

Politechnika Warszawska

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia
Dziedzina nauk: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Rozprawa doktorska

mgr inż. Klaudia Marlicka

**Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów
nukleinowych**

Promotor

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni

Promotor pomocniczy

dr Katarzyna Szymańska

Warszawa 2025

Praca była częściowo realizowana w ramach projektu „Rozwój nowoczesnej diagnostyki zakażeń na bazie elektrochemicznych macierzy czujnikowych jako elementów detekcyjnych przenośnych, niskokosztowych urządzeń POC dedykowanych szybkim i wiarygodnym analizom genetycznym” finansowanego przez Agencję Badań Medycznych na podstawie umowy o objęcie Przedsięwzięcia wsparciem nr 2024/ABM/03/KPO/ KPOD.07.07-IW.07-0081/24-00 w ramach Krajowego Planu Odbudowy i Zwiększania Odporności, Komponent D Efektywność, dostępność i jakość systemu ochrony zdrowia, Inwestycja D3.1.1 Kompleksowy rozwój badań w zakresie nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Pragnę serdecznie podziękować mojemu promotorowi, dr. hab. inż. Marcinowi Olszewskiemu, prof. PW, za umożliwienie mi dołączenia do zespołu badawczego oraz objęcie opieką naukową mojej pracy doktorskiej.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do mojej promotor pomocniczej, dr Katarzyny Szymańskiej, za nieocenione wsparcie, cenne rady oraz życzliwość.

Ogromne podziękowania kieruję do mgr inż. Katarzyny Serafin, z którą wspólnie rozpoczynałam pracę badawczą. Jej pomoc, otwartość na dialog oraz wspólne poszukiwanie rozwiązań miały istotny wpływ na przebieg moich badań.

Dziękuję wszystkim pracownikom Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków za życzliwość, otwartość oraz gotowość do pomocy. Wyrazy wdzięczności kieruję również do studentów realizujących swoje prace dyplomowe w katedrze, w szczególności do inż. Julii Szumskiej, inż. Julii Szeptyckiej i inż. Julii Sobieskiej – za docenienie moich wysiłków, ciężką pracę nad wspólnymi projektami oraz pozytywną energię każdego dnia.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego męża Dawida, który przez cały czas niezmiennie wierzył we mnie i wspierał, zarówno w kwestiach naukowych, jak i codziennych oraz był moją ostoją w trudnych chwilach.

Dziękuję mojej siostrze Karolinie, za nieustające wsparcie, zrozumienie i obecność.

Podziękowania kieruję do moich rodziców, za zrozumienie, umożliwienie mi realizacji pasji od najmłodszych lat oraz nieustanne wsparcie na każdej ścieżce, którą obrałam.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do całej mojej rodziny, która wspierała mnie na każdym etapie tej drogi i pomagała mi w osiągnięciu kolejnych celów.

Na koniec pragnę podziękować całemu środowisku doktoranckiemu, a w szczególności Karolinie Gabor-Siatkowskiej i Stanisławowi Siatkowskiemu, za towarzystwo, zrozumienie i wzajemne wsparcie w codziennych wyzwaniach życia doktoranta.

*Za każdą pomoc, dobre słowo i okazane wsparcie – **Dziękuję!***

Streszczenie

Amplifikacja kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *Deoxyribonucleic Acid*, DNA) w warunkach izotermicznych stanowi uproszczoną alternatywę dla łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), umożliwiając powielanie materiału genetycznego bez użycia termocyklera. Metoda ta znajduje szczególne zastosowanie w diagnostyce molekularnej, zwłaszcza w warunkach *point-of-care*. Kluczowym czynnikiem determinującym skuteczność reakcji są polimerazy DNA. Celem niniejszej rozprawy było zaprojektowanie i scharakteryzowanie fuzyjnych wariantów polimeraz DNA o ulepszonych właściwościach do zastosowań w izotermicznej amplifikacji DNA. Na podstawie przeglądu literatury wytypowano dwie reakcje i odpowiednie zaangażowane w nie enzymy: reakcję RPA (ang. *Recombinase Polymerase Amplification*) z polimerazą Bsu z *Bacillus subtilis* oraz reakcję amplifikacji toczącego się koła (ang. *Rolling Circle Amplification*, RCA) z polimerazą Phi29 z faga Φ29. Do stworzenia fuzyjnych polimeraz zastosowano trzy białka wiążące DNA: gp32 z faga T4 oraz pochodzące z *Nanoarchaeum equitans* NeqSBB i Neq150. Większość genów dla białek fuzyjnych otrzymano z wykorzystaniem klonowania metodą Gibsona. Następnie białka nadprodukowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym z użyciem *E. coli* i oczyszczono za pomocą chromatografii metalopowinowactwa. Właściwości enzymatyczne oceniono m.in. metodami pomiaru fluorescencji w czasie rzeczywistym oraz analizą zmiany ruchliwości elektroforetycznej (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA). Uzyskane warianty polimerazy Phi29 okazały się nieaktywne, natomiast 6 z 10 wariantów polimerazy Bsu przeprowadzało izotermiczną amplifikację DNA. Niefuzyjna polimeraza Bsu nie amplifikuje DNA w stałej temperaturze, natomiast jej duża podjednostka tak. Zastosowanie fuzji do polimerazy Bsu umożliwia jej

przeprowadzenie amplifikacji. Zastosowane do stworzenia fuzyjnych polimeraz białka wiążące DNA miały różnoraki i ściśle zależny od lokalizacji (N- lub C-koniec polimerazy) wpływ. Białko gp32 pozwoliło na zwiększenie zakresu tolerancji na obecność wybranych inhibitorów amplifikacji DNA w mieszaninie reakcyjnej, białko Neq150 zwiększyło efektywność i stabilność w podwyższonej temperaturze, a białko NeqSSB nie wykazało pozytywnego wpływu na polimerazę. Wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań nad projektowaniem enzymów do szybkiej i łatwej diagnostyki genetycznej.

Słowa kluczowe: fuzyjne polimerazy DNA, białka fuzyjne, białka wiążące kwasy nukleinowe, polimeraza Bsu, polimeraza Phi29, gp32, NeqSSB, Neq150, amplifikacja izotermiczna, inhibitory amplifikacji

Abstract

Isothermal deoxyribonucleic acid (DNA) amplification represents a simplified alternative to the Polymerase Chain Reaction (PCR), enabling the replication of genetic material without the use of a thermocycler. This method finds particular application in molecular diagnostics, especially in *point-of-care* settings. DNA polymerases are key determinants of reaction efficiency. The aim of this dissertation was to design and characterize fusion polymerases with improved properties for applications in isothermal DNA amplification. Based on a literature review, two isothermal amplification reactions and their corresponding enzymes were selected: the RPA (Recombinase Polymerase Amplification) reaction with Bsu polymerase from *Bacillus subtilis*, and the RCA (Rolling Circle Amplification) reaction with Phi29 polymerase from phage Φ 29. Three DNA-binding proteins were used to create fusion polymerases: gp32 from phage T4, and NeqSBB and Neq150 from *Nanoarchaeum equitans*. Most of the genetic constructs for the fusion proteins were obtained using Gibson cloning. The proteins were then overexpressed in a bacterial expression system using *E. coli* and purified using metal affinity chromatography. Enzymatic properties were assessed using methods such as real-time fluorescence measurements and electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The resulting Phi29 polymerase variants were inactive, while 6 out of 10 Bsu polymerase variants performed isothermal DNA amplification. Non-fusion Bsu polymerase does not amplify DNA at a constant temperature, however its large subunit does. Fusion with other proteins enabled Bsu polymerase to perform amplification. The DNA-binding proteins used to create the fusion polymerases had diverse effects on enzyme properties, dependent on their location (N- or C-terminus of the polymerase). Increased tolerance to

the presence of selected inhibitors of amplification was observed with gp32, while Neq150 increased efficiency and stability at elevated temperatures, and NeqSSB did not have a positive effect on the polymerase. These results provide a basis for further research into the design of enzymes for rapid and easy genetic diagnostics.

Keywords: fusion DNA polymerases, fusion proteins, nucleic acids binding proteins, Bsu polymerase, Phi29 polymerase, gp32, NeqSSB, Neq150, isothermal amplification, inhibitors of amplification

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	9
Rozdział 1. Wstęp	15
1.1. Charakterystyka polimeraz	15
1.1.1. Polimerazy DNA – budowa, mechanizm działania i podział	16
1.1.2. Charakterystyka polimerazy Bsu	20
1.1.3. Charakterystyka polimerazy Phi29	21
1.2. Amplifikacja DNA	24
1.2.1. PCR – złoty standard amplifikacji DNA	24
1.2.2. Problemy z amplifikacją DNA	25
1.2.3. Izotermiczne metody amplifikacji kwasów nukleinowych	27
1.2.3.1. Izotermiczna reakcja RPA	31
1.2.3.2. Izotermiczna reakcja RCA	32
1.2.3.3. Reakcja izotermicznej amplifikacji DNA oparta o białko gp32	36
1.3. Białka wiążące kwasy nukleinowe	37
1.3.1. Charakterystyka białka gp32 z bakteriofaga T4	38
1.3.2. Charakterystyka białek NeqSSB i Neq150 z <i>Nanoarchaeum equitans</i>	40
1.4. Charakterystyka fuzyjnych polimeraz DNA	41
Rozdział 2. Cel pracy	45
Rozdział 3. Materiały	47
3.1. Aparatura i materiały zużywalne	47
3.2. Odczynniki chemiczne	48
3.3. Enzymy i białka	50

3.4.	Plazmidy	50
3.5.	Markery wielkości	51
3.6.	Szczepy bakteryjne i drożdżowe	51
3.7.	Zestawy	52
3.8.	Roztwory i bufor	52
3.9.	Pożywki	55
3.10.	Startery	56
3.11.	Bazy i narzędzia bioinformatyczne	58
3.11.1.	Bazy danych	58
3.11.2.	Narzędzia bioinformatyczne	58
Rozdział 4.	Metody	59
4.1.	Hodowle	59
4.1.1.	Hodowla w podłożu stałym	59
4.1.2.	Hodowla w podłożu płynnym	59
4.2.	Rozdziały elektroforetyczne	60
4.2.1.	Elektroforeza agarozowa	60
4.2.2.	Elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE	60
4.3.	Praca z kwasami nukleinowymi	61
4.3.1.	Izolacja RNA	61
4.3.2.	Izolacja plazmidowego DNA	62
4.3.3.	Izolacja genomowego DNA	62
4.3.4.	Trawienie restrykcyjne plazmidu	62
4.3.5.	Przygotowanie wstawek do klonowania	63
4.4.	Praca z bakteriami	64
4.4.1.	Bakterie kompetentne	64
4.4.2.	Transformacja bakterii	65
4.4.3.	Klonowanie metodą Gibsona	66
4.4.4.	Nadprodukcja białek	67
4.4.5.	Uwalnianie białek z komórek bakteryjnych	67
4.5.	Oczyszczanie chromatograficzne	68
4.5.1.	Przygotowanie próbek białkowych do oczyszczania	68
4.5.2.	Chromatografia metalopowinowactwa	68
4.5.3.	Chromatografia jonowymienna	70
4.5.4.	Chromatografia grawitacyjna na złożu ssDNA-celuloza	71

4.5.5.	Odsalanie preparatów białkowych	71
4.5.6.	Odsalanie preparatów białkowych poprzez dializę	72
4.6.	Preparaty białkowe	72
4.6.1.	Przygotowanie preparatów białkowych do przechowywania długoterminowego	72
4.6.2.	Czystość preparatów białkowych	73
4.7.	Charakterystyka polimeraz	73
4.7.1.	Wyznaczanie jednostek aktywności	73
4.7.2.	Wyznaczenie zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych . .	74
4.8.	Amplifikacja izotermiczna DNA	74
4.8.1.	Reakcja amplifikacji toczącego się koła (RCA)	74
4.8.2.	Reakcja izotermicznej amplifikacji DNA oparta o białko gp32	75
4.9.	Optymalizacja izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32	76
4.9.1.	Ilość białka gp32	76
4.9.2.	Ilość polimerazy	76
4.9.3.	Czas reakcji	76
4.9.4.	Ilość matrycy	76
4.10.	Właściwości charakteryzujące polimerazy DNA	77
4.10.1.	Zakres temperaturowy reakcji	77
4.10.2.	Wyznaczenie stabilności polimerazy DNA	77
4.10.3.	Wyznaczenie tolerancji polimeraz na inhibitory reakcji amplifikacji . . .	77
Rozdział 5.	Wyniki	79
5.1.	Tworzenie konstruktów genetycznych	79
5.1.1.	Projektowanie konstruktów genetycznych	79
5.1.2.	Klonowanie genów kodujących polimerazy DNA i białko gp32	86
5.2.	Otrzymywanie preparatów białkowych polimeraz DNA i białka gp32	90
5.2.1.	Nadprodukcja białek rekombinowanych	90
5.2.2.	Oczyszczanie białek rekombinowanych	99
5.2.2.1.	Oczyszczanie polimeraz DNA ze znacznikiem His-tag uwolnionych do supernatantu 1	99
5.2.2.2.	Oczyszczanie polimeraz DNA ze znacznikiem His-tag uwolnionych do supernatantu 2	102
5.2.2.3.	Oczyszczanie polimeraz DNA bez znacznika His-tag	104
5.2.2.4.	Oczyszczanie białka gp32	107
5.2.3.	Określenie czystości preparatów białkowych	113

5.3. Właściwości polimeraz DNA	114
5.3.1. Wyznaczanie jednostek aktywności polimeraz DNA	114
5.3.2. Wyznaczanie zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazy DNA	120
5.3.3. Optymalizacja warunków prowadzenia izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32	135
5.3.4. Wpływ temperatury na właściwości polimeraz DNA	142
5.3.5. Tolerancja polimeraz DNA na obecność inhibitorów amplifikacji	146
Rozdział 6. Wnioski i dyskusja	155
Rozdział 7. Podsumowanie	167
Wykaz skrótów	169
Spis rysunków	173
Spis rysunków	173
Spis tabel	179
Załączniki	181
A. Sekwencje aminokwasowe	181
A.1. Polimeraza Bsu	181
A.2. Duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large)	182
A.3. Polimeraza Phi29	182
A.4. Białko gp32	182
A.5. Białko NeqSSB	182
A.6. Białko Neq150	183
A.7. Łącznik	183
A.8. Znacznik His-tag	183
Bibliografia	185

Rozdział 1

Wstęp

1.1. Charakterystyka polimeraz

Polimerazy to białka enzymatyczne, które w bazie KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zostały sklasyfikowane do grupy EC 2.7.7 jako nukleotydtransferazy, czyli enzymy katalizujące przyłączenie się nukleotydów. Wśród nich można wyróżnić cztery podgrupy polimeraz: EC 2.7.7.6 – DNA-zależne polimerazy RNA, EC 2.7.7.7 – DNA-zależne polimerazy DNA, EC 2.7.7.48 – RNA-zależne polimerazy RNA i EC 2.7.7.49 – RNA-zależne polimerazy DNA [1, 2].

Polimerazy RNA odpowiadają za syntezę cząsteczek kwasu rybonukleinowego (ang. *Ribonucleic Acid*, RNA). DNA-zależne polimerazy (EC 2.7.7.6) są kluczowymi enzymami w procesie transkrypcji. Syntetyzują one RNA z wykorzystaniem kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *Deoxyribonucleic Acid*, DNA) jako matrycy. W przypadku organizmów eukariotycznych występuje większa różnorodność polimeraz RNA. Wyróżnić można 3 formy takich polimeraz: polimerazę I RNA, która syntetyzuje rybosomalne RNA (ang. *ribosomal RNA*, rRNA), polimerazę II RNA - informacyjne RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) oraz polimerazę III RNA - transportujące RNA (ang. *transfer RNA*, tRNA) [3]. Natomiast RNA-zależne polimerazy RNA (EC 2.7.7.48) syntetyzują RNA na matrycy RNA i najczęściej występują u wirusów, które swoją informację genetyczną przechowują w formie cząsteczek RNA. Odpowiadają one za replikację i transkrypcję wirusowego RNA [4]. U eukariotów RNA-zależne polimerazy RNA odpowiedzialne są głównie za degradację mRNA poprzez tworzenie dwuniciowych cząsteczek RNA, które są degradowane [5].

