile). Polimerazy te mogą odpowiadać za wyższy potencjał różnicujący metody poprzez amplifikację szerszego zakresu fragmentów DNA, w tym fragmentów o długościach większych niż 1000 pz. Dałoby to szansę na zastosowanie do detekcji żeli agarozowych, znacznie szybszych i wygodniejszych w przygotowaniu i użyciu. Ponadto zwiększone powinowactwo polimeraz do DNA daje szansę na podniesienie specyficzności reakcji w układach tzw. multiplex PCR, której dużym problemem jest pojawianie się produktów niespecyficznego powstających pod nieobecność w badanej próbce sekwencji docelowej, do której startery mogłyby się wiązać.



Przedstawione rozwiązania to tylko przykładowe zastosowania fuzyjnych polimeraz DNA. Jako enzymy o polepszonych cechach użytkowych mogą być z powodzeniem stosowane we wszystkich dziedzinach inżynierii genetycznej, biologii oraz diagnostyki molekularnej.

7. Istotne cechy polimeraz DNA i białek użytych jako składowe fuzyjnych polimeraz DNA

Przedstawione w niniejszej pracy badania, a także wyniki uzyskane przez innych naukowców dowodzą, że zastosowanie dodatkowego białka w fuzji z polimerazą DNA może wpłynąć pozytywnie na wiele cech tego enzymu. Chcąc uzyskać fuzyjną polimerazę DNA o porządkanych cechach warto zastanowić się nad doborem zarówno poddanej fuzji polimerazy DNA jak i połączonego z nią białka. Polimerazy DNA dzięki obecności lub braku odpowiednich domen czy naturalnych zdolnościach amplifikacji w trudnych warunkach mogą być potencjalnymi kandydatami do fuzji w zależności od oczekiwanego finalnego zastosowania fuzyjnego enzymu. Dobór odpowiedniego enzymu należy oprzeć na analizie jego cech co przedstawiono już we wcześniejszych rozdziałach i zebrano w tabeli 3. Nieco bardziej problematyczny wydaje się wybór odpowiedniego partnera fuzyjnego. Jak do tej pory (biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe oraz przedstawione w tej pracy badania) przeprowadzono fuzje z białkami o zdolności wiązania jednoniciowego DNA (RB69SSB oraz SsoSSB), dwuniciowego DNA (Sso7d), jedno- i dwuniciowego DNA z preferencją do ssDNA (domena DBD ligazy *P. furiosus*) lub dsDNA (TtePriB) oraz białkiem o zdolności wiązania wszystkich rodzajów DNA i RNA (NeqSSB). Każde z wyżej wymienionych białek fuzyjnych charakteryzuje się odmiennymi właściwościami przedstawionymi w tabeli 55.

Ważną cechą białek będących partnerami fuzyjnymi polimeraz DNA pochodzącymi zarówno z bakteriofaga, bakterii czy archeonów jest zarazem monomeryczna budowa, jak i wysoka termostabilność niezbędna w reakcji PCR. Zastosowane w fuzji białka, ze względów sterycznych, powinny być stosunkowo niewielkich rozmiarów. Największe zastosowane białko miało 33 kDa (RB69SSB) i nie wpływało negatywnie na stabilność oraz aktywność katalityczną powstałej fuzyjnej polimerazy DNA.

Zdolność białka do wiązania DNA jest główną cechą determinującą wybór kandydata do fuzji, a tabela 55 sugeruje, że niezależnie od rodzaju wiążanego białka obserwuje się poprawę pewnych cech polimeraz DNA. Okazuje się, że białka o zdolności wiązania dwuniciowego DNA oraz wszystkich rodzajów DNA wykazują najwięcej ulepszonych właściwości. Jedynym białkiem, które w najmniejszym stopniu pozytywnie wpłynęło na finalne właściwości enzymu, było białko TtePriB. Badania wskazują, że zastosowanie samego białka jako wzmacniacza reakcji PCR również nie wpływa pozytywnie na poprawę amplifikacji (114).