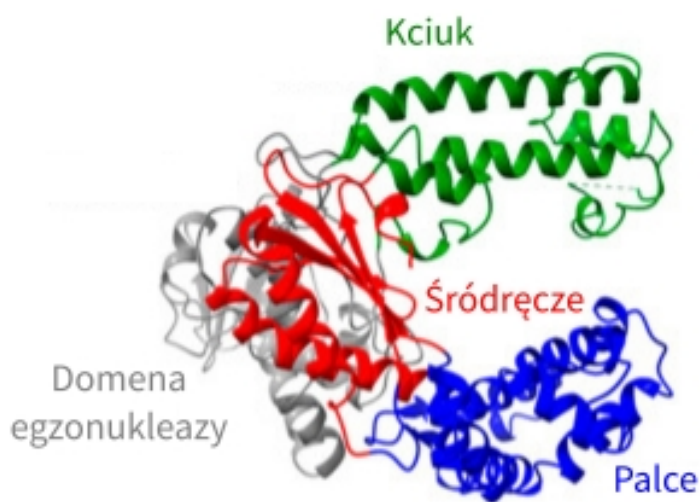
Polimerazy DNA odpowiadają za syntezę kwasu deoksyrybonukleinowego. RNA-zależne polimerazy DNA (EC 2.7.7.49), inaczej zwane odwrotnymi transkryptazami, syntetyzują nić DNA na matrycy RNA. Są to kluczowe enzymy w cyklu życia retrowirusów. Po przepisaniu informacji genetycznej z RNA wirusowego na DNA następuje integracja z genomem gospodarza, w konsekwencji czego dochodzi do replikacji wirusów. [6]. Natomiast DNA-zależne polimerazy (EC 2.7.7.7) syntetyzują DNA na matrycy DNA i są kluczowymi enzymami w replikacji genomu. Są one również enzymami wykorzystywanymi powszechnie w laboratoriach biologicznych do syntezy DNA [7]. Dalszy opis będzie skupiał się wyłącznie na DNA-zależnych polimerazach DNA, skrótowo nazywanych polimerazami DNA.

1.1.1. Polimerazy DNA – budowa, mechanizm działania i podział

Pierwszą poznaną polimerazą DNA była polimeraza I z *Escherichia coli*, odkryta przez Israela Roberta Lehmana i Arthura Kornberga w 1956 r. Opisali oni działanie nowego enzymu jako dobudowywanie deoksyrybonukleotydów (ang. *Deoxynucleotides*, dNTP) do DNA. Przyłączanymi deoksyrybonukleotydami były deoksytrifosforany adenozyne (ang. *Deoxyadenosine triphosphate*, dATP), cytozyny (ang. *Deoxycytidine triphosphate*, dCTP), guanidyny (ang. *Deoxyguanosine triphosphate*, dGTP) i tymidyny (ang. *Thymidine triphosphate*, dTTP), a po ich dołączeniu do DNA, uwalniał się pirofosforan (ang. *Pyrophosphate*, PPi). Wykazali oni również, że do syntezy nowej nici DNA kluczowa okazała się także obecność jonów magnezu (Mg^{2+}) [8]. W kolejnych latach odkrywano i charakteryzowano kolejne polimerazy DNA, aż w 1987 r. Patrick Argos porównał sekwencję 57 różnych polimeraz DNA (11 DNA-zależnych i 46 RNA-zależnych) i odkrył motyw składający się 15 reszt aminokwasowych, w którym dla polimeraz DNA-zależnych najsilniej konserwowany jest fragment 5 reszt aminokwasowych (Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp), a w przypadku polimeraz RNA-zależnych 4 reszt aminokwasowych (Tyr-Gly-Asp-Asp). Sugerował on również, że reszty kwasu asparaginowego mogą być kluczowe do aktywności polimeraz np. poprzez wiązanie jonów magnezu [9].

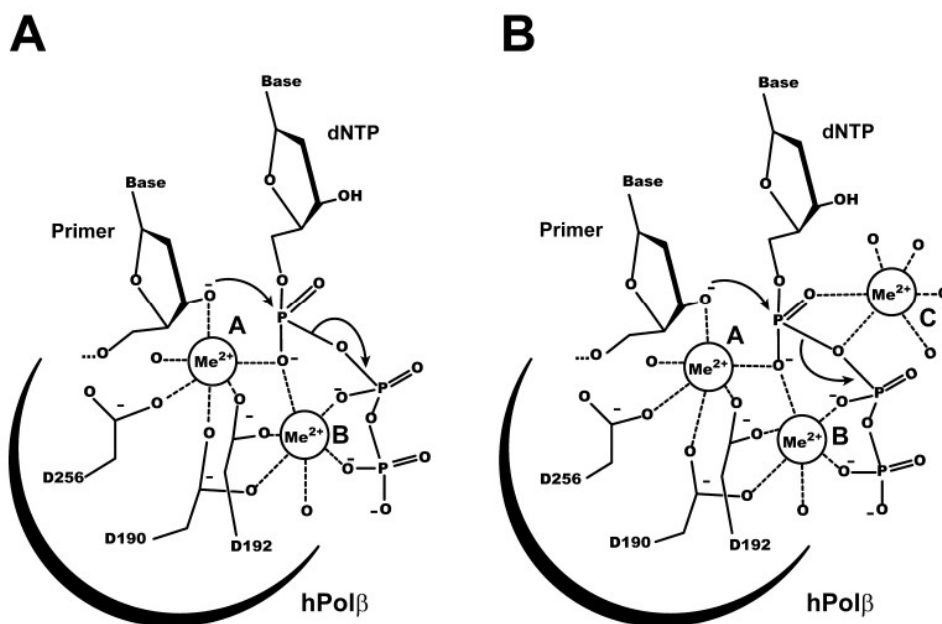
Jedne z pierwszych badań nad strukturą przestrzenną polimeraz, które użyły porównania struktury do wyglądu prawej dłoni, miały miejsce w 1985 r. Zespół z uniwersytetu w Yale pod kierownictwem T. A. Steitz wykazał, że deoksynukleotydy

wiążą się z mniejszą domeną poprzez oddziaływanie z jonem metalu. Natomiast duża domena polimerazy przypominająca wyglądem dłoń wiąże DNA matrycowe [10]. Na podstawie kolejnych badań krystalograficznych oraz porównań sekwencji aminokwasowych różnych polimeraz, udało się scharakteryzować 3 główne domeny – śródręcza, palców i kciuka. Domena śródręcza zawiera centrum aktywne z silnie konserwowaną resztą kwasu asparaginowego, gdzie dochodzi do katalizy reakcji. Domena palców zbudowana jest z α -helis z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi, a jej funkcja to wybór i przybliżenie odpowiedniego nukleotydu do matrycy. Domena kciuka stabilizuje kompleks polimerazy z DNA i reguluje procesywność enzymu. Dodatkowo często można wyróżnić domenę egzonukleazy 3'→5' z podwójnym ładunkiem ujemnym w strukturze zakrętu β , znajdującą się w pobliżu domeny śródręcza [11, 12, 13]. W zależności od polimerazy struktura przestrzenna może się różnić, lecz domeny śródręcza, palców i kciuka zostają zachowane, choć czasem w zredukowanej formie. Świadczy to o bardzo ważnej roli tych domen oraz ich silnym ewolucyjnym konserwowaniu. Przykładową strukturę trójwymiarową polimerazy przedstawiono na rysunku 1 na przykładzie polimerazy I DNA z *Thermus aquaticus* [14].



Rysunek 1. Trójwymiarowa struktura polimerazy I DNA z *Thermus aquaticus* (PDB: 1KTQ). Kolorem czerwonym oznaczono domenę śródręcza, zielonym – kciuka, niebieskim – palców i szarym – egzonukleazy 3'→5' [14].

Mechanizm działania polimeraz jest ściśle związany z ich budową przestrzenną i opisanymi wyżej domenami. Jak już wspomniano, centrum aktywne enzymu znajdujące się w domenie śródreźca, zawiera silnie konserwowaną resztę kwasu asparaginowego i katalizuje reakcję polimeryzacji. Reakcja inicjowana jest przyłączeniem matrycy wraz ze starterem do polimerazy. Następnie domena palców, ze związanymi deoksyrybonukleotydami, przybliża się do matrycy zamykając strukturę dłoni. Po zbliżeniu nukleotydów do matrycy, następuje kataliza tworzenia wiązania fosfodiesterowego między dołączanym nukleotydem a syntetyzowaną nicią DNA. Następnie domena kciuka przesuwając matrycę i następuje kolejne dołączenie nukleotydów. Proces ten powtarzany jest wielokrotnie, do momentu zakończenia syntezy nowej nici DNA. Występująca w polimerazach domena 3'→5' egzonukleolityczna pozwala na usunięcie błędnie wstawionych nukleotydów, co czyni polimerazę enzymem zdolnym do samokorekty [10, 11, 12, 14, 15]. Kolejne nukleotydy dołączane są zgodnie z zasadą komplementarności Watsona i Cricka [16], lecz poprawność ich dołączenia, czyli wierność polimeraz, zależy jest zarówno od geometrii miejsca aktywnego, oddziaływania z białkami pomocniczymi oraz dostępności nukleotydów w środowisku reakcji [17]. Bardzo ważnym elementem w mechanizmie działania polimeraz są jony dwudodatnie, najczęściej magnezu. Są one kofaktorami reakcji polimeryzacji. Dwa jony metalu są koordynowane w miejscu aktywnym i dzięki nim możliwe jest tworzenie wiązań fosfodiesterowych. Skoordynowanie jonów metalu z grupami fosforanowymi w trifosforanie umożliwia przesunięcie ładunku w obrębie trifosforanu i wytworzenie cząstkowego ładunku dodatniego na fosforze pierwszej grupy fosforanowej, co skutkuje tworzeniem wiązania fosfodiesterowego pomiędzy fosforem, a grupą hydroksylową uprzedniego nukleotydu z jednoczesnym odłączeniem pirofosforanu [12, 15]. Poza mechanizmem z użyciem dwóch jonów, postulowany jest również mechanizm, w którym biorą udział trzy jony. Trzeci jon również przyłącza się do trifosforanu, a przesunięcie ładunków następuje w analogiczny sposób, z tą różnicą, że tworzenie cząstkowego ładunku dodatniego na fosforze stabilizowane jest przez trzy jony metalu a nie dwa [12, 18]. Schematyczne przedstawienie obu mechanizmów przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Mechanizm tworzenia wiązania fosfodiesterowego z udziałem jonów metali dwudodatnich (A) stabilizowany przez dwa jony (B) stabilizowany przez trzy jony [18].

Poza badaniami nad funkcjami poszczególnych domen czy mechanizmami reakcji polimeryzacji, równolegle porównywano odkrywane kolejne polimerazy, aby pogrupować je na podstawie podobieństwa funkcjonalnego. Początkowo zaproponowano podział na rodziny A, B, C i X. Rodziny A, B i C swoje nazwy zawdzięczają nazwą genów polA, polB i polC, które kodują kolejno polimerazę I, II i III z *E. coli*. Natomiast rodzinę polimeraz wykazujących homologię sekwencji do terminalnych deoksynukleotydtransferaz, nazwano rodziną X [19, 20]. W 1998 roku po odkryciu i przebadaniu polimeraz z *Pyrococcus furiosus* i *Methanococcus jannaschii*, które znacznie się różniły od dotychczas opisanych, zaproponowano utworzenie rodziny D [21, 22]. Ostatnią opisaną rodziną polimeraz jest rodzina Y, której wyróżnienie na podstawie badań filogenetycznych zaproponowano w 2001 roku [23]. Rodziny polimeraz poza pewnymi różnicami strukturalnymi, różnią się również swoją aktywnością i występowaniem. Rodzina A odpowiada za replikację i naprawę DNA, posiada aktywność 3'→5' i 5'→3' egzonukleolityczną oraz występuje w organizmach prokariotycznych, eukariotycznych oraz wirusach. Rodzina B nie posiada aktywności 5'→3' egzonukleolitycznej, a rodzina C odpowiada tylko za replikację i występuje wyłącznie u prokariotów. Rodzina D to heterodimery odpowiedzialne za replikację u eukariotów. Rodzina X również występuje wyłącznie u eukariotów i odpowiada za

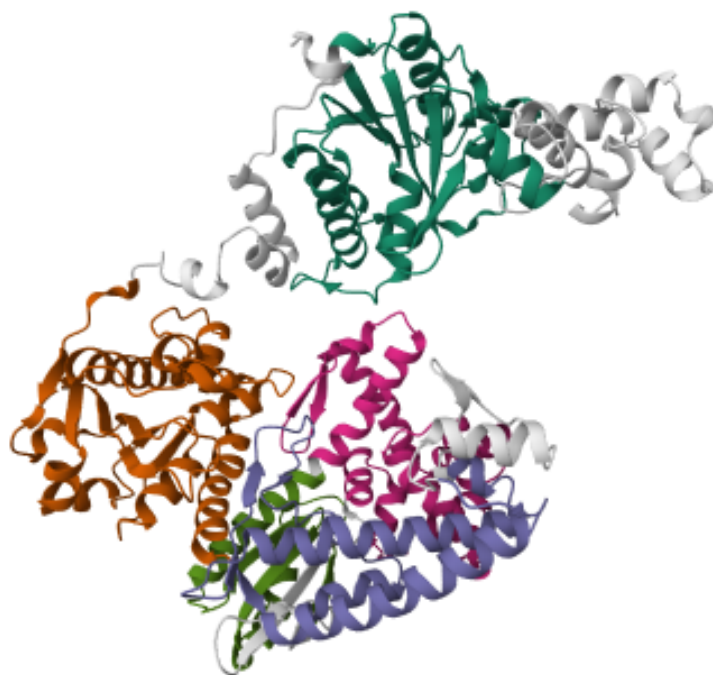
replikację i naprawę DNA. Rodzina Y natomiast występuje zarówno u prokariotów jak i eukariotów, odpowiadając za replikację i naprawę DNA. [24]. Dodatkowo, w wielu opisach podziału polimeraz wyróżnia się również rodzinę RT, czyli polimerazy zdolne do odwrotnej transkrypcji, tzn. przepisania informacji genetycznej z RNA na DNA, natomiast należą one do grupy RNA-zależnych polimeraz DNA, które w tej pracy nie zostały szczegółowo opisane.

1.1.2. Charakterystyka polimerazy Bsu

Przykładem polimerazy z rodziny A jest polimeraza I DNA z *Bacillus subtilis*, nazywana polimerazą Bsu. W 1964 r. Tuneko Okazaki i Arthur Kornberg oczyścili, przebadali i porównali tą polimerazę do polimerazy I z *E. coli*. Oczyszczona polimeraza charakteryzowała się mniejszą aktywnością egzonukleolityczną i brakiem aktywności endonukleazy. Dodatkowo analogi zasad włączane były ilościowo w takich samych proporcjach jak w przypadku polimerazy z *E. coli* [25]. Badania nad szczepami *B. subtilis* wykazały, że mutanty o obniżonej aktywności polimerazy I, wykazują wrażliwość na czynniki alkilujące, promieniowanie UV i RTG, które to powodują uszkodzenia DNA. Sugerowało to, że główną rolą polimerazy I jest właśnie naprawa DNA [26, 27]. Badania porównujące polimerazy I, II i III z *B. subtilis* wykazały, że polimeraza I jest najmniej wrażliwa na sulfhydryłowe reagenty i wysokie stężenia soli, co wskazuje na jej stabilność w trudniejszych warunkach. Dodatkowo, posiada ona aktywność egzonukleolityczną zarówno $3' \rightarrow 5'$ jak i $5' \rightarrow 3'$, co pozwala jej naprawiać błędy w trakcie syntezy DNA [28].

Badania nad polimerazą I DNA z *E. coli* wykazały, że w wyniku działania proteazy – subtylizyny dochodzi do rozdzielenia polimerazy na dwa fragmenty. Mniejszy fragment na N-końcu (1-325 reszt aminokwasowych) odpowiada za aktywność $5' \rightarrow 3'$ egzonukleolityczną, natomiast większy za syntezę DNA. Na cześć odkrywcy fragment ten nazywany jest fragmentem Klenowa [29, 30, 31]. Takie same obserwacje poczyniono w przypadku polimerazy Bsu, gdzie fragment o aktywności $5' \rightarrow 3'$ egzonukleolitycznej to pierwsze 296 reszt aminokwasowych. Pozostała część białka, będąca odpowiednikiem fragmentu Klenowa, została nazwana dużym fragmentem polimerazy Bsu. Do dziś struktura przestrzenna polimerazy Bsu nie została rozwiązana, natomiast korzystając z baz bioinformatycznych można znaleźć

predykcję struktury przestrzennej polimerazy Bsu, którą przedstawiono na rysunku 3 [32, 33, 34].



Rysunek 3. Predykcja struktury przestrzennej polimerazy Bsu. Kolorami zaznaczono przewidywane domeny wyznaczone na podstawie bazy TED (ang. *The Encyclopedia of Domains*) [32], przez AlphaFold [33, 34] Domena w kolorze ciemno zielonym (w górnej części obrazka) to domena 5'→3' egzonukleolityczna. (AlfaFold: AF-O34996-F1-v4 [35]).

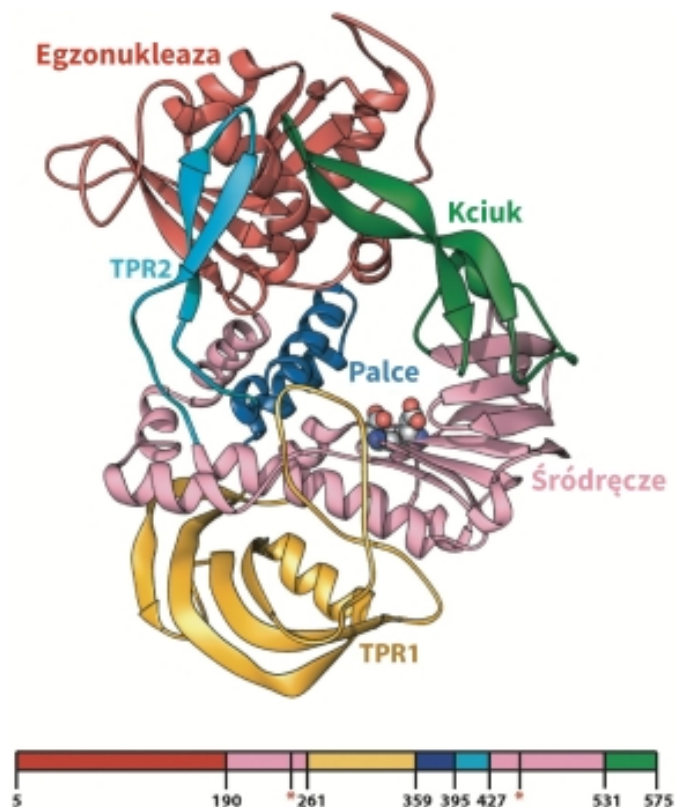
Polimeraza Bsu w bazie UniProt dostępna jest pod numerem O34996 [36]. Duży fragment polimerazy występuje pod nazwą handlową polimeraza Bsu large i jest produkowany przez kilka firm, m. in. New England Biolabs [37], EURx [38] czy Intact Genomics [39]. Polimeraza Bsu large znalazła zastosowanie m.in. w reakcji RPA, którą przedstawiono szczegółowo w dalszej części pracy (Wstęp 1.2.3.1) [40].

1.1.3. Charakterystyka polimerazy Phi29

Polimeraza Phi29 z bakteriofaga $\Phi 29$ należy do rodziny B i nie posiada aktywności 5'→3' egzonukleolitycznej. Po raz pierwszy scharakteryzował ją w 1984 r. zespół Margarity Salas [41]. Dalsze badania zespołu wykazały unikatowe właściwości polimerazy, tj. wysoką efektywność, procesywność i aktywność przemieszczania nici. Dowiódł on również, że do zajścia replikacji konieczne są wyłącznie dwa białka:

polimeraza Phi29 i białko p3 (TP), które działa jak starter w inicjacji reakcji [42]. Co ciekawe białko p3 (TP) przyłącza się do polimerazy w miejscu, gdzie związane jest DNA i odłącza się dopiero po przyłączeniu ok. 6 nukleotydów. Taki mechanizm jest kluczowy, aby replikacja zachodziła tylko na końcach genomu, co jest ważne w przypadku liniowej budowy genomu bakteriofaga Φ 29 [43]. Badania nad strukturą i funkcją polimerazy wykazały, że N-koniec odpowiedzialny jest za aktywność egzonukleolityczną 3'→5', natomiast C-koniec odpowiedzialny jest za syntezę. Pomiędzy nimi wyróżniono obszar ct, który umożliwia współpracę obu części i zachowuje równowagę między syntezą, a aktywnością korektorską polimerazy [44]. Zespół przebadał również szereg mutacji punktowych i wykazał kluczowe znaczenie w procesie replikacji następujących reszt aminokwasowych: Tyr59, His61, Phe69 i Phe128 [45, 46]. Dowiódł on również, że Val250 jest kluczowym enzymem w miejscu aktywnym do koordynacji metalu oraz Leu384 wpływa na selektywność nukleotydów i poprawność parowania zasad [47, 48].

Strukturę przestrzenną polimerazy Phi29 rozwiązano w 2004 r., dzięki czemu precyzyjnie określono występowanie poszczególnych domen, co przedstawiono na rysunku 4. Egzonukleaza 3'→5' obejmuje reszty aminokwasowe 5-190, śródręcze – 191-261 oraz 428-531, w tym konserwowane w centrum aktywnym reszty Asp249 i Asp458, palce – 360-395, kciuk – 532-575 oraz TPR1 – 262-359 i TPR2 – 396-427. TPR1 to domena odpowiedzialna za kontakt z białkiem p3 (TP) i inicjację replikacji, natomiast TPR2 odpowiada za interakcje z nicią matrycową DNA. Badania strukturalne polimerazy pozwoliły wyjaśnić wysoką procesywność i brak konieczności obecności kofaktorów w replikacji. W strukturze tego białka można wyróżnić 3 tunele. Pierwszy z nich nazwano tunelem dupleksu upstream, który jest tworzony przez domeny egzonukleazy, śródręcza, kciuka, TPR1 i TPR2. Tunel ten jest odpowiedzialny za stabilizację dwuniciowego produktu. Drugi tunel – tunel matrycowy downstream jest budowany przez domenę śródręcza, palców, egzonukleazy i TPR2. Tworzy on kanał prowadzący do centrum aktywnego dla matrycowej nici DNA. Jego niewielka szerokość umożliwia przejście tylko pojedynczej nici. Rozdzielenie podwójnej nici DNA przed wejściem do tunelu, tłumaczy występowanie aktywności przemieszczania nici, charakterystyczne np. dla helikaz. Ostatni tunel to miejsce wejścia deoksynukleotydów i uwalniania pirofosforanu [49].



Rysunek 4. Struktura przestrzenna polimerazy Phi29 (PDB: 1XHX). Kolorem czerwonym oznaczono domenę egzonukleazy, różowym – śródrećza, ciemnoniebieskim – palców, zielonym – kciuka, żółtym – TPR1 i jasnoniebieskim – TPR2. Poniżej struktury w sposób schematyczny pokazano rozłożenie domen w sekwencji aminokwasowej, zaznaczając przy tym (*) konserwowane reszty kwasu asparaginowego w pozycjach 149 i 458 [49].

Polimerazę Phi29 w bazie UniProt znaleźć można pod kodem P03680 [50]. Jest ona również sprzedawana przez wielu producentów, m.in. New England Biolabs [51], EURx [52] czy Thermo Fisher Scientific [53]. Wykorzystuje się ją między innymi w reakcjach MDA (ang. *Multiple Displacement Amplification*) i RCA (ang. *Rolling Circle Amplification*), którą opisano szczegółowo w dalszej części pracy (Wstęp 1.2.3.2) [54, 55].

1.2. Amplifikacja DNA

Definicja amplifikacji DNA według Encyklopedii PWN brzmi następująco: „Proces powodujący zwiększenie liczby kopii danego odcinka DNA (genu) przypadających na genom. Występująca naturalnie amplifikacja DNA jest mechanizmem regulacyjnym, umożliwiającym trwałe zwiększenie ilości produktu danego genu w odpowiedzi na zmianę w parametrach środowiska lub w ramach zaprogramowanego cyklu rozwojowego; dodatkowe kopie genów mogą występować w chromosomach ułożone szeregowo w miejscu (locus) danego genu albo poza chromosomami jako DNA pozachromosomowe; amplifikacja DNA jest ważnym czynnikiem w ewolucji, dostarcza dodatkowe kopie genu, zmniejszając presję selekcyjną na zachowanie pełnej funkcjonalności każdej kopii, co z kolei umożliwia zmiany w jednej z wersji danego genu.” [56]. W tym rozdziale zostaną przedstawione wybrane reakcje amplifikacji DNA wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych.

1.2.1. PCR – złoty standard amplifikacji DNA

Aktualnie najczęściej wykorzystywaną techniką do amplifikacji DNA jest reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polimerase Chain Reaction*, PCR). Została ona opracowana i po raz pierwszy wykorzystana w 1985 r. przez Kary’ego Mullis’a. Początkowo nazwano ją reakcją enzymatycznej amplifikacji DNA, a później nazwę zmieniono na reakcję łańcuchową polimerazy. Pierwszym amplifikowanym fragmentem DNA był gen ludzkiej β -globiny, a kluczowe do tego było wykorzystanie dwóch oligonukleotydów – komplementarnych do początku i końca genu [57]. Początkowo do reakcji używano fragmentu Klenowa, co wymagało dodawania kolejnych porcji polimerazy po etapie denaturacji. Zmieniło się to po roku 1988, kiedy po raz pierwszy zastosowano w reakcji polimerazę termostabilną z *T. aquaticus*, co znacznie uprościło procedurę. Polimeraza ta nie traciła aktywności podczas denaturacji termicznej, co wyeliminowało konieczność dodawania jej w trakcie trwania reakcji [58]. Za swoje osiągnięcia związane z opracowaniem metody PCR w 1993 r. K. Mullis otrzymał nagrodę Nobla z chemii. Reakcja składa się z 3 głównych etapów: denaturacji, hybrydyzacji starterów oraz elongacji. W trakcie denaturacji następuje rozdzielenie podwójnej nici DNA, dzięki czemu możliwa jest hybrydyzacja starterów z matrycą i kolejno elongacja, w trakcie której polimeraza syntetyzuje nową

nić DNA. Powtarzanie tych cykli prowadzi do wykładniczego wzrostu amplifikowanego fragmentu DNA, gdyż w kolejnych cyklach powstałe wcześniej produkty stają się matrycą [57, 59].

Nieustający rozwój metody PCR doprowadził do wielu modyfikacji procedury, skutkując stworzeniem wielu odmian tej reakcji, pozwalających na coraz bardziej szczegółowe analizy. Jedną z nich jest metoda qPCR (ang. *quantitative PCR*), nazywana również real-time PCR (PCR czasu rzeczywistego). Dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych, które wiążą się do nowo powstającej podwójnej nici DNA, możliwe jest ilościowe opisanie reakcji bezpośrednio po jej zakończeniu, bez konieczności dodatkowych etapów, tj. wizualizacji reakcji na żelu [60]. Kolejną metodą opartą o technikę PCR, jest RT-PCR (ang. *Reverse Transcription PCR*). W tej metodzie wykorzystywany jest dodatkowy enzym – odwrotna transkryptaza (RNA-zależna polimeraza DNA), która na matrycy mRNA syntetyzuje DNA, wykorzystywane jako matryca w metodzie PCR. Opracowano również wariant qRT-PCR (ang. *quantitative Reverse Transcription PCR*), który pozwala śledzić reakcję w czasie rzeczywistym [60, 61]. Interesującą modyfikacją techniki PCR jest ddPCR (ang. *Droplet Digital PCR*), umożliwiający ilościową analizę DNA. Reakcja jest prowadzona w emulsji wodno-olejowej, powodującej podzielenie próbki na wiele mikroreakcji, dzięki czemu zwiększona zostaje czułość i precyzja względem standardowej procedury [62]. Kolejnym zastosowaniem PCR jest multipleks PCR, w którym dzięki użyciu przynajmniej dwóch par starterów w jednej reakcji, możliwe jest amplifikowanie więcej niż jednego fragmentu DNA jednocześnie, co jest wykorzystywane m.in. do identyfikacji patogenów [63, 64].

1.2.2. Problemy z amplifikacją DNA

W reakcjach amplifikacji DNA, mimo ich wielu modyfikacji, wciąż pozostają nierozwiązane niektóre problemy, głównie z tzw. „trudnymi matrycami” i obecnością inhibitorów amplifikacji w mieszaninie reakcyjnej [65]. Do tak zwanych „trudnych” można zaliczyć matryce zawierające dużą ilość par GC oraz wiele sekwencji repetytywnych. Matryce bogate w pary GC mogą tworzyć struktury drugorzędowe, uniemożliwiające przyłączenie się polimerazy i starterów do matrycy. Problem pojawia się również w przypadku starterów zawierających dużo par GC, gdyż

mogą one hybrydyzować ze sobą tworząc struktury tzw. „primer-dimer”. Dodatkowo ich temperatura topnienia może być podwyższona, co powoduje wydłużenie procesu optymalizacji warunków reakcji. Denaturacja i elongacja, również mogą być utrudnione, ze względu na występowanie trzech wiązań wodorowych pomiędzy cytozyną i guaniną. Często, aby reakcja z taką matrycą mogła zajść prawidłowo, konieczne jest dodanie odczynnika zwiększającego specyficzność i wydajność amplifikacji DNA np. dimetylosulfotlenku (ang. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) [66, 67]. Innym rodzajem tzw. „trudnych matryc” jest DNA zawierające sekwencje repetytywne. Użycie takiej matrycy może prowadzić do powstawania produktów o różnych długościach, poprzez niespecyficzne przyłączanie starterów oraz wcześniejsze odłączanie się polimerazy od matrycy [68].

Kolejnym problemem jest zanieczyszczenie próbek inhibitorami amplifikacji, które mogą prowadzić do całkowitego zahamowania reakcji. Inhibitory mogą pochodzić z różnych źródeł, w tym z próbek klinicznych (hemoglobina, heparyna, laktoferyna, immunoglobulina G), próbek stolca (mocznik, sole żółciowe), roślin (pektyny, polisacharydy), próbek środowiskowych (kwas humusowy, jony metalu) oraz próbek archeologicznych (pył kostny, torf koprolitowy) [69]. Możemy wyróżnić co najmniej trzy mechanizmy inhibicji: inhibicję poprzez oddziaływanie z polimerazą, z matrycą lub zmianę środowiska reakcji. W grupie inhibitorów wpływających na obniżenie efektywności polimerazy możemy wyróżnić: hemoglobinę, heparynę, mocznik i sole żółciowe. Hemoglobina i heparyna oddziałują z łańcuchem peptydowym enzymu, natomiast mocznik i sole żółciowe destabilizują jego strukturę [69, 70, 71, 72, 73, 74]. Inhibitory oddziałujące z DNA to: laktoferyna, immunoglobulina G, kwas humusowy, kolagen i jony metali. W przypadku laktoferyny, immunoglobuliny G, kwasu humusowego oraz kolagenu wiązanie z DNA „blokuje” matrycę, co uniemożliwia polimerazie związanie się z nią i prowadzenie reakcji amplifikacji. Natomiast jony metali zmniejszają specyficzność starterów [70, 71, 75, 76, 77, 78]. Inhibitory wpływające na środowisko reakcji to pektyny i polisacharydy. Ich inhibicja wynika głównie ze zwiększenia lepkości próbki, co ogranicza dostęp enzymu do matrycy [69, 79]. Wymienione na początku pył kostny i torf koprolitowy są substancjami złożonymi, a co się z tym wiąże mogą zawierać wiele różnych inhibitorów. W pyłku kostnym mogą występować np. substancje hemowe, działające

jak hemoglobina, czy kolagen, natomiast w torfie koprolitowym znaleźć można sole żółciowe czy polisacharydy [78, 80].

1.2.3. Izotermiczne metody amplifikacji kwasów nukleinowych

Amplifikacja izotermiczna to grupa reakcji o zróżnicowanym mechanizmie działania i składzie mieszaniny reakcyjnej. Wspólną cechą tych reakcji jest stała temperatura prowadzenia reakcji. Zainicjowanie amplifikacji może zachodzić według jednego z pięciu mechanizmów: promotorowego, przerywania nici, ponownego składania nici, rozplatania lub inwazji nici, które podsumowano w tabeli 1 [81].

Tabela 1. Podsumowanie mechanizmów inicjacji amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych. Na podstawie [81].