Tabela 55. Porównanie cech fuzyjnych polimeraz DNA oraz charakterystyka białek zastosowanych w fuzji. „+” oznacza poprawę właściwości w stosunku do polimerazy DNA bez fuzji, „0” brak zmian w stosunku do polimerazy DNA bez fuzji, „b.d.” brak danych literaturowych na ten temat (73) (74) (75) (76) (77)

	RB69SSB		SsoSSB	Sso7d					TtePriB	DBD	NeqSSB	
Rodzaj wiązanych kwasów nukleinowych	ssDNA		ssDNA	dsDNA					dsDNA, ssDNA	ssDNA, dsDNA	ssDNA, dsDNA, RNA	
Wielkość [kDa]	33		16	7					25	23	28	
Pochodzenie	Bakteriofag RB69		<i>S. solfataricus</i>	<i>S. solfataricus</i>					<i>T. tengcongensis</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>N. equitans</i>	
Fuzja z polimerazą DNA	RB69 Pol	TaqS Pol	Tzi Pol	Taq Pol	Taq S Pol	Pfu Pol	Tpa Pol	KOD Pol	TaqS Pol	TaqS Pol	TaqS Pol	
Zmiana cech w stosunku do polimerazy bez fuzji	Termostabilność	b.d.	+	b.d.	0	0	0	b.d.	0	+	+	+
	Wierność	0	b.d.	+	b.d.	b.d.	b.d.	0	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	Procesywność	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+
	Wydajność amplifikacji długich produktów PCR	b.d.	0	b.d.	+	+	+	+	+	0	+	0
	Czułość	+	+	+	+	+	+	b.d.	b.d.	0	+	+
	Matryce DNA bogate w GC	b.d.	+	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	+	+	+
	Odporność na inhibitory	b.d.	+	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	0	+	+
	Tolerancja na sole w buforze	b.d.	+	b.d.	+	+	+	+	b.d.	0	0	+

Z danych literaturowych wynika, że białko RB69SSB czy domena DBD z powodzeniem stosowane jako wzmacniacze reakcji PCR (85) (94), sprawdziły się też jako białka fuzyjne. Kolejną cechą białka TtePriB, które może ograniczać je pod względem użyteczności w fuzji jest jego specyficzny sposób wiązanie do dsDNA. Test wiązania wykazuje, że TtePriB jest w stanie wiązać dwuniciowe DNA poprzez tworzenie na tyle dużego kompleksu białko – DNA, że zostaje on w studzience żelu (rysunek 41). Można podejrzewać, że taki sposób wiązania nie sprzyja wydajnej reakcji PCR, co świadczy o tym, że czynnikiem determinującym wybór kandydata do fuzji powinien być również sposób wiązania przez niego DNA.

Podsumowując, idealny kandydat do fuzji z polimerazą DNA powinien charakteryzować się:

- zdolnością do wiązania DNA – głównie dwuniciowego,
- odpowiednim sposobem wiązania DNA,
- niewielkimi rozmiarami,
- monomeryczną budową,
- wysoką termostabilnością,
- działać jako wzmacniacz w reakcji PCR.



ROZDZIAŁ 9

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania pozwoliły na otrzymanie czterech fuzyjnych polimeraz DNA TaqStoffel z białkami: NeqSSB, RB69SSB, TtePriB oraz domeną DBD. Analiza porównawcza właściwości wyżej wymienionych enzymów z referencyjną polimerazą DNA TaqStoffel wykazała, że:

- 1) obecność dodatkowego białka lub domeny wiążącej DNA ma pozytywny wpływ na cechy polimerazy DNA;
- 2) termostabilność wszystkich otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS została zwiększona w zakresie od 50% do 100% w temperaturze 95°C, co jest niezwykle istotne w reakcji PCR;
- 3) fuzyjne polimerazy DNA wykazują zdolność do amplifikacji fragmentów DNA bogatych w pary GC;
- 4) polimerazy DNA w fuzji z domeną DBD oraz NeqSSB wykazały poprawę procesywności - największą, około 2,5-krotną zauważono w przypadku fuzji z domeną DBD, co mogło mieć wpływ na zwiększenie jej wydajności w amplifikacji dużych produktów;
- 5) fuzyjne polimerazy DNA DBD-TaqS i NeqSSB-TaqS znacznie przewyższają referencyjną polimerazę DNA pod względem szybkości syntezy DNA odpowiednio 2- i 3-krotnie;
- 6) fuzyjne polimerazy DNA, za wyjątkiem TtePriB-TaqS, tolerują nawet kilkunastokrotnie wyższe stężenie laktoferyny oraz kilkakrotnie wyższe stężenie heparyny w mieszaninie reakcyjnej niż referencyjna polimeraza DNA TaqS;
- 7) polimerazy DNA w fuzji z RB69SSB, NeqSSB oraz domeną DBD wykazują dziesięcio- lub kilkudziesięciokrotnie zwiększoną czułość, a tym samym zwiększone powinowactwo do matrycy DNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA TaqS;
- 8) na szczególną uwagę zasługuje polimeraza DNA w fuzji z białkiem pochodzącym z *Nanoarchaeum equitans*, która jako jedyna wykazała zdolność amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej.