Mechanizm	Opis działania	Przykładowe metody
Promotorowy	Miejszem inicjacji amplifikacji, jest sekwencja promotorowa. Wymaga dołączenia sekwencji promotorowej na starterze.	NASBA, 3SR, TMA
Przerywania nici	Enzymy nacinają jedną z nici DNA, co umożliwia przyłączenie polimerazy do powstałego 3' końca.	SDA, EXPAR, CRISDA
Ponownego składania nici	Tworzenie struktur pętli umożliwia wiązanie się starterów i rozpoczęcie reakcji.	LAMP, HIP
Rozplatania nici	Wykorzystanie enzymów lub wstępnej denaturacji do rozplecenia podwójnej nici DNA.	HDA
Inwazji nici	Działanie białek rekombinacyjnych umożliwia inwazję starterów w podwójną nić DNA.	RPA, SIBA

Mechanizm promotorowy polegający na inicjacji reakcji w miejscu sekwencji promotorowych wykorzystywany jest głównie w przypadku izotermicznej amplifikacji RNA. Reakcjami, które go wykorzystują są m. in. 3SR (ang. *Self-Sustained Sequence Replication*), NASBA (ang. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) i TMA (ang. *Transcription-Mediated Amplification*). Opis mechanizmu promotorowego przedstawiono poniżej na przykładzie reakcji 3SR, która jest pierwszą opisaną techniką

izotermicznej amplifikacji kwasu nukleinowego. Do matrycy RNA przyłącza się starter z dodatkową sekwencją promotora T7, a następnie odwrotna transkryptaza syntetyzuje nić komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA). Kolejno RNAza H degradowuje RNA w kompleksie RNA-cDNA, następuje przyłączenie drugiego startera, również z sekwencją promotora T7 i synteza drugiej nici DNA przez odwrotną transkryptazę. Dzięki dodanym sekwencjom promotora T7, polimeraza T7 przyłącza się do nich, syntetyzuje RNA i ponownie może dojść do syntezy cDNA na matrycy DNA. Cykle te powtarzają się do momentu zakończenia reakcji. Kluczowym etapem jest dodanie sekwencji promotora T7, które umożliwiają amplifikację RNA. Reakcja NASBA jest opatentowaną nazwą reakcji 3SR, natomiast TMA mimo tego samego mechanizmu działania opartego o promotor T7, ma uproszczony skład enzymatyczny (wykorzystywana jest odwrotna transkryptaza z aktywnością RNAzy H) [82, 83, 84].

Mechanizm przerywania nici można przedstawić na trzech wybranych reakcjach – SDA (ang. *Strand Displacement Amplification*), EXPAR (ang. *Exponential Amplification Reaction*) i CRISDA (ang. *CRISPR-Cas9-Triggered Strand Displacement Amplification*). W każdej reakcji matrycą jest podwójna nić DNA, przy czym w reakcjach SDA oraz EXPAR endonukleazy nacinają tylko jedną nić i umożliwiają przyłączenie startera. Natomiast w reakcji CRISDA nie dochodzi do rzeczywistego przecięcia nici, tylko do rozdzielenia nici przez enzym Cas9, przyłączenie startera i inicjację amplifikacji DNA [85, 86, 87, 88].

Mechanizm ponownego składania nici bazuje na zmianach struktury przestrzennej matrycy. W przypadku reakcji LAMP (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) odpowiednio zaprojektowane startery powodują otrzymanie produktu DNA z pętlami na obu końcach i zhybrydowanym fragmentem wewnętrznym. Tworzone pętle mają sekwencje komplementarną do starterów, co umożliwia inicjację amplifikacji DNA [89]. Drugim przykładem reakcji opartej o ten mechanizm inicjacji jest reakcja HIP (ang. *Helix Initiated Primer amplification*). W tym przypadku startery są tak projektowane, aby po amplifikacji następowało samoistne tworzenie struktury typu „spinka do włosów”, odsłaniając tym samym miejsce wiązania startera i umożliwiając kolejną rundę amplifikacji DNA. Rearanżacja struktury następuje samoistnie poprzez przyjmowanie termodynamicznie stabilniejszych konformacji [90].

Mechanizm rozplatania nici występujący w reakcji HDA (ang. *Helicase-Dependent Amplification*) bazuje na użyciu enzymu rozplatającego podwójną nić DNA – helikazy. Początkowo helikaza rozplata podwójną nić, a białka wiążące pojedynczą nić stabilizują miejsce rozplecenia. Następnie przyłączają się startery i polimeraza, która rozpoczyna amplifikację DNA. Po procesie amplifikacji ponownie helikaza rozplata podwójną nić DNA i proces się powtarza [91].

Ostatnim poznany mechanizm jest inwazja nici, która polega na inwazji w podwójną nić DNA, dzięki użyciu rekombinazy. Znane są dwie reakcje bazujące na tym mechanizmie RPA (ang. *Recombinase Polymerase Amplification*) i SIBA (ang. *Strand Invasion-Based Amplification*). W przypadku RPA startery łączą się z rekombinazą, która rozplata matrycę w miejscu komplementarnym do sekwencji przyłączonego startera. Następnie starter łączy się z matrycą i przyłącza się polimeraza, która rozpoczyna amplifikację DNA [40, 92]. Reakcja SIBA korzysta z tego samego mechanizmu z tą różnicą, że to nie startery łączą się z rekombinazą a oligonukleotyd komplementarny do regionu pomiędzy starterami. Dzięki przyłączeniu tego fragmentu, następuje rozplecenie nici i przyłączenie starterów, a później polimerazy, co umożliwia powielenie DNA [93].

Warto wspomnieć również o reakcjach, których inicjacja amplifikacji zależy wyłącznie od przyłączenia starterów do matrycy, jak np. RCA i MDA. W przypadku RCA amplifikacja inicjowana jest przez przyłączenie startera do jednoniciowej, kolistej matrycy DNA, co umożliwia rozpoczęcie syntezy nowej nici przez polimerazę z aktywnością przemieszczenia nici. Zastosowanie kolistej matrycy zbudowanej z podwójnej nici DNA jest możliwe po jej wstępnej denaturacji, dzięki czemu możliwe jest przyłączenie startera do jednoniciowego fragmentu [54]. Natomiast w przypadku MDA po wstępnej denaturacji dwuniciowej matrycy, odsłaniane są jednoniciowe fragmenty umożliwiające przyłączenie losowych starterów, od których rozpoczyna się izotermiczna, wielomiejscowa synteza DNA [55].

Reakcje amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych poza różnymi mechanizmami inicjacji reakcji, różnią się również warunkami prowadzenia reakcji, w tym czasem, temperaturą czy ilością starterów. Różnice te zestawiono dla wybranych reakcji w tabeli 2 [81].

Tabela 2. Warunki amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych dla wybranych reakcji. Na podstawie [54, 55, 81].

Reakcja	Wstępna denaturacja	Temperatura [°C]	Ilość starterów	Czas [min]
NASBA	TAK	41	2	120
3SR	NIE	37-42	2	60
TMA	TAK	41	2	140
SDA	TAK	37	2	120
EXPAR	NIE	60	1	10
CRISDA	NIE	37	2	90
LAMP	TAK	60-68	4-6	60
HIP	TAK	60-65	2	60
HDA	NIE	65	2	90
RPA	NIE	30-42	2	60
SIBA	NIE	30-42	2	30
RCA	TAK	30	1	>30
MDA	TAK	30	wiele	>300

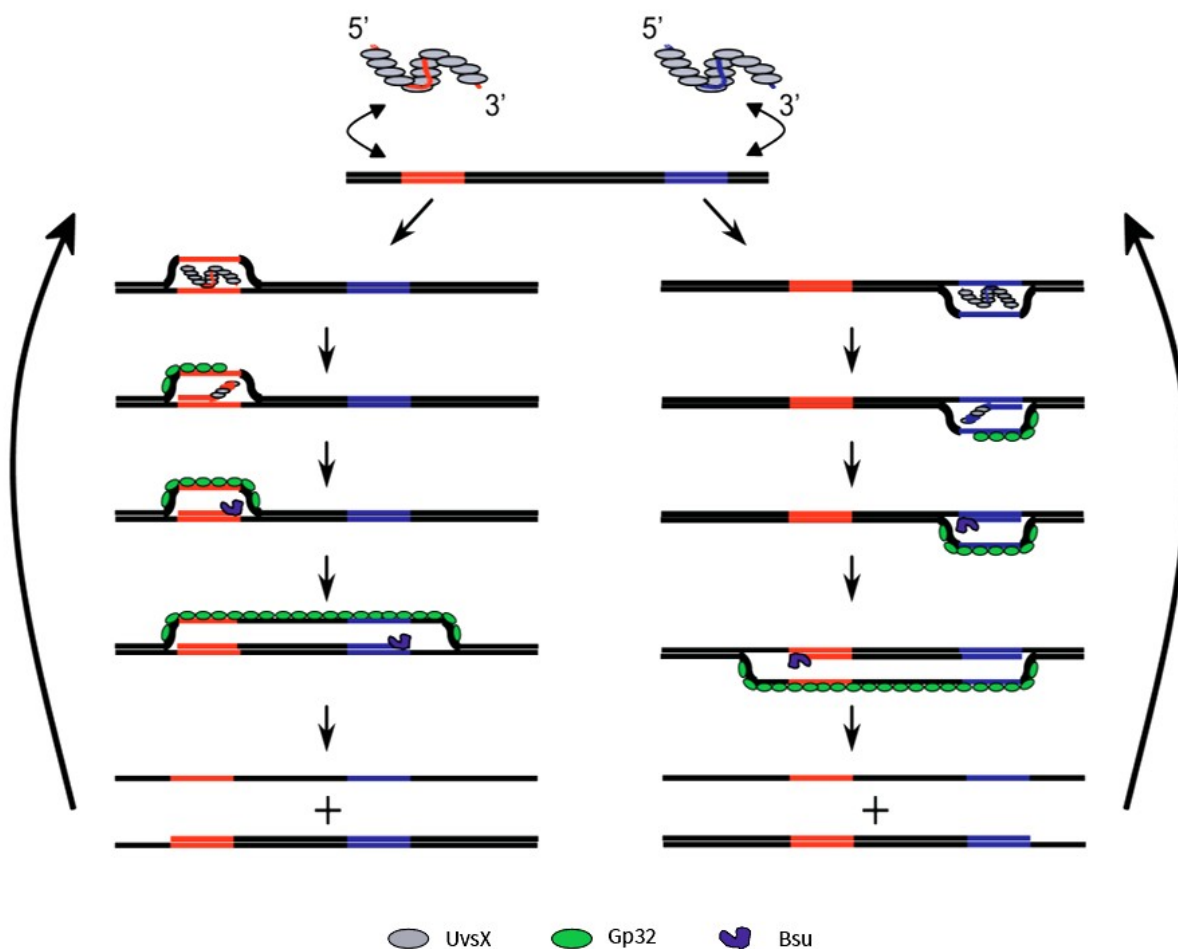
Duża różnorodność metod izotermicznych, pozwala na szerokie ich zastosowanie m. in. w identyfikacji patogenów, sekwencjonowaniu nowej generacji, czy immunoanalizie [81]. Reakcja LAMP może być wykorzystywana do identyfikacji wielu patogenów np.: pierwotniaków *Leishmania*, czy *Theileria*, wirusa ptasiej grypy jak również bakterii *Bordetella* [94, 95, 96, 97]. Reakcję RPA można wykorzystać do identyfikacji patogenów np. opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus*, wirusa La Crosse czy grzyba *Rhizopus arrhizus* [92, 98, 99]. Reakcja RPA umożliwia również detekcję genów oporności na antybiotyki w metodzie typu multipleks [100]. Firma HOLOGIC (USA) wykorzystała reakcję TMA w dostępnych na rynku testach diagnostycznych pozwalających na wykrywanie: wirusa SARS-CoV-2, brodawczaka ludzkiego, zapalenia wątroby typu B i C, opryszczki czy cytomegalowirusa [101]. Z kolei reakcja HDA może być wykorzystywana do wykrywania jednego z najtrudniejszych do identyfikacji patogenów, *Mycobacterium tuberculosis* [102, 103]. Metodę RCA i MDA stosuje się do detekcji specyficznych sekwencji ze śladowych

ilości DNA, tworzeniu mikromacierzy, wzbogacania próbek do sekwencjonowania jak również identyfikacji patogenów np. *Staphylococcus aureus* [104, 105, 106, 107, 108].

1.2.3.1. Izotermiczna reakcja RPA

Jak już wspomniano wcześniej mechanizmem inicjacji reakcji RPA jest inwazja nici. Poza rekombinazą UvsX z faga T4, do prawidłowego zajścia reakcji konieczna jest jeszcze obecność dwóch białek – białka UvsY i gp32 również pochodzących z faga T4 [40, 92]. Rekombinaza UvsX ma zbliżone działanie do rekombinazy recA z *E. coli*, a jej głównym celem jest tworzenie pętli D między ssDNA a dsDNA w miejscu komplementarnym. Jest to etap niezbędny do replikacji genomu faga. Wykazano, że dodanie białka gp32, wiążącego pojedynczą nić DNA, powoduje wzrost efektywności tworzenia pętli D przez rekombinazę, a zarazem mniejsze zużycie ATP. Przyczynia się to najprawdopodobniej do stabilizacji pętli poprzez wiązanie ssDNA [109, 110, 111, 112]. Białko UvsY pełni kilka funkcji pomocniczych w reakcji RPA. Przede wszystkim pomaga przy tworzeniu kompleksu UvsX z ssDNA oraz stabilizuje taki kompleks. Dodatkowo oddziałując z białkiem gp32 prowadzi do jego wyparcia z pojedynczej nici DNA, co umożliwia hybrydyzację starterów [113].

Kluczowym enzymem tej reakcji jest polimeraza, która dołącza się do dwuniciowej struktury stworzonej przez matrycę i przyłączony do niej starter. Olaf Piepenburg wraz z zespołem przetestowali kilka polimeraz, w tym: fragment Klenowa, polimerazę Bst z *Bacillus stearothermophilus*, Phi29 oraz Bsu. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymali używając polimerazy Bsu, dlatego zarówno opis pierwszego użycia jak również mechanizm działania reakcji RPA zostały przedstawione dla tej właśnie polimerazy (Rysunek 5) [40, 92]. Złożony w 2002 roku patent dał podwaliny pod komercjalizację reakcji RPA w formie gotowych zestawów umożliwiających izotermiczną amplifikację DNA przez firmę TwistDx [40, 114].



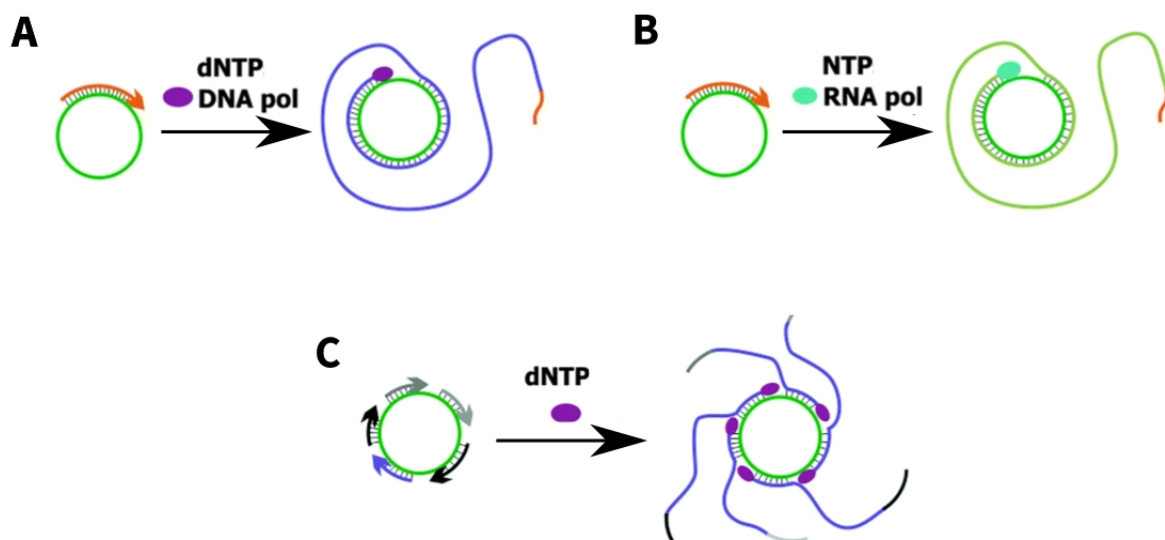
Rysunek 5. Mechanizm reakcji izotermicznej RPA [92]. Kolor pomarańczowy i niebieski – fragmenty DNA komplementarne do sekwencji starterów.

1.2.3.2. Izotermiczna reakcja RCA

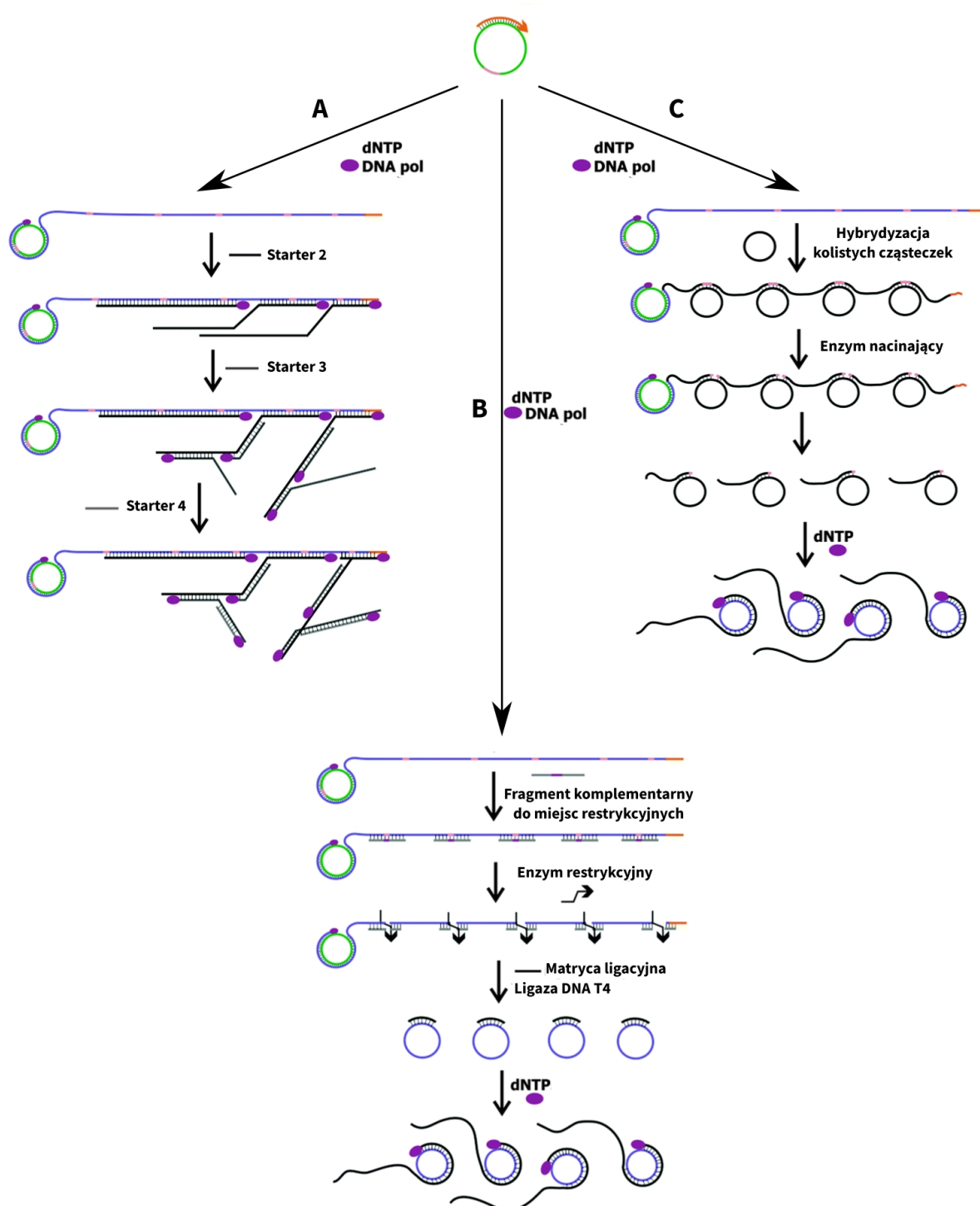
RCA to reakcja izotermicznej liniowej amplifikacji DNA, wykorzystująca polimerazę Phi29. Jak już wspomniano przy opisie polimerazy (Wstęp 1.1.3), do replikacji genomu bakteriofaga $\Phi 29$ niezbędne są tylko dwa białka - polimeraza i białko p3 (TP) [42]. Pierwszy mechanizm amplifikacji kolistych cząsteczek zaprezentowano w 1995 r., a trzy lata później opisano pierwsze zastosowanie reakcji RCA [115, 54]. Aktualnie można wyróżnić sześć wariantów tej reakcji:

- 1) linowa reakcja RCA (rysunek 6 A),
- 2) linowa reakcja RCT (ang. *Rolling Circle Transcription*) (rysunek 6 B),
- 3) wielostarterowa reakcja RCA (rysunek 6 C),
- 4) wykładnicza amplifikacja DNA z zastosowaniem hiperrozgałęzionej reakcji RCA (rysunek 7 A),

- 5) reakcja RCA cyklicznie powielająca koliste matryce (ang. *Circle-to-Circle Amplification*, C2CA) (rysunek 7 B),
- 6) reakcja RCA z generowaniem starterów (ang. *Primer Generation–Rolling Circle Amplification*, PG–RCA) (rysunek 7 C) [116].



Rysunek 6. Mechanizmy różnych form reakcji izotermicznej RCA i RTA [116]. A – linowa reakcja RCA; B – linowa reakcja RCT; C – wielostarterowa reakcja RCA. DNA pol – polimeraza DNA; RNA pol – polimeraza RNA; dNTP – deoksynukleotydy; NTP – rybonukleotydy.



Rysunek 7. Mechanizmy różnych form reakcji izotermicznej RCA [116]. A – wykładnicza amplifikacja DNA z zastosowaniem hiperrozgałęzionej reakcji RCA; B – C2CA; C – PG-RCA. DNA pol – polimeraza DNA; dNTP – deoksynukleotydy.

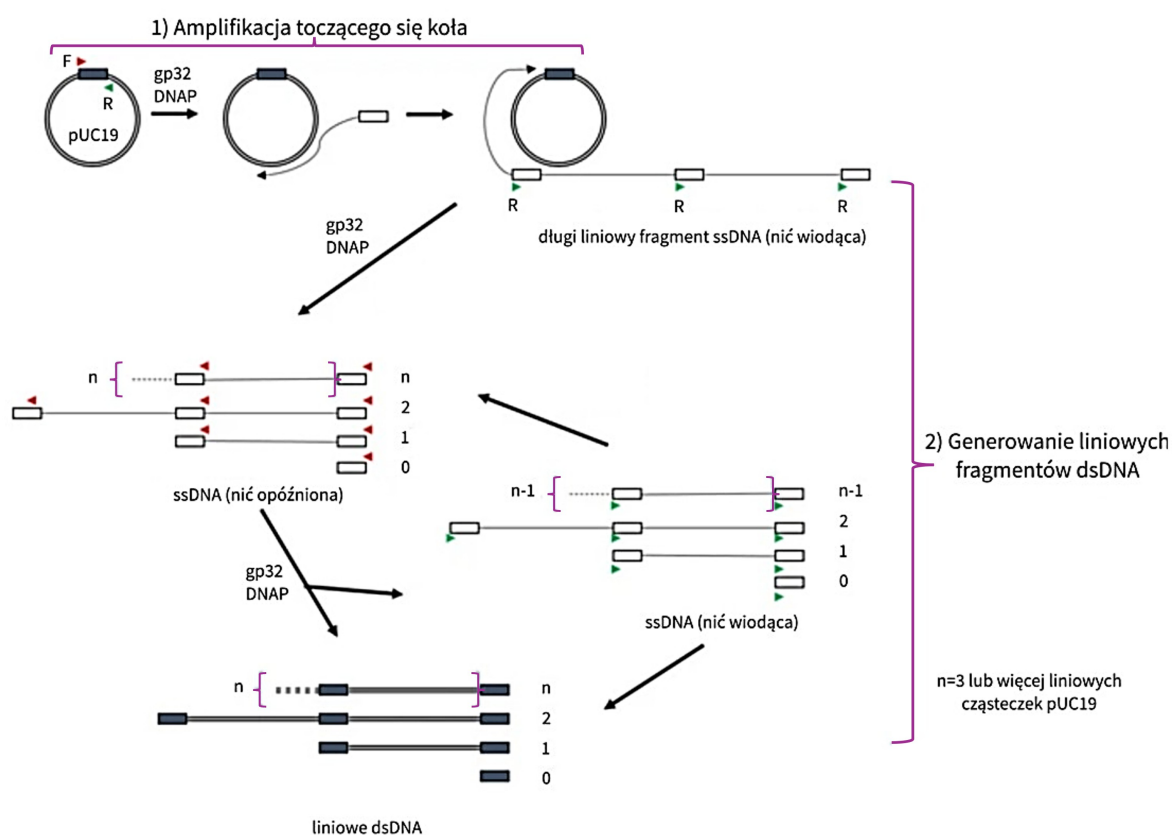
Liniowa reakcja RCA (rysunek 6 A) polega na syntezie długiego konkatamerycznego produktu zawierającego wiele powtórzeń sekwencji matrycy. W tej reakcji miejsce startu wyznaczone jest przez starter dołączony do kolistej matrycy, a

reakcja jest prowadzona w sposób ciągły w stałej temperaturze, dzięki zdolnością polimerazy do przemieszczania nici [81, 116]. Reakcja RCT (rysunek 6 B), ma analogiczny mechanizm działania do RCA, lecz jej produktem jest długi konkatameryczny produkt RNA [117]. Kolejnym ciekawym podejściem do RCA, jest użycie wielu starterów do jednej matrycy (rysunek 6 C). Zastosowanie kilku starterów pozwala na wiele miejsc startu amplifikacji DNA w jednej matrycy, co przekłada się na znaczny wzrost wydajności amplifikacji. Ten wariant reakcji sprawdza się do szybszego namnożenia dużych cząsteczek DNA [118]. Hiperrozgałęziona reakcja RCA (rysunek 7 A) polega na dodaniu poza starterem specyficznym do matrycy również starterów komplementarnych z powstałymi produktami. W ten sposób powstają kolejne miejsca startu amplifikacji poprzez tworzenie rozgałęzionych struktur przestrzennych [54]. Jako jeden z wariantów tej reakcji uważa się również reakcję MDA, w której amplifikacja zachodzi od razu na matrycy liniowej [55]. Reakcja C2CA (rysunek 7 B) natomiast bazuje na liniowej reakcji RCA, wykorzystując jednak dodatkowo enzym restrykcyjny i ligazę do tworzenia kolejnych kolistych cząsteczek matrycowych, czego wynikiem jest wykładniczy wzrost efektywności amplifikacji. Dzięki dodanym do reakcji krótkim fragmentom ssDNA komplementarnym do miejsc rozpoznawanych przez enzym restrykcyjny, długi produkt liniowy zostaje pocięty na krótsze fragmenty, które następnie są ligowane z matrycą ligacyjną i stają się nowymi cząsteczkami matrycowymi. Kluczowe w tej reakcji jest odpowiednie zaprojektowanie sekwencji matrycy ligacyjnej, tak aby jej sekwencja była komplementarna do obu końców liniowego fragmentu, co umożliwi efektywne zamknięcie jego struktury w formę kolistą [119]. Reakcja PG-RCA również wykorzystuje mechanizm cięcia długiego produktu, lecz w tym przypadku najpierw dochodzi do hybrydyzacji kolistych cząsteczek do liniowego produktu, po której następuje cięcie w miejscach hybrydyzacji i odłączenie nowych cząsteczek matrycowych (rysunek 7 C) [104].

Reakcja RCA z użyciem polimerazy Phi29 została skomercjalizowana przez kilka firm, w tym New England Biolabs [51] i Thermo Scientific [53]. W instrukcjach do prowadzenia tych reakcji można znaleźć informację o wstępnej denaturacji dwuniciowej matrycy ze starterami, w celu umożliwienia hybrydyzacji starterów do zdenaturowanej matrycy. Dzięki temu reakcja RCA może być stosowana zarówno w przypadku matryc jednoniciowych jak i dwuniciowych.

1.2.3.3. Reakcja izotermicznej amplifikacji DNA oparta o białko gp32

Mając świadomość mechanizmu reakcji RPA (Wstęp 1.2.3.1), RCA (Wstęp 1.2.3.2) oraz właściwości białka gp32 (Wstęp 1.3.1) Yinhua Zhang i Nathan Tanner zaproponowali nowy sposób izotermicznej amplifikacji DNA wykorzystujący białko gp32. Reakcja ta składa się z dwóch etapów tj. amplifikacji toczącego się koła (Wstęp 1.2.3.2) i generowania liniowych fragmentów dsDNA (Rysunek 8). Ze względu na mechanizm działania reakcję ogranicza użycie w niej jako matrycy tylko i wyłącznie kolistej cząsteczki DNA, ale pozwala na uzyskiwanie produktów w szerokim zakresie wielkości (testowano zakres 277-7249 pz). Wadą reakcji jest powstawanie produktów ubocznych (rysunek 8, produkty z $n > 0$), a jej niewątpliwymi zaletami łatwość przygotowania, prowadzenia oraz krótki czas trwania (1 h) [120]. Ze względu na brak konieczności dodawania innych enzymów niż polimeraza oraz brak etapu wstępnej denaturacji, metoda ta wydaje się być idealna do badania nowych polimeraz.



Rysunek 8. Mechanizm reakcji izotermicznej amplifikacji DNA opartej na białku gp32 [120]. DNAP – polimeraza DNA; gp32 – białko gp32; F – starter Forward; R – starter Reverse.

1.3. Białka wiążące kwasy nukleinowe

Białka posiadające zdolność wiązania kwasów nukleinowych (ang. *Nucleic acid Binding Protein*, NBP) występują we wszystkich żywych organizmach. Są one niezbędne w takich procesach jak: replikacja, transkrypcja, naprawa DNA, jego transport czy obróbka i degradacja RNA. Można je podzielić na białka wiążące RNA (ang. *RNA Binding Protein*, RBP), DNA (ang. *DNA Binding Protein*, DBP) lub oba rodzaje kwasów nukleinowych (ang. *DNA and RNA Binding Protein*, DRBP). W przypadku DBP można zastosować dodatkowy podział ze względu na wiązaną formę DNA: białka wiążące ssDNA (ang. *Single-Stranded DNA binding protein*, SSB) oraz dsDNA (ang. *Double-Stranded DNA binding protein*, DSB) [121, 122, 123, 124]. DBP można również podzielić ze względu na ich budowę oraz funkcję [123, 125]:

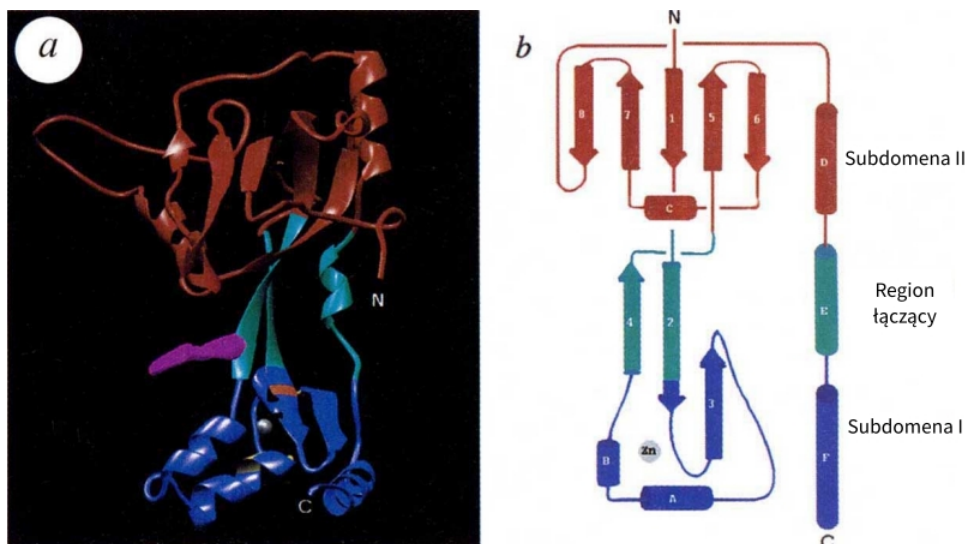
- 1) białka z motywem helisa-zwrot-helisa – biorące udział w transkrypcji genów przez wiązanie ze specyficznymi sekwencjami;
- 2) białka koordynujące cynk – regulujące ekspresję poprzez stabilizację jonami cynku, które ułatwiają wiązanie DNA;
- 3) białka typu suwak – dimery regulujące transkrypcję;
- 4) inne białka z α -helisą – odpowiadające za organizację DNA, poprzez wpływ na procesy ekspresji i replikacji;
- 5) białka ze strukturą β -kartki – inicjujące transkrypcję przez oddziałujące z miejscami promotorowymi;
- 6) białka zawierające strukturę β -spinki lub β -kartki – regulujące replikację i transkrypcję przez specyficzne oddziaływanie z DNA;
- 7) inne białka – różnorodne białka nieenzymatyczne pełniące różne funkcje, tj. regulacja cyklu komórkowego czy odpowiedź na stres;
- 8) enzymy – białka katalizujące reakcje enzymatyczne z udziałem DNA [123, 125].