ROZDZIAŁ 10

INDEKS SKRÓTÓW

ang.	z angielskiego
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozynotrifosforan
BER	naprawa DNA w sposób pośredni (ang. <u>B</u> ase <u>E</u> xcision <u>R</u> epair)
BSA	surowicza albumina wołowa
CA	centrum aktywne enzymu
Da	Dalton
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <u>D</u> NA <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DMSO	dimetylosulfotlenek
dsDNA	dwuniciowa cząsteczka DNA
dNTPs	mieszanka deoksynukleotydów
dUTP	deoksyurdynotrifosforan
dITP	deoksyinozytotrifosforan
ddNTPs	dideoksynukleotydy
DTT	ditiotreitol
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EMSA	test opóźnienia migracji w żelu (ang. <u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay)
Exo	domena egzonukleolityczna 3'→5'
Exo-	delecja domena egzonukleolityczna 3'→5'
ΔF	różnica fluorescencji
ΔF _{MAX}	maksymalna różnica fluorescencji
hHh	motyw helisa-spinka do włosów-helisa (helix-hairpin-helix)
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd
KOD1	polimeraza DNA <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
LIC	ang. ligation-independing cloning
MP PCR	ang. PCR Melting Profile
mutS ⁻ , mutD ⁻ , mutT ⁻	delecja genu <i>mutS</i> , <i>mutD</i> , <i>mutT</i>
NAD ⁺	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
Neq	polimeraza DNA <i>Nanoarchaeum equitans</i>



NeqSSB	białko SSB pochodzące z <i>Nanoarchaeum equitans</i>
NT	nukleotydylotransferaza
OB	domena wiążąca ssDNA (ang. Oligonucleotide/ Oligosaccharide Binding Fold Domain)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
Pfu	polimeraza DNA <i>Pyrococcus furiosus</i>
Pfu-S	fuzyjna polimeraza DNA Pfu z białkiem Sso7d
Ppi	pirofosforan
PriB	białko primosomalne uczestniczące w procesie replikacji DNA
pz	pary zasad
RAPD	ang. Random Amplification of Polymorphic DNA
RB69SSB	białko SSB pochodzące z bakteriofaga RB69
RNA	kwasy rybonukleinowe
SDS	dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących
ssDNA	jednoniciowa cząsteczka DNA
SsoSSB	białko SSB <i>Sulfolobus solfataricus</i>
SOLiD	technologia stopniowej ligacji
SSB	białko wiążące się z ssDNA (ang. Single Stranded DNA)
Sso7d	białko pochodzące z hipertermofilnego archeona <i>Sulfolobus solfataricus</i>
S-Taq	fuzyjna polimeraza DNA Taq z białkiem Sso7d
S-Taq(Δ289)	fuzyjna polimeraza DNA TaqStoffel z białkiem Sso7d
Taq	polimeraza DNA <i>Thermus aquaticus</i>
TaqS, TaqStoffel	polimeraza DNA Taq pozbawiona domeny 5'-3' egzonukleolitycznej
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina
Tfu	polimeraza DNA <i>T. fumicolans</i>
Tfl	polimeraza DNA <i>Thermus flavus</i>
Tgo	polimeraza DNA <i>Thermococcus gorgonarius</i>
Tli	polimeraza DNA <i>Thermococcus litoralis</i>
Tpa	polimeraza DNA <i>Thermococcus pacificus</i>
Tpe	polimeraza DNA <i>Thermococcus peptonophilus</i>
TtePriB	białko PriB pochodzące z <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
Tth	polimeraza DNA <i>Thermus thermophilus</i>
Tth	polimeraza DNA <i>T. thermophilus</i>
T _m	temperatura topnienia
Tzi	polimeraza DNA <i>Thermococcus zilligi</i>
UDG	glikozyłaza DNA uracylu