W białkach SSB można wyróżnić motyw OB (ang. *Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding fold*), składający się z pięciu antyrównoległych β -kard. Motyw ten swoją budową przypomina kanał, a miejsce oddziaływania z DNA znajduje się w jego wnętrzu. Może on również występować w RBP i odpowiadać za wiązanie rRNA lub tRNA [124, 126]. W przypadku białek DSB można natomiast wyróżnić sekwencję aminokwasową, będącą domeną odpowiedzialną za wiązanie podwójnej nici DNA. W bazie Conserved Protein Domain Family (NCBI) znaleźć ją można pod kodem cl00928 i nazwą dsDNA_bind Superfamily [127].

Ze względu na dużą różnorodność NBP, ich zastosowanie *in vitro* może być bardzo szerokie. SSB wykorzystywane są w izotermicznej amplifikacji DNA do stabilizacji pojedynczej nici DNA [81, 112], w PCR lub multipleks PCR do zwiększenia efektywności reakcji, a w elektroforezie kapilarnej do detekcji ssDNA [128]. Z sukcesem można je również stosować jako partnerów fuzyjnych w fuzjach z polimerazami, poprawiając przez to ich procesywność, efektywność czy zakres tolerancji na obecność inhibitorów amplifikacji [129, 130, 131, 132]. W tym samym celu można również wykorzystać białka DBP, wpływając na poprawę procesywności i czułości enzymów fuzyjnych [133, 134, 135, 136].

1.3.1. Charakterystyka białka gp32 z bakteriofaga T4

Białko gp32 pochodzi z bakteriofaga T4 i jest jednym z białek biorących udział w replikacji jego genomu. Po raz pierwszy opisali je Bruce Alberts i Linda Frey w 1970 r. Dowiedli oni, że białko występuje w postaci monomeru o masie 35 kDa i silnie wiąże ssDNA [137]. Badania strukturalne białka wykazały, że zawiera ono 301 reszt aminokwasowych, a jego masa molekularna to dokładnie 33488 Da. Strukturę białka można podzielić na 3 części: subdomenę I, region łączący i subdomenę II (rysunek 9). Subdomenę I koordynuje jon cynku, który jest niezbędny do prawidłowego fałdowania białka oraz stabilizacji DNA. Subdomena II zawiera domenę OB składającą się z 5 β -kard odpowiadającą za wiązanie ssDNA, natomiast region łączący, łączy obie subdomeny. Składa się on z dwóch β -kard i jednej α -helisy, co dodatkowo stabilizuje strukturę przestrzenną białka (rysunek 9) [124, 138].



Rysunek 9. Budowa białka gp32. a) struktura przestrzenna, b) schemat budowy [138]. Kolorem ciemnoniebieskim oznaczono subdomenę I, czerwonym – subdomenę II, jasnoniebieskim – region łączący oraz szarym – jon cynku.

Ostatnie badania gp32 potwierdziły kluczową rolę fragmentu CTD (1-21 reszty aminokwasowe) w replikacji bakteriofaga T4. Delecja CTD powoduje drastyczne spowolnienie procesu dysocjacji, z 200 nt/s dla pełnego białka do 2 nt/s dla mutanta. Takie spowolnienie dysocjacji może mieć negatywny wpływ na efektywność replikacji i powodować wolniejszą polimeryzację. Usunięcie CTD powoduje jednak „odsłonięcie” miejsca wiązania, skutkujące silniejszym wiązaniem ssDNA, co może być wykorzystane w biologii molekularnej [139]. Interakcję białka gp32 i ssDNA badano również pod kątem wpływu stężenia soli i jonów cynku na CTD. Kompleks białka z ssDNA był najbardziej stabilny w roztworze z chlorkiem potasu o stężeniu 0,5 M oraz z dodatkiem cynku [140]. Białko, choć dobrze scharakteryzowane, nadal pozostaje obiektem badań. Najczęstszym zastosowaniem białka gp32 są reakcje izotermiczne, m. in. reakcja RPA i amplifikacja izotermiczna DNA oparta o białko gp32 (Wstęp 1.2.3.1 i 1.2.3.3). W obu tych reakcjach poprzez przyłączenie się do ssDNA pełni rolę stabilizującą dla rozpleczonego fragmentu podwójnej nici DNA [40, 92, 120].

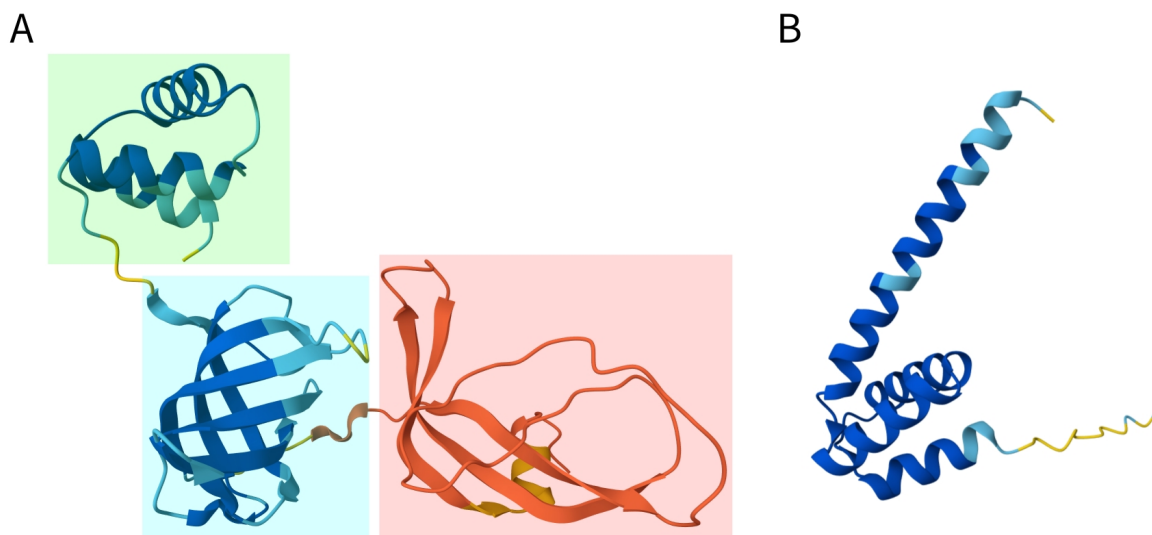
1.3.2. Charakterystyka białek NeqSSB i Neq150 z *Nanoarchaeum equitans*

Badania nad genomem archeona *Nanoarchaeum equitans* wskazały na obecność wielu białek biorących udział w rekombinacji homologicznej, w tym między innymi białko oznaczone jako NEQ199, będącego białkiem wiążącym ssDNA. Mała wielkość genomu archeonu (490885 pz) wskazuje na możliwość występowania białek pełniących wiele funkcji jednocześnie, np. białek NBP [141]. Analiza bazy danych NCBI oraz opisy poszczególnych sekwencji białek dla tego archeona, pozwoliły na znalezienie białka wiążącego dsDNA oznaczonego jako NEQ150 [142].

Pierwszym przebadanym białkiem wiążącym DNA, było białko NEQ199. Jego nazwę skrócono do NeqSSB, podkreślając tym samym jego główną właściwość, czyli wiązanie ssDNA. Białko to ma masę natywną 26,36 kDa, zbudowane jest z 243 reszt aminokwasowych i w roztworze występuje jako monomer. NeqSSB jest zdolny do wiązania DNA i RNA, stąd zaliczane jest do NBP, natomiast wiązanie DNA jest zauważalnie silniejsze. Dodatkowo w testach porównawczych wiązanie ssDNA jest wiązaniem preferencyjnym. Białko NeqSSB wykazuje wysoką stabilność termiczną, okres półtrwania aktywności białka w 95°C to 15 min, a w 100°C to 5 min [143]. Drugie wymienione białko oznaczone w GenBanku jako NEQ150 zostało niedawno scharakteryzowane, a zapis jego nazwy ustalono jako Neq150. Występuje ono również w postaci monomera, składa się z 97 reszt aminokwasowych, a jego masa w warunkach natywnych to 16,8 kDa. Wiąże zarówno DNA jak i RNA, więc również zalicza się do NBP, a najsilniejsze powinowactwo wykazuje do dsDNA. Podobnie jak NeqSSB wykazuje silną odporność termiczną i nie traci swoich zdolności do wiązania DNA nawet po 3 h inkubacji w 99°C [144]. Oba wymienione białka nie mają rozwiązanej struktury przestrzennej, natomiast w bazie AlfaFold znajdują się predykcje ich struktur, które przedstawiono na rysunku 10 [33, 34].

W przypadku białka NeqSSB, analizując jego strukturę przestrzenną można wyróżnić 3 domeny. Domenę N-terminalną (1-59 reszt aminokwasowych), środkową (60-151) i C-terminalną (152-243), które na rysunku 10A zostały oznaczone odpowiednio kolorem zielonym, niebieskim i czerwonym. Domeny te różnią się aktywnością wiązania różnych form kwasu nukleinowego. Domena N-terminalna nie wiąże DNA, środkowa wiąże ssDNA, a C-terminalna wiąże ssDNA i dsDNA [145].

Białko NeqSSB znalazło zastosowanie jako partner fuzyjny z polimerazami Bst, Taq Stoffel i Pwo z *Pyrococcus woesei*, znacząco poprawiając ich procesywność, efektywność i zakres tolerancji na obecność inhibitorów amplifikacji w mieszaninie reakcyjnej [129, 130, 131].

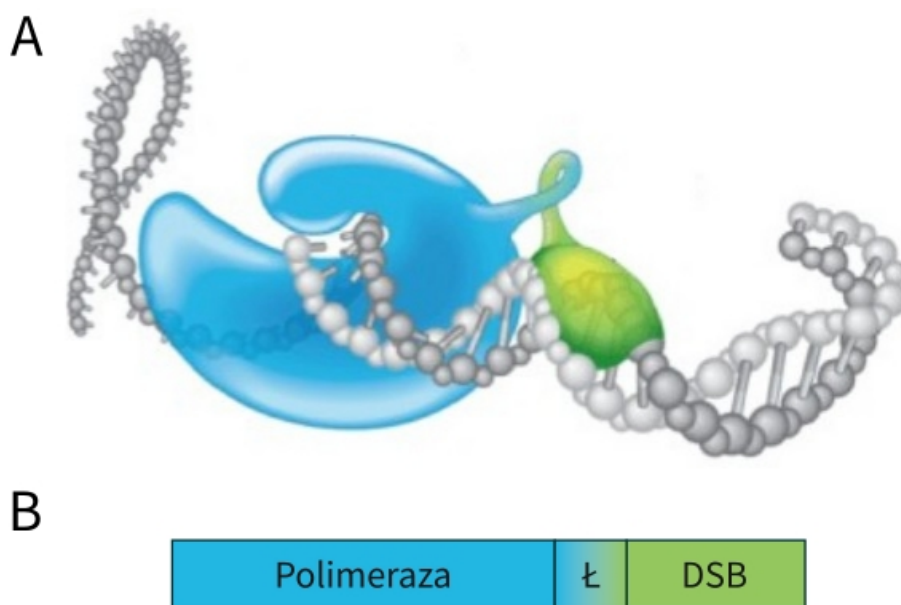


Rysunek 10. Predykcja struktury przestrzennej białek wiążących DNA z *Nanoarchaeum equitans*. A – białko NeqSSB (NEQ199 – AlfaFold AF-Q74MP9-F1-v4); B – białko Neq150 (NEQ150 – AlfaFold AF-Q74NA9-F1-v4) [146]. Kolor ciemnoniebieski struktury – bardzo wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia; kolor jasnoniebieski – wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia; kolor żółty – niskie prawdopodobieństwo wystąpienia; kolor pomarańczowy – bardzo niskie prawdopodobieństwo wystąpienia. Zielone tło – domena N-terminalna białka NeqSSB; niebieskie tło – domena środkowa białka NeqSSB; czerwone tło – domena C-terminalna białka NeqSSB.

1.4. Charakterystyka fuzyjnych polimeraz DNA

Białko fuzyjne to produkt ekspresji genu powstałego poprzez połączenie co najmniej dwóch sekwencji nukleotydowych, którego celem jest uzyskanie jednego białka o zmodyfikowanych lub nowych właściwościach funkcjonalnych. Białka fuzyjne tworzy się, aby umożliwić ich oczyszczanie, immobilizację, monitorowanie czy udoskonalić ich najbardziej istotne cechy [65, 147]. Powszechnie wykorzystywane są znaczniki poprawiających efektywność i wydajność oczyszczania, np. His-tag (6xHis), biotyna, MBP (ang. *Maltose Binding Protein*), czy peptyd HL [147, 148].

Przykładem znaczącej poprawy właściwości w wyniku fuzji są połączenia polimeraz z białkami wiążącymi DNA, zwane polimerazami fuzyjnymi. Takie połączenie ma na celu poprawę stabilności wiązania enzymu z DNA. Dodatkowym elementem w takich fuzjach jest krótki i elastyczny łącznik aminokwasowy, umożliwiający poprawne ułożenie przestrzenne obu składowych białka fuzyjnego. W wielu przypadkach dodawany jest również ułatwiający oczyszczanie znacznik i sekwencja rozpoznawana przez proteazy, w celu późniejszego usunięcia znacznika. Właściwość, która najczęściej ulega poprawie, zarówno dla polimeraz termostabilnych (Taq i Pfu z *Pyrococcus furiosus*) jak i izotermicznych (Bst) to procesywność [129, 132, 133, 134, 135, 136]. Na rysunku 11 przedstawiono schematycznie polimerazę fuzyjną.



Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie polimerazy fuzyjnej z białkiem DSB związanej z DNA. A – schemat budowy przestrzennej [149], B – schemat blokowy. Ł – łącznik aminokwasowy.

W przypadku polimeraz fuzyjnych wykorzystuje się różnych partnerów: DSB (np. Sso7d z *Sulfolobus solfataricus* czy DBD z ligazy z *Pyrococcus furiosus*) oraz SSB (np. NeqSSB), a ich dołączenie może mieć miejsce na obu końcach polimerazy. Partner fuzyjny będący SSB, powinien być dołączony w taki sposób, aby mógł oddziaływać z jednociową matrycą, natomiast DSB tak, aby mógł oddziaływać z dwuniciowym zsyntetyzowanym fragmentem, co pokazano na rysunku 11. W tabeli 3 zestawiono przykładowe polimerazy fuzyjne [129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136].

Tabela 3. Zestawienie przykładowych polimeraz fuzyjnych.

Polimeraza	DBP	Miejsce fuzji	Skutek fuzji
Bst	NeqSSB	N-koniec	Zwiększenie procesywności [129]
Taq Stoffel	NeqSSB	N-koniec	Zwiększenie efektywności amplifikacji oraz tolerancji na obecność inhibitorów [130]
Pwo	NeqSSB	C-koniec	Zwiększona efektywność wykrywanie specyficznych sekwencji wirusa SARS CoV-2 [131]
Tzi	SsoSSB	N-koniec	Zwiększona produktywność, wydajność i procesywność [132]
Taq Stoffel	DBD	N-koniec	Zwiększenie procesywności oraz tolerancji na obecność inhibitorów [133]
Dbh	Sso7d	C-koniec	Zwiększenie procesywności [134]
Taq	Sso7d	C-koniec	Zwiększenie procesywności [135, 136]
Pfu	Sso7d	C-koniec	Zwiększenie procesywności, tolerancji na obecność soli, aktywności specyficznej oraz czułości [136]

Bst – polimeraza DNA z *Bacillus stearothermophilus*; NeqSSB – białko SSB z *Nanoarchaeum equitans*; Taq Stoffel – polimeraza DNA z *Thermus aquaticus* bez domeny egzonukleolitycznej 5'→3'; DBD – domena ligazy z *Pyrococcus furiosus* wiążąca dsDNA; Dbh – polimeraza DNA z *Sulfolobus acidocaldarius*; Sso7d – białko DSB z *Sulfolobus solfataricus*; Taq – polimeraza DNA z *Thermus aquaticus*; Pfu – polimeraza DNA z *Pyrococcus furiosus*; Pwo – polimeraza DNA z *Pyrococcus woesei*; Tzi – polimeraza DNA z *Thermococcus zillgi*; SsoSSB – białko SSB z *Sulfolobus solfataricus*.