ROZDZIAŁ 11

LITERATURA

1. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. New Jersey: Humana Press; 2003; 226:3–6.
2. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol; 2013;133(3):1–4.
3. Hubscher U, Spadari S, Villani G, Maga G. DNA polymerases Discovery, Characterization and Functions in Cellular DNA Transaction. World Scientific Publishing; 2010; 79-106.
4. Fisher JK, Bourniquel A, Prentiss M, Kleckner N. DNA Replication, Recombination & Repair. Biophys J. 2011;7:394–738.
5. Allen WJ, Li Y, Waksman G. Bacterial DNA Polymerase I. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2010
6. Horning EC. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. 1956;21:5–6.
7. Capson TL, Peliska JA, Fenn Kaboord B, West Frey M, Lively C, Dahlberg M, Bencovic SJ. Kinetic Characterization of the Polymerase and Exonuclease Activities of the Gene 43 Protein of Bacteriophage T4. Biochemistry. 1998;31:10984–94.
8. Albà MM. Replicative DNA polymerases. Genome Biol. 2001;2(1):1–4.
9. Wang J, Sattar AK, Wang CC, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA. Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. Cell. 1997;89(7):1087–99.
10. Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, Kai Y. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. J Mol Biol. 2001;306(3):469–77.
11. Huang YP, Ito J. DNA polymerase C of the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*: classification and phylogenetic analysis of the family C DNA polymerases. J Mol Evol. 1999;48(6):756–69.
12. Garcia-Diaz M, Bebenek K. Multiple functions of DNA polymerases. CRC Crit Rev Plant Sci. 2007;26(2):105–22.
13. Sawaya MR, Pelletier H, Kumar A, Wilson SH, Kraut J. Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. Science. 1994;264(5167):1930–5.
14. Yamtich J, Sweasy JB. DNA polymerase Family X: Function, structure, and cellular roles. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics. 2010;1804(5):1136–50.
15. Boudsocq F, Kokoska RJ, Plosky BS, Vaisman A, Ling H, Kunkel TA, Yang W,



- Woodgate R. Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32932–40.
16. Lehmann AR. *New Functions for Y Family Polymerases.* Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005;93
 17. Rothwell PJ, Waksman G. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in protein chemistry.* 2005;401–40.
 18. Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 1990;3(6):461–7.
 19. Al-soud WA, Rådström P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3748–53.
 20. Oshima T, Imahori K. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa. *Int J Syst Bacteriol.* 1974;102–1.
 21. Patel PH, Suzuki M, Adman E, Shinkai A, Loeb LA. Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol.* 2001;308(5):823–37.
 22. Li Y, Korolev S, Waksman G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J.* 1998;17(24):7514–25.
 23. Johnson K. The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2010;1804(5):1041–8.
 24. Beese L, Steitz T. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* 1991;10(1):25–33.
 25. Steitz TA. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17395–8.
 26. Vieille C, Burdette DS, Zeikus JG. Thermozyms. *Biotechnol Annu Rev.* 1996;2:1–83.
 27. Hamilton SC, Farchaus JW, Davis MC. DNA polymerases as engines for biotechnology. *Biotechniques.* 2001;31(2):370–6, 378–80, 382–3.
 28. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976;127(3):1550–7.
 29. Vainshtein I, Atrazhev a, Eom SH, Elliott JF, Wishart DS, Malcolm B. Peptide rescue of an N-terminal truncation of the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase. *Protein Sci.* 1996;5(9):1785–92.
 30. Barnes WM. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene.* 1992;112(1):29–35.
 31. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal.* 2008;2(1–2):25–45.
 32. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. *PCR Strategies.* Academic Press Inc.; 1995.
 33. Diaz RS, Sabino EC. Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(10).
 34. Kim SW, Kim DU, Kim JK, Kang LW, Cho HS. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int J Biol Macromol.* 2008;42(4): 356–61.
 35. 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. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(11):4504–10.
36. Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA, Laue F, Ankenbauer W, Huber R, Angerer B. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):3600–5.
37. Choi JJ, Song J-G, Nam KH, Lee J Il, Bae H, Kim GA, Sun Y, Kwon S-T. Unique substrate spectrum and PCR application of *Nanoarchaeum equitans* family B DNA polymerase. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(21):6563–9.
38. Waters E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, Beeson KY, Bibbs L, Bolanos R, Keller M, Kretz K, Lin X, Mathur E, Ni J, Podar M, Richardson T, Sutton GG, Simon M, Soll D, Stetter KO, Short JM, Noordewier M. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12984–8.
39. Studzińska A, Tyburski J, Daca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia.* 2008;1: 71-85
40. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology.* McGraw-Hill. 2002.
41. Al-soud WA, Radstrom P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):485–93.
42. Watson RJ, Blackwell B. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can J Microbiol.* 2000;46(7):633–42.
43. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(6).
44. 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. *J Biotechnol.* 2001;88(2):141–9.
45. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem.* 2008;32(6):452–7.
46. Primrose SB, Twyman RM. *Principles of Gene Manipulation and Genomics.* Blackwell; 2006; 29-31.
47. Bębenek A, Ziuzia-Graczyk I. Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Curr Genet.* 2018 Mar 2. doi: 10.1007/s00294-018-0820-1
48. 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. *J Mol Diagn.* 2006;8(5):544–50.
49. Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. *PLoS One.* 2010;5(6):e11024.
50. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn.* 2010;12(2):152–61.
51. Nagai M, Yoshida A, Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on PCR. *IUBMB Life.* 1998;44(1):157–63.
52. Forbes BA, Hicks KE. Substances Interfering with Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by PCR: Effects of Bovine Serum Albumin. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2125–8.
53. Kovárová M, Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(13):E70.

54. Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B. Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques*. 1990;9(3):308–9.
55. Zhang Z, Yang X, Meng L, Liu F, Shen C, Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques*. 2009;47(3):775–9.
56. 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 Expr Purif*. 1999;16(1):96–102.
57. 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*. 2002;148:3307–15.
58. Olszewski M, Mickiewicz M, Kur J. Two highly thermostable paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Arch Microbiol*. 2008;190(1):79–87.
59. Kur J, Olszewski M, Długołęcka A, Filipkowski P. Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) — sources and applications in molecular biology. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(3):569–74.
60. 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 torquis*, and *Photobacterium profundum*. *BMC Microbiol*. 2014;14:91.
61. Stemmer WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10747–51.
- 61a. Greener A, Callahan M, Jerpseth B. An Efficient Random Mutagenesis Technique Using an E. coli Mutator Strain. *Mol Biotechnol*. 1997; 7(2):189-195.
62. Hanson-Manful P, Patrick WM. Construction and analysis of randomized protein-encoding libraries using error-prone PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;996:251–67.
63. Reikofski J, Tao BY. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol Adv*. 1992;10(4):535–47.
64. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1):51–9.
65. Suzuki M, Avicola AK, Hood L, Loeb LA. Low fidelity mutants in the O-helix of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11228–35.
66. Suzuki M, Yoshida S, Adman ET, Blank A, Loeb LA. *Thermus aquaticus* DNA polymerase I mutants with altered fidelity. Interacting mutations in the O-helix. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32728–35.
67. Yamagami T, Ishino S, Kawarabayasi Y, Ishino Y. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front Microbiol*. 2014;5:461.
68. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(5):e40.
69. Ignatov K, Kramarov V, Billingham S. Chimeric DNA polymerase. US20090209005 A1, 2009.
70. Faurholm B, McEwan P, Bourn W, Rush G. Chimeric DNA polymerases. US20120115188 A1, 2012.
71. Gelfand DH, Reichert FL. Mutant chimeric DNA polymerase. US6228628 B1, 2001.



72. Gao YG, Su SY, Robinson H, Padmanabhan S, Lim L, McCrary BS, Edmondson SP, Shriver JW, Wang AH. The crystal structure of the hyperthermophile chromosomal protein Sso7d bound to DNA. *Nat Struct Biol.* 1998;5(9):782–6.
73. Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, Vander Horn PB. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):1197–207.
74. Lee J II, Cho SS, Kil E-J, Kwon S-T. Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from *Thermococcus pacificus*. *Enzyme Microb Technol.* 2010;47(4):147–52.
75. 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.* 2015;10(7):e0131757.
76. 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.* 2006;65:231–8.
77. Lee JE, Potter RJ, Mandelman D. SSB - polymerase fusion proteins. EP1934372 B1, 2013.
78. Haseltine CA, Kowalczykowski SC. A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1505–15.
79. McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int.* 2014;2014:287430.
80. McDonald JP. Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(4):1102–11.
81. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(18):3546–51.
82. Sigal N, Delius H, Kornberg T, Gefter ML, Alberts B. A DNA-unwinding protein isolated from *Escherichia coli*: its interaction with DNA and with DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(12):3537–41.
83. Borjac-Natour JM, Petrov VM, Karam JD. Divergence of the mRNA targets for the Ssb proteins of bacteriophages T4 and RB69. *Viol J.* 2004;1:4.
84. Shamoo Y, Friedman AM, Parsons MR, Konigsberg WH, Steitz TA. Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. *Nature.* 1995;376(6538):362–6.
85. Rapley R. Enhancing PCR amplification and sequencing using DNA-binding proteins. *Mol Biotechnol.* 1994;2(3):295–8.
86. Olszewski M, Balsewicz J, Nowak M, Maciejewska N, Cyranka-Czaja A, Zalewska-Piątek B, Piątek R, Kur J. Characterization of a Single-Stranded DNA-Binding-Like Protein from *Nanoarchaeum equitans*—A Nucleic Acid Binding Protein with Broad Substrate Specificity. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126563.
87. Liu JH, Chang TW, Huang CY, Chen SU, Wu HN, Chang MC, Hsiao CD. Crystal structure of PriB, a primosomal DNA replication protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50465–71.
88. Liebschner D, Brzezinski K, Dauter M, Dauter Z, Nowak M, Kur J, Olszewski M. Dimeric structure of the N-terminal domain of PriB protein from *Thermoanaerobacter tengcongensis* solved ab initio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68:1680–9.
89. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science.* 1974;186(4166):790–7.
90. Shuman S. DNA Ligases: Progress and Prospects. *J Biol Chem.*