Ze szczegółowo omawianych wcześniej polimeraz, tylko w przypadku Phi29 została stworzona jej fuzyjna wersja. Jako partnera fuzyjnego użyto domeny (HhH)₂ z topoizomerazy V z *Methanopyrus kandleri*, w dwóch wariantach: H – fragment H (696-751 reszt aminokwasowych) lub H+I – fragmentu H i I (696-802). Domeny dołączono do C-końca polimerazy Phi29, co umożliwiło jej oddziaływanie ze zsyntetyzowaną nicią DNA. Dodatkowo sugerowano, że fuzja na N-końcu może blokować aktywność przemieszczania nici polimerazy. Jako łącznika użyto

6 aminokwasowego fragmentu (Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Ala), który pozwolił na swobodne ułożenie w przestrzeni obu fragmentów białka fuzyjnego, a w konsekwencji prawidłowe ich działanie. Poza zwiększeniem zdolności do wiązania dsDNA, obie fuzje poprawiły wydajność oddziaływania z matrycą w formie zarówno plazmidowego jak i genomowego DNA [150, 151]. Te połączenia są jedynymi opisanymi przykładami modyfikowania polimerazy Phi29 poprzez fuzję.

Rozdział 2

Cel pracy

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie i przebadanie nowych fuzyjnych polimeraz do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych. Fuzje składały się z polimerazy Bsu z *Bacillus subtilis* lub polimerazy Phi29 z bakteriofaga Φ 29 oraz białek wiążących kwasy nukleinowe – gp32, NeqSSB oraz Neq150.

Dzięki analizie właściwości uzyskanych polimeraz fuzyjnych, niniejsza rozprawa ma na celu rozszerzenie wiedzy w tematyce izotermicznej amplifikacji DNA oraz fuzji izotermicznych polimeraz DNA.

Celami szczegółowymi było:

- Zaprojektowanie i otrzymanie konstruktów genowych kodujących białka fuzyjne oraz referencyjne
- Optymalizacja procesu otrzymywania i oczyszczania polimeraz DNA
- Wyznaczenie aktywności enzymów fuzyjnych
- Optymalizacja amplifikacji izotermicznej DNA
- Zbadanie właściwości otrzymanych polimeraz DNA

Rozdział 3

Materialy

3.1. Aparatura i materiały zużywalne

- Aparat do dokumentacji żeli i blotów G:BOX (Syngene, UK)
- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-PROTEAN Tetra (BioRad, USA)
- Aparat do elektroforezy poziomej (produkcja własna)
- Autoklaw Classic 2100 (Prestige Medical, UK)
- Celulozowe worki dializacyjne 25 mm (Sigma-Aldrich, USA)
- Cieplarka laboratoryjna CLW 53 (POL-EKO, Polska)
- Filtr membranowy z mieszaniny estrów celulozy (MCE) 0,45 μm (Chemland, Polska)
- Filtr strzykawkowy z poli(fluorku winylidenu) (PVDF) 0,45 μm (VWR, USA)
- Homogenizator ultradźwiękowy SONOPULS (Bandelin, Niemcy)
- Inkubator z wytrząsaniem (JEIO TECH, Korea Południowa)
- Kolumna Bio-Scal Mini Bio-Gel P-6 (BioRad, USA)
- Kolumna EconoFit Profinity IMAC (BioRad, USA)
- Kolumna HiTrap Heparin HP (Cytiva, USA)
- Koncentratory wirówkowe Amicon Ultra-15 (Millipore, USA)
- Mieszadło magnetyczne SU1150 (Sunlab, Niemcy)
- Myjka ultradźwiękowa Emmi D60 (EMAG, Niemcy)
- pHmetr SevenCompact S210 (Mettler Toledo, Szwajcaria)
- Spektrofotometr NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA)
- System chromatograficzny NGC Quest 10 Plus (BioRad, USA)
- Termoblok TDB-120 (BioSan, Łotwa)

- Termoblok z mieszaniem ThermoMixer C (Eppendorf, Niemcy)
- Termocykler real-time CFX Opus (BioRad, USA)
- Termocykler VeritiPro (Applied Biosystems, USA)
- Transluminator LM-26 (UVP, USA)
- Transluminator ze światłem białym (Invitrogen, USA)
- Waga laboratoryjna (RADWAG, Polska)
- Wielofunkcyjna wytrząsarka Vortex ZX4 (Worteks) (Velp Scientifica, Włochy)
- Wirówka MiniSpin (Eppendorf, Niemcy)
- Wirówka z chłodzeniem 5910 Ri (Eppendorf, Niemcy)
- Zamrażarka niskotemperaturowa (Infrico medcare, Hiszpania)
- Zasilacz PowerPac Basic (BioRad, USA)

3.2. Odczynniki chemiczne

- 5'-znakowany fluorescencyjne oligonukleotyd (dT76) (Genomed, Polska)
- Agar bakteriologiczny (Carl Roth, Niemcy)
- Agaroza (EURx, Polska)
- Bromek etydyny (VWR, USA)
- Bufor denaturujący NuPAGE™ LDS (4X) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Bufor MOPS (BioShop, Kanada)
- Błękit brylantowy R 250 (C.I. 42660) (Carl Roth, Niemcy)
- Chloramfenikol (Carl Roth, Niemcy)
- Chlorek magnezu sześciowodny (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorek manganu czterowodny (Carl Roth, Niemcy)
- Chlorek niklu sześciowodny (Supelco, USA)
- Chlorek potasu (Carl Roth, Niemcy)
- Chlorek rubidu (Carl Roth, Niemcy)
- Chlorek sodu (Carl Roth, Niemcy)
- Chlorek wapnia sześciowodny (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorowodorek tetracykliny (tetracyklina) (IBI Scientific, USA)
- Czterosodowa sól kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) (Carl Roth, Niemcy)
- D-Glukozę (Bioshop, Kanada)
- Ditiotreitol (DTT) (A&A Biotechnology, Polska)

- Diwodorofosforan potasu (Carl Roth, Niemcy)
- Ekstrakt drożdżowy (A&A Biotechnology, Polska)
- Etanol (Chempur, Polska)
- Glicerol (Chempur, Polska)
- Glicyna (Carl Roth, Niemcy)
- Glikol etylenowy (VWR, USA)
- Imidazol (Carl Roth, Niemcy)
- Izopropyl β-d-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG) (A&A Biotechnology, Polska)
- Kwas chlorowodorowy (POCH, Polska)
- Kwas humusowy (Sigma-Aldrich, USA)
- Kwas octowy (POCH, Polska)
- Kwaśny fenol (Merck, Niemcy)
- Laktoferyna (Sigma-Aldrich, USA)
- Losowe oligonukleotydy o długości 6 nt (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Metanol (Chempur, Polska)
- Midori Green Xtra DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE, Niemcy)
- Mieszanina inhibitorów proteaz cOmplete™ (Roche, Szwajcaria)
- Mieszanina fenol : chloroform : alkohol izoamylowy 25:24:1 (PamReac AppliChem, Hiszpania)
- Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP) (New England Biolabs, USA)
- Mocznik (Sigma-Aldrich, USA)
- MOPS (BioShop, Kanada)
- N-Laurylosarkozynian sodu (sarkozyl) (BioShop, Kanada)
- *N,N'*-metyleno-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- *N,N'*-dimetyloformamid (Sigma-Aldrich, USA)
- *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Carl Roth, Niemcy)
- Nadsiarczan amonu (APS) (Carl Roth, Niemcy)
- Octan magnezu (Chempur, Polska)
- Octan potasu (Chempur, Polska)
- Octan sodu (Sigma-Aldrich, USA)
- Pepton (A&A Biotechnology, Polska)
- Pirowęglań dietylu (DEPC) (PamReac AppliChem, Hiszpania)

- Roztwór buforowy pH 8 (10xTBE) (Chempur, Polska)
- Siarczan dodecyłu sodu (SDS) (Carl Roth, Niemcy)
- Siarczan gentamycyny (gentamycyna) (Carl Roth, Niemcy)
- Siarczan kanamycyny (kanamycyna) (Carl Roth, Niemcy)
- Siarczan magnezu (VWR, USA)
- Siarczan streptomycyny (streptomycyna) (Sigma-Aldrich, USA)
- Sól sodowa ampicyliny (ampicylina) (Carl Roth, Niemcy)
- Sól sodowa heparyny (heparyna) (Sigma-Aldrich, USA)
- Trihydroksymetyloaminometan (Tris) (Carl Roth, Niemcy)
- Triton X-100 (BioShop, Kanada)
- Wodorofosforan sodu (Carl Roth, Niemcy)
- Wodorotlenek sodu (Chempur, Polska)
- Złoże ssDNA-celuloza (Worthington, USA)

3.3. Enzymy i białka

- Białko genu 32 faga T4 (gp32) (New England Biolabs, USA)
- Duża podjednostka polimerazy Bsu (New England Biolabs, USA)
- FastDigest NcoI (Thermo Fisher Scientific, USA)
- FastDigest NdeI (Thermo Fisher Scientific, USA)
- FastDigest SalI (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lizozym (Carl Roth, Niemcy)
- Polimeraza Phi29 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Polimeraza Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Viscolase (A&A Biotechnology, Polska)

3.4. Plazmidy

- pBAD/Myc-His A (Thermo Fisher Scientific, USA)
- pET-21a(+) (Novagen, UK)
- pUC19 (New England Biolabs, USA)

3.5. Markery wielkości

- Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (P7719) (New England Biolabs, USA)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (SM1331) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Marker DNA NEB (New England Biolabs, USA)
- PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (26616) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Pierce Unstained Protein MW Marker (26610) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder (26625) (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.6. Szczepy bakteryjne i drożdżowe

- *Bacillus subtilis* 168 (ATCC, USA)
- *Escherichia coli* Arctic Express (DE3) (Agilent Technologies, USA)
- *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (BL RIL) (Agilent Technologies, USA)
- *Escherichia coli* DH10 β (New England Biolabs, USA)
- *Escherichia coli* Jo-Fi (A&A Biotechnology, Polska)
- *Escherichia coli* Lemo21 (DE3) (New England Biolabs, USA)
- *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (Novagen, UK)
- *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)
- *Escherichia coli* Tuner (DE3) (Novagen, UK)
- *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (ATCC, USA)

3.7. Zestawy

- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego - NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Niemcy)
- Zestaw do izolacji genomowego DNA - Genomic Maxi AX (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA - GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Zestaw do klonowania - OverLap Assembly Cloning Kit (A&A Biotechnology, Polska)
- Zestaw do wyznaczania jednostek aktywności polimeraz - EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA)

3.8. Roztwory i bufony

50xTAE

- 2 M Tris
- 5,7% Kwas octowy
- 0,05 M EDTA

10xTris-Gly

- 0,25 M Tris
- 1,92 M Glicyna
- 1% SDS

NaAES

- 0,04 M Octan sodu pH 5,2
- 0,008 M EDTA
- 1% SDS
- 0,3 M Octan sodu

Tris-EDTA (TE)

- 0,01 M Tris pH 8,0
- 0,001 M EDTA

TfbI

- 0,1 M RbCl
- 0,05 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 0,03 M ctan potasu
- 0,01 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 15% Glicerol

TfbII

- 0,01 M MOPS
- 0,01 M RbCl
- 0,25 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 15% Glicerol

Żel zagęszczający

- 5% Mieszaniny akrylamidów
- 0,125 M Tris pH 6,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,1% TEMED

Żel rozdzielający

- 10-12% Mieszaniny akrylamidów
- 0,375 M Tris pH 8,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,08% TEMED

HisA

- 0,05 M Tris pH 7,5-9,5
- 0,005 M Imidazol
- 0,5 M KCl

HisB

- 0,05 M Tris pH 7,5-9,5
- 0,3 M Imidazol
- 0,5 M KCl

JonA

- 0,05 M Tris pH 7,5-9,5
- 0,05 M KCl

JonB

- 0,05 M Tris pH 7,5-9,5
- 2 M KCl

DesA

- 0,1 M Tris pH 7,5
- 0,1 M KCl

DesB

- 0,2 M Tris pH 7,5-9,5
- 0,1 M KCl

Cel0

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 0,15 M KCl
- 0,001 M EDTA

CelA

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 0,2 M KCl
- 0,001 M EDTA

CelB

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 0,5 M KCl
- 0,001 M EDTA

CelC

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 0,8 M KCl
- 0,001 M EDTA

CelD

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 1,35 M KCl
- 0,001 M EDTA
- 50% Glikol etylowy

Stripping

- 0,05 M Tris pH 7,5
- 0,5 M KCl
- 0,05 M EDTA

Roztwór błękitu brylantowego

- 1 g/l Błękit brylantowy R 250
- 50% Metanol
- 10% Kwas octowy

3.9. Pożywki

Luria broth (LB)

- 10 g/l NaCl
- 5 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 10 g/l Pepton

Luria broth agar (LA)

- 10 g/l NaCl
- 5 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 10 g/l Pepton
- 15 g/l Agar bakteriologiczny

YPD

- 20 g/l Pepton
- 10 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 20 g/l Glukoza

YPD-agar

- 20 g/l Pepton
- 10 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 20 g/l Glukoza
- 15 g/l Agar bakteriologiczny

Superbroth (SB)

- 8 g/l NaCl
- 15 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 20 g/l Pepton
- 2 g/l Na_2HPO_4
- 1 g/l KH_2PO_4
- 2 g/l Glukoza

Super optimal catabolite repression (SOC)

- 0,5 g/l NaCl
- 5 g/l Ekstrakt drożdżowy
- 20 g/l Pepton
- 0,95 g/l MgCl_2
- 1,2 g/l MgSO_4
- 4 g/l Glukoza

W przypadku konieczności suplementowania pożywek antybiotykiem korzystano z następujących stężeń:

- Amplicylina - 100 $\mu\text{g/ml}$
- Chloramfenikol - 20 $\mu\text{g/ml}$
- Gentamycyna - 20 $\mu\text{g/ml}$
- Kanamycyna - 50 $\mu\text{g/ml}$
- Streptomycyna - 100 $\mu\text{g/ml}$
- Tetracyklina - 10 $\mu\text{g/ml}$

3.10. Startery

Tabela 4. Tabelaryczne zestawienie starterów używanych w metodzie klonowania Gibsona.

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
pET.B.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg acggaacgaaaaaattagtgtct
pET.B.O.R	tggtggtgctcgagtgcggccgcaagctt gtcgactta ttTcgatcgtaccaagatggg
pET.HB.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccac acggaacgaaaaa attagtgtct
pET.BL.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caatcgtagaggacataaatgtaaaaac
pET.HBL.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccacat caatcgtagaggac ataaatgtaaaaac
pET.HN.O.R	tggtggtgctcgagtgcggccgcaagctt gtcgactta atggTggtggtggtggtg atcggcc
pET.HG.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccaccac ttcaaacgtaaat
pET.HN.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccaccac gac
pBAD.B.O.F	ccgtttttgggctaacaggaggaattaa ccatggg acggaacgaaaaaattagtgtctgtaga cg
pBAD.HG.O.R	gttTaaactcaatgatgatgatgatgatg gtcgactta atggTggtggtggtggtg aaggtcattcaa aaggTcatccaggTc
F-BLN150	gtacgatgcgaaa ggttctggtggtgttgac gatttagaagaaattcgtaaaaaaaattagaaga attaaaaaaagaag
R-N150LB	gtcaacaccaccagaacc ttTcgatcgtaccaagatggcctgatgcaaagtccacctTaaCg
F-N150LBL	ggttctggtggtgttgac caatcgtagaggacataaatgtaaaaacagtcacaga
R-BLLN150	ctctaacgattg gtcaacaccaccagaacc ttTacgaatgaaacgaatttttggttcacgt
F-N150LB	aaaaacgtgaaccaaaaattcgtttcattcgtaaa ggttctggtggtgttgac acggaacgaaaaa aattagt
pET.P.O.R	tggtggtgctcgagtgcggccgcaagctt gtcgactta ttTgatggtgaaggtgtcgtcaaccaga acaacacc
pET.P.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg aaacacatgccgcgtaaaatgtactcttgcg
pET.HP.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccaccac aaacacatg
pET.HN150.O.F	atTTTgttTaaCTTaaGaaggagatata catatg caccaccaccaccaccac gatttagaagaaattc gtaaaaaaaattagaagaattaaaaaaagaagaagctaaacgtaaattat

3.11. Bazy i narzędzia bioinformatyczne

3.11.1. Bazy danych

- AlphaFold Protein Structure Database
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), GenBank
- Protein Data Bank (PDB)
- Universal Protein Resource (UniProt)

3.11.2. Narzędzia bioinformatyczne

- MultAlin
- NEBioCalculator
- ProtParam (ExPASy)
- Reverse Complement (bioinformatics.org)
- RStudio
- SnapGene Viewer
- Translate tool (ExPASy)

Rozdział 4

Metody

4.1. Hodowle

4.1.1. Hodowla w podłożu stałym

Hodowle w podłożu stałym prowadzono na sterylnych szalkach ze zestaloną pożywką agarową. Dla szczepów bakteryjnych używano pożywki LA (Materiały 3.9) suplementowanej odpowiednimi antybiotykami, natomiast dla szczepów drożdżowych używano pożywki YPD-agar (Materiały 3.9). W szalkę wglaskano, za pomocą sterylnej głaszczki, zawiesinę wybranego mikroorganizmu. Hodowle prowadzono w 37°C przez noc w cieplarni (POL-EKO, Polska). Szalki z wyrosniętymi koloniami przechowywano w 4°C do dalszych manipulacji.