- 2009;284(26):17365–9.
91. Tomkinson AE, Vijayakumar S, Pascal JM, Ellenberger T. DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function. *Chem Rev*. 2006;106(2):687–99.
 92. Pascal JM, O'Brien PJ, Tomkinson AE, Ellenberger T. Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. *Nature*. 2004;432(7016):473–8.
 93. Chambers CR, Patrick WM. Archaeal Nucleic Acid Ligases and Their Potential in Biotechnology. *Archaea*. 2015;2015:1–10.
 94. Ocorbin IP, Boyarskikh UA, Zakabunin AI, Khrapov EA, Filipenko ML. DNA-Binding Domain of DNA Ligase from the Thermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*: Improving Long-Range PCR and Neutralization of Heparin's Inhibitory Effect. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(7):1859–69.
 95. Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). *Acta Biochim Pol*. 1998;45(3):661–7.
 96. Elshawadfy AM, Keith BJ, Ee Ooi H, Kinsman T, Heslop P, Connolly BA. DNA polymerase hybrids derived from the family-B enzymes of *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis*: Improving performance in the polymerase chain reaction. *Front Microbiol*. 2014;5:1–14.
 97. Bloom LB, Goodman MF. Polymerase Processivity: Measurement and Mechanisms. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2001
 98. Bambara RA, Fay PJ, Mallaber LM. Methods of analyzing processivity. *Methods Enzymol*. 1995;262(1978):270–80.
 99. Halley G, Prezioso V. Eppendorf HotMaster—An Innovative Hot Start/Cold Stop Technology for Better PCR Results. *Tech Notes*. 2003;76–9.
 100. Kwon KM, Kang SG, Sokolova TG, Cho SS, Kim YJ, Kim CH, Kwon ST.. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus barophilus* Ch5 and its application for long and accurate PCR. *Enzyme Microb Technol*. 2016;86:117–26.
 101. Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes*. 1996;10(6):471–5.
 102. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367–77.
 103. Tveit H, Kristensen T. Fluorescence-Based DNA Polymerase Assay. *Anal Biochem*. 2001;289:96–8.
 104. Driscoll MD, Rentergent J, Hay S. A quantitative fluorescence-based steady-state assay of DNA polymerase. *FEBS J*. 2014;281(8):2042–50.
 105. Ma C, Tang Z, Wang K, Tan W, Li J, Li W, Li Z, Yang X, Li H, Liu L. Real-time monitoring of DNA polymerase activity using molecular beacon. *Anal Biochem*. 2006;353(1):141–3.
 106. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249(22):7130–9.
 107. Huang YH, Huang CY. Structural insight into the DNA-binding mode of the primosomal proteins PriA, PriB, and DnaT. *Biomed Res Int*. 2014;2014:195162.
 108. Morrone SR, Wang T, Constantoulakis LM, Hooy RM, Delannoy MJ, Sohn J. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host

- defense strategy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(1):E62-71.
109. Miyazono K, Zhi Y, Takamura Y, Nagata K, Saigo K, Kojima T, Tanokura M. Cooperative DNA-binding and sequence-recognition mechanism of aristaless and clawless. EMBO J. 2010;29(9):1613–23.
 110. Braid MD, Daniels LM, Kitts CL. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. J Microbiol Methods. 2003;52(3):389–93.
 111. Yang YG, Kim JY, Song YH, Kim DS. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. Clin Chim Acta. 2007;380(1–2):112–7.
 112. Datta K, LiCata VJ. Thermodynamics of the binding of *Thermus aquaticus* DNA polymerase to primed-template DNA. Nucleic Acids Res. 2003;31(19):5590–7.
 113. Kozlov AG, Lohman TM. Large contributions of coupled protonation equilibria to the observed enthalpy and heat capacity changes for ssDNA binding to *Escherichia coli* SSB protein. Proteins. 2000;Suppl 4:8–22.
 114. Walkusz R. Otrzymywanie, charakterystyka molekularna i zastosowanie dwudomenowego białka PriB *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Praca magisterska. 2016; Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii.



ROZDZIAŁ 12

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **Śpibida M**, Krawczyk B, Zalewska-Piątek B, Piątek R, Wysocka M, Olszewski M. Fusion of DNA-binding domain of *Pyrococcus furiosus* ligase with TaqStoffel DNA polymerase as a useful tool in PCR with difficult targets. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(2):713-721.
2. Olszewski M, **Śpibida M**, Bilek M, Krawczyk B. Fusion of Taq DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of Nanoarchaeum equitans- Expression and characterization. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184162.
3. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, Kur J. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *J Appl Genet.* 2017;58(1):133-142.
4. Krawczyk B, Kur J, Stojowska-Swędryńska K, **Śpibida M**. Principles and applications of Ligation Mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(1):39-52.
5. 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 torquis*, and *Photobacterium profundum*. *BMC Microbiol.* 2014 Apr 14;14:91

Doniesienia konferencyjne

Wystąpienia ustne

1. **Śpibida M**, Olszewski M, Krawczyk B, Zalewska-Piątek B., Piątek R. "Fuzyjne polimerazy DNA jako użyteczne narzędzia w amplifikacji trudnych matryc", Konferencja Biomillennium, 6-9 IX 2017
2. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, Kur J, „Polimerazy fuzyjne jako nowoczesne narzędzia amplifikacji kwasów nukleinowych” XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. *Mikrobiologia - nowe wyzwania, nowe możliwości*, 25-27 IX 2016



3. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, „Fuzyjna polimeraza DNA Taq o ulepszonych właściwościach użytecznych w diagnostyce molekularnej”, Ogólnopolska konferencja Mikrobiologia w Medycynie, Przemysłe i Ochronie Środowiska, Łódź, 24-25 X 2015

Postery

1. Walkusz R, Komarnicka K, **Śpibida M**, Olszewski M, „Otrzymywanie i charakterystyka molekularna oraz aplikacje dwudomenowego białka TtePrib” XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Mikrobiologia - nowe wyzwania, nowe możliwości, 25-27 IX 2016
2. **Śpibida M**, Olszewski M, Krawczyk B „Fuzyjna polimeraza DNA Taq o zwiększonej oporności na inhibitory z próbek klinicznych”, Biomed Session, 12.12 2015
3. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, „Taq DNA polymerase fused with DNA binding protein with increased resistance to inhibitors from clinical samples” Diagmol 2015 XVI Conference on Molecular biology in diagnostic of infectious diseases and biotechnology in Memory of Professor Władysław J.H. Kunicki-Goldfinger, 28.11.2015
4. **Śpibida M**, Olszewski M, Krawczyk B, „Increased concentration of Taq DNA polymerase as a solution for GC-rich templates from clinical and environmental samples”, Acta Biochimica Polonica. Supplement, 6th International Weigl Conference on Microbiology, 8-10 VII 2015
5. **Śpibida M**, Walkusz R, Zalewski B, Maciejewska N, Olszewski M, Krawczyk B, „Taq DNA polymerases fused with single-stranded DNA binding protein”, P.15.44, Acta Biochimica Polonica, suppl. 1, 295 – 295, 2014, The BIO 2014 Congress Warsaw, Poland, September 9th - 12th 2014
6. **Śpibida M**, Szemiako K, Krawczyk B, Olszewski M, Zalewska-Piątek B, Piątek R, „Otrzymywanie polimerazy Pfu DNA o zwiększonej oporności na inhibitory krwi użytecznej w diagnostyce molekularnej”, I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz, 18-20 IX 2014
7. Szemiako K, **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, „Zastosowanie metody T-RFLP do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju Candida”, I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz, 18-20 IX 2014 r
8. Szemiako K, **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, „Jednoczesna identyfikacja gatunkowa pięciu klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju Candida z wykorzystaniem reakcji multipleks PCR”, I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz, 18-20 IX 2014
9. Zalewska-Piątek B, Piątek R, Pilipczuk J, **Śpibida M**, Olszewski M, „Białko DRAD jako czynnik urowirulentny zlokalizowany na powierzchni komórek bakteryjnych szczepów *Escherichia coli* DR+”, I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz, 18-20 IX 2014
10. **Śpibida M**, Szemiako K, Krawczyk B, Olszewski M, Pilipczuk J, „Fuzja polimerazy DNA Taq z białkiem wiążącym DNA o zwiększonej użyteczności w



- diagnostyce molekularnej”, I Ogólnopolska Konferencja ”Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz, 18-20 IX 2014
11. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, “Taq DNA polymerase fused with single and double stranded DNA binding protein useful in molecular diagnostic and genetic engineering”, p.173, 15th Konferencja "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology" "DiagMol 2014" Warszawa, 25 X 2014
 12. Walkusz R, Zalewski B, **Śpibida M**, Olszewski M, “Specific detection of *Psilocybe cubensis* DNA by PCR amplification of the *gpd* gene fragment”, p. 175, 15th Konferencja "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology" "DiagMol 2014" Warsaw, 25 X 2014
 13. Zalewski B, Walkusz R, **Śpibida M**, Olszewski M, “PCR amplification of the conserved fragment of *gpd* gene used to specific detection of *Psilocybe cubensis* DNA”, p. 185, 15th Konferencja "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology" "DiagMol 2014" Warsaw, 25 X 2014
 14. **Śpibida M**, Marszałkowska M, Olszewski M, Novel class of primosomal protein B from *Clostridium thermocellum*, P5.26, p. 54, 8 – 11 X 2013, 5th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2013, Kraków
 15. Marszałkowska M, Zakrzewska S, **Śpibida M**, Olszewski M, A novel DNA polymerase from hyperthermophilic bacterium *Thermovibrio ammonificans*: gene cloning, expression, and characterization, P5.27, str. 55, 8 – 11 X 2013, 5th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2013, Kraków
 16. **Śpibida M**, Marszałkowska M, Olszewski M, Novel primosomal protein B from *Clostridium pasteurianum*, P.3.35, str. 55, 2 - 5 IX 2013, 48th Congress of the Polish Biochemical Society, Toruń
 17. Olszewski M, Nowak M, **Śpibida M**, Characterization of single-stranded DNA-binding proteins from the psychrophilic bacteria, P3.24, str. 49, 2 - 5 IX 2013, 48th Congress of the Polish Biochemical Society, Toruń
 18. Olszewski M, Nowak M, **Śpibida M**, Kur J, Novel SSB protein from psychrophilic bacteria *Pseudoalteromonas haloplanktis*, 55th Polish Crystallographic Meeting, VI 27-29, 2013, Wrocław, B-2
 19. Marszałowska M, **Śpibida M**, Olszewski M, cDiscovery of novel *uvrA* genes in Betaproteobacteria, str. 59, 23 – 25.11.2012: XIV National Academic Seminar of Biotechnology Students & IV International Students’ Conference of Biotechnology, Gdańsk
 20. Poleska M, Tarkowska A, **Śpibida M**, Olszewski M, Primosomal DNA replication proteins structure prediction using homology modeling, str. 117, 23 – 25.11.2012: XIV National Academic Seminar of Biotechnology Students & IV International Students’ Conference of Biotechnology, Gdańsk
 21. Żownir M, Bil M, **Śpibida M**, Kreft Ł, Olszewski M, “Discovery and identification of novel additional *prfB* genes in bacteria”, str. 116, 23 – 25.11.2012: XIV National Academic Seminar of Biotechnology Students & IV International Students’ Conference of Biotechnology, Gdańsk
 22. **Śpibida M**, Bil M, Żownir M, Kreft Ł, Olszewski M, „Novel single-stranded DNA binding proteins from Bacteria”, P-30, str. 152, 08 – 10.11.2012: VII International Conference of Young Naturalists “From Biotechnology to Environment Protection” – interdisciplinary meeting of young naturalists for students and PhD students, ZielonaGóra

23. Bil M, Kreft Ł, **Śpibida M**, Olszewski M, „Biodiversity of SSB proteins in the kingdom of Bacteria”, P-31, str. 154, 08 – 10.11.2012: VII International Conference of Young Naturalists “From Biotechnology to Environment Protection” – interdisciplinary meeting of young naturalists for students and PhD students, ZielonaGóra

Artykuły w materiałach konferencyjnych

1. **Śpibida M**, Olszewski M, Krawczyk B, „Modyfikacje polimeraz DNA jako rozwiązania problemów w reakcjach PCR”, Enzymologia w obliczu wyzwań i możliwości XXI wieku, Lublin 2017
2. **Śpibida M**, Krawczyk B, Olszewski M, "Taq DNA polymerase fused with DNA binding protein with increased resistance to inhibitors from clinical samples" 16th Conference "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology" "DiagMol 2015" Warsaw, 28 XI 2015

Udział w projektach grantowych

1. Wykonawca w projekcie pt. „Opracowanie technologii wytwarzania i wyprodukowanie trzech enzymów rekombinantowych - termolabilnej dsDNazy, nukleazy niespecyficznie tnącej każdą formę kwasu nukleinowego oraz fuzyjnej polimerazy DNA” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020, okres realizacji: 02.2017-07.2018
2. Wykonawca w projekcie pt. „Fuzyjna polimeraza DNA jako innowacyjne narzędzie diagnostyki molekularnej” finansowanego przez Inkubator Innowacyjności, okres realizacji: 03.2015-09.2015

Stypendia

1. Stypendium w ramach projektu Inter PhD „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki. 1.10.2013-31.07.2014