4.1.2. Hodowla w podłożu płynnym

Hodowle w podłożu płynnym prowadzono w kolbach szklanych z odpowiednią pożywką. Dla szczepów bakteryjnych używano pożywki LB lub SB (Materiały 3.9) suplementowanej odpowiednimi antybiotykami, natomiast dla szczepów drożdżowych używano pożywki YPD (Materiały 3.9). Do pożywki jako inokulum dodawano pojedynczą kolonię z szalki lub niewielką ilość krioprezerwowanej zawiesiny mikroorganizmów. Hodowle prowadzono w 37°C przez noc z wytrząsaniem o amplitudzie 220 rpm w inkubatorze (JEIO TECH, Korea Południowa). W celu zabezpieczenia i długoterminowego przechowywania szczepów krioprezerwowano je w zawieszynie z glicerolem. Zawiesinę przygotowywano mieszając hodowlę z 30% sterylnym glicerolem w stosunku 1:1. Tak przygotowany krioprezerwant przechowywano w -80°C do dalszych manipulacji.

4.2. Rozdziały elektroforetyczne

4.2.1. Elektroforeza agarozowa

Elektroforezę przeprowadzano w żelu agarozowym, dobierając jego procentowość do wielkości oczekiwanych produktów. Do żelu dodawano bromek etydyny lub barwnik Midori Green Xtra. Żel umieszczano w aparacie do elektroforezy poziomej i zalewano odpowiednim buforem, a następnie nakładano badane próbki z dodatkiem buforu obciążającego. W przypadku rozdziału DNA używano buforu TAE (Materiały 3.8), natomiast w przypadku rozdziału RNA używano buforu 0,5xTBE (Materiały 3.2). Rozdział prowadzono przez 20-30 min przy napięciu 160 V i wizualizowano go przy pomocy transluminatora (UVP, USA), transluminatora ze światem białym (Invitrogen, USA) lub systemu do robienia zdjęć G:Box (Syngene, UK).

4.2.2. Elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE

Elektroforezę prowadzono w żelu poliakrylamidowym, którego procentowość części rozdzielającej dobierano do wielkości badanych białek. Przed rozdziałem przygotowywano żel wlewając między odtłuszczone szyby żel rozdzielający, a po jego spolimeryzowaniu żel zagęszczający (Materiały 3.8). Gotowy żel umieszczano w aparacie wypełnionym buforem Tris-Gly (Materiały 3.8) i nakładano przygotowane próbki. Przygotowanie próbek polegało na dodaniu buforu denaturującego zawierającego 0,1 M DTT (Materiały 3.2) oraz denaturacji termicznej (10 min, 98°C). Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 230 V przez 35-45 min. Po rozdziale żel wyjmowano spomiędzy szyb i zabarwiano roztworem błękitu brylantowego (Materiały 3.8), następnie odmywano nadmiar barwnika gorącą wodą do momentu wyraźnego zaobserwowania prążków białkowych i odbarwienia tła. Wynik rozdziału dokumentowano poprzez wykonanie zdjęcie w świetle białym za pomocą transluminatora ze światem białym (Invitrogen, USA).

4.3. Praca z kwasami nukleinowymi

4.3.1. Izolacja RNA

Przed przystąpieniem do procesu izolacji RNA przygotowano próbki zawierające:

- (1) 500 μ l mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1,
- (2) 500 μ l chloroformu oraz
- (3) 1 ml schłodzonego w -20°C alkoholu etylowego.

Nocną hodowlę drożdżową rozdzielono po 1,5 ml do 2 ml próbek i zwirowano (5 min, 4500xg). Supernatant zlano, a osad zawieszono w 500 μ l buforu NaAES (Materiały 3.8), kolejno dodano 500 μ l roztworu kwaśnego fenolu i wymieszano za pomocą wortexu (Velp Scientifica, Włochy). Próbkę inkubowano w 65°C przez 8 min, następnie natychmiastowo zamrożono je zanurzając w ciekłym azocie i pozostawiono w temperaturze pokojowej. Po rozmrożeniu próbki zwirowano (20 min, 18°C , 18000xg), górną fazę wodną przeniesiono do wcześniej przygotowanej próbki (1) z mieszaniną fenol : chloroform : alkohol izoamylowy i intensywnie mieszano przez 5 min. Zawiesinę ponownie zwirowano (15 min, 18°C , 18000xg), a fazę wodną przeniesiono do wcześniej przygotowanej próbki (2) z chloroformem. Mieszaninę intensywnie mieszano przez 5 min, po czym zwirowano (10 min, 4°C , 18000xg). Uzyskaną fazę wodną przeniesiono do wcześniej przygotowanej próbki (3) z alkoholem etylowym i pozostawiono na noc w -20°C . Po nocy zwirowano zawiesinę (20 min, 4°C , 18000xg), zlano supernatant, a osad przepłukano 1 ml 70% roztworem alkoholu etylowego. Zawiesinę zwirowano (7 min, 4°C , 18000xg), zlano supernatant, odwrócono próbki do góry dnem i pozostawiono, aby resztki etanolu odparowały. Osady zawieszono w 150 μ l wody DEPC. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowane RNA przechowywano w -80°C do dalszych manipulacji.

4.3.2. Izolacja plazmidowego DNA

Hodowlę nocną o objętości 5 ml zwirowano (5 min, 5000xg) i zlano supernatant. Plazmidowe DNA izolowano z osadu bakteryjnego zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) (Materiały 3.7). DNA eluowano 50 μ l wody jałowej podgrzanej do 50°C. Stężenie wyizolowanego DNA plazmidowego mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C do dalszych manipulacji.

4.3.3. Izolacja genomowego DNA

Hodowlę nocną o objętości 20 ml zwirowano (5 min, 5000xg) i zlano supernatant. Genomowe DNA izolowano z osadu bakteryjnego zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu Genomic Maxi AX (A&A Biotechnology, Polska) (Materiały 3.7). DNA eluowano 500 μ l wody jałowej podgrzanej do 50°C. Stężenie wyizolowanego DNA genomowego mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C do dalszych manipulacji.

4.3.4. Trawienie restrykcyjne plazmidu

Mieszaninę reakcyjną do trawienia plazmidu przygotowano zgodnie z opisem w tabeli 6.

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia enzymatycznego plazmidów.

Nazwa	Ilość
Bufor 10xFastDigest	4 μ l
Plazmid	1-2 μ g
Enzym restrykcyjny NdeI lub NcoI	2 μ l
Enzym restrykcyjny SalI	2 μ l
Woda	Uzupełnić do 40 μ l

Początkowo dodano tylko enzym FastDigest NdeI (Thermo Fisher Scientific, USA) dla plazmidu pET-21a(+) lub FastDigest NcoI (Thermo Fisher Scientific, USA) dla plazmidu pBAD Myc-His A i inkubowano mieszaninę w 37°C przez 2 h. Następnie inaktywowano enzym w 65°C przez 10 min. Po ochłodzeniu dodano 2 μ l enzymu

FastDigest SalI (Thermo Fisher Scientific, USA) i inkubowano w 37°C przez 1 h, po czym inaktywowano enzym w 65°C przez 10 min. Całość mieszaniny nakładano na 1% żel agarozowy z dodatkiem Midori Green Xtra i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1). Korzystając z transluminatora ze światłem białym (Invitrogen, USA) wycinano prążek odpowiadający wielkości trawionego plazmidu oraz oczyszczano DNA z agarozy za pomocą zestawu Monarch DNA Gel Extraction Kit, zgodnie z zaleceniami producenta (New England Biolabs, USA) (Materiały 3.7). DNA eluowano 20 µl wody jałowej podgrzanej do 70°C. Stężenie wyizolowanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C do dalszych manipulacji.

4.3.5. Przygotowanie wstawek do klonowania

Wstawki do klonowania przygotowano metodą PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 7, natomiast startery używane w reakcji przedstawiono w rozdziale Materiały 3.10 w tabeli 4.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do otrzymywania wstawek metodą PCR.

Nazwa	Stężenie	Ilość
Starter forward	10 mM	2,5 µl
Starter reverse	10 mM	2,5 µl
dNTP	8 mM	5 µl
Bufor GC	5x	10 µl
Polimeraza Phusion	2 U/µl	0,5 µl
Matryca	-	75-100 µg
Woda	-	do 50 µl

Reakcję przeprowadzano w termocyklerze VeritiPro (Applied Biosystems, USA). Temperaturę przyłączania starterów optymalizowano w zakresie 52-68°C. Natomiast czas wydłużania dostosowywano do wielkości otrzymywanego produktu biorąc pod uwagę szybkość syntezy DNA przez polimerazę (dołączenie 1000 nukleotydów w ciągu 30 s). Ogólny profil czasowo-temperaturowy przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Profil czasowo-temperaturowy otrzymywania wstawek do klonowania metodą PCR.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość powtórzeń
98	120	1
98	30	40
52-68	30	
72	55-105	
72	300	1
4	∞	1

Mieszaninę poreakcyjną nakładano na 1-1,5% żel agarozowy z dodatkiem Midori Green Xtra i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1). Korzystając z transluminatora ze światłem białym (Invitrogen, USA) wycinano prążek odpowiadający wielkości otrzymywanego produktu oraz oczyszczano DNA z agarozy za pomocą zestawu Monarch DNA Gel Extraction Kit, zgodnie z zaleceniami producenta (New England Biolabs, USA) (Materiały 3.7). DNA eluowano 20 μ l wody jałowej podgrzanej do 70°C. Stężenie wyizolowanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C do dalszych manipulacji.

4.4. Praca z bakteriami

4.4.1. Bakterie kompetentne

Do 250 ml pożywki LB suplementowanej odpowiednimi antybiotykami dodano 5 ml bakteryjnej hodowli nocnej. Tak przygotowaną hodowlę inkubowano w 37°C z mieszaniem 220 rpm w inkubatorze (JEIO TECH, Korea Południowa) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej (OD_{600}) w granicach 0,5-0,6. Następnie hodowlę schładzano na lodzie przez 15 min, po czym wirowano (10 min, 4°C, 4500xg) w sterylnych butelkach wirowniczych. Supernatant zlano, a osad zawieszono w 15 ml buforu TfbI (Materiały 3.8) i inkubowano na lodzie przez 60 min. Po tym czasie zawiesinę zwirowano (5 min, 47°C, 4500xg), supernatant zlano a osad zawieszono w 3 ml buforu TfbII (Materiały 3.8). Tak przygotowaną zawiesinę komórek kompetentnych rozdzielono po 50 μ l do wcześniej schłodzonych sterylnych

1,5 ml probówek. Zawiesinę w zamkniętych probówkach mrożono poprzez zanurzenie w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie kompetentne przechowywano w -80°C do dalszych manipulacji.

Świeże komórki kompetentne poddawano testom czystości. Przeprowadzano procedurę transformacji (Metody 4.4.2) z wykorzystaniem plazmidu oraz bez dodania plazmidu. Bakterie z transformowanym plazmidem wysiewano (Metody 4.1.1) na szalki z odpowiednim dla plazmidu antybiotykiem. Bakterie bez plazmidu wysiewano na szalki bez antybiotyków oraz na szalki z ampicyliną, kanamycyną, gentamycyną, streptomycyną, tetracykliną i chloramfenikolem (Materiały 3.2). Po wyrośnięciu kolonii określano czystość przygotowanych komórek kompetentnych.

4.4.2. Transformacja bakterii

Przechowywane w zamrażarce -80°C probówki z bakteriami kompetentnymi rozmrażano na lodzie przez 5 min. Do bakterii kompetentnych dodawano 50-100 ng DNA plazmidowego. Całość inkubowano na lodzie przez 30 min, wykonano szok termiczny (42°C , 60 s), po czym od razu przenoszono probówki na lód i chłodzono przez 10 min. Następnie dodawano 500 μl ogrzanej do 37°C pożywki LB (Materiały 3.9) i inkubowano z mieszaniem przez 1-1,5 h w 37°C . Po tym czasie zawiesinę wirowano (5 min, $4500\times g$), zlewano 450 μl pożywki a w pozostałej objętości zawieszono osad bakteryjny. Powstałą w ten sposób zawiesinę wysiewano na szalki (Metody 4.1.1).

4.4.3. Klonowanie metodą Gibsona

Do klonowania używano zestawu OverLap Assembly Cloning Kit (A&A Biotechnology, Polska) (Materiały 3.7). Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z tabelą 9. Do reakcji użyto wstawek uzyskanych metodą PCR (Metody 4.3.5) oraz wektora będącego trawionym plazmidem (Metody 4.3.4), w proporcjach 1:1:1 (wstawka 1 : wstawka 2 : wektor).

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do klonowania metodą Gibsona.

Składnik	Wielkość produktu [nt]	Ilość
Wstawka 1	X	0,065·X ng
Wstawka 2	Y	0,065·Y ng
Wektor	Z	0,065·Z ng
dNTP	-	2 µl
Bufor 5xOverLap	-	4 µl
Mieszanina enzymów	-	2 µl
Woda	-	Uzupełnić do 20 µl

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C przez 1 h, następnie schładzano ją na lodzie i dodawano 5 µl mieszaniny do 50 µl bakterii kompetentnych *E. coli* (Metody 4.4.1) szczepów Jo-Fi, DH10β lub TOP10 (Materiały 3.6). Zawiesinę bakteryjną inkubowano na lodzie przez 1 h, po czym przeprowadzono szok za pomocą myjki ultradźwiękowej (EMAG, Niemcy), wkładając probówkę do wody wzburzonej ultradźwiękami na 15 s. Następnie próbówki chłodzono na lodzie przez 15 min i dodawano do nich 500 µl ogrzanej do 37°C pożywki SOC (Materiały 3.9). Całość inkubowano w 37°C z wytrząsaniem 500 rpm przez 1,5-2 h. Po tym czasie zawiesinę wirowano (5 min, 4500xg), zlewano 450 µl pożywki a w pozostałej części zawieszono osad bakteryjny. Powstałą w ten sposób zawiesinę wysiewano na szalki (Metody 4.1.1).

4.4.4. Nadprodukcja białek

Nadprodukcję testową prowadzono w małej skali (20 ml hodowli) z użyciem szczepów ekspersyjnych *E. coli*: Arctic Express (DE3), BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (BL RIL), Lemo21 (DE3), Rosetta (DE3), Tuner (DE3) lub TOP10 (Materiały 3.6). Do pożywki LB lub SB (Materiały 3.9) dodawano hodowlę nocną w proporcji 1:50, w ten sposób odmłodzoną hodowlę inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C do osiągnięcia $OD_{600} \sim 0,5$. Gdy OD_{600} osiągnęło wymagany poziom pobierano 1 ml hodowli do 1,5 ml probówki, wirowano (5 min, 5000xg), zlewano supernatant, a osad zawieszano w 100 μ l buforu TE (Materiały 3.8). Tak przygotowaną próbkę przechowywano w lodówce do późniejszej analizy elektroforetycznej. Pozostałą część hodowli indukowano dodając 1 M IPTG w stosunku 1:1000 (IPTG : hodowla) i prowadzono hodowlę dalej w 30°C. Po 2, 4, 6 i 24 godzinach od indukcji również pobierano 1 ml hodowli i przygotowywano próbki do elektroforezy. Po 24 godzinach wirowano (10 min, 5000xg) pozostałą objętość hodowli i zamrażano osad do późniejszych testów. Pobierane w trakcie hodowli próbki wykorzystano do rozdziłu elektroforetycznego w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2). Na podstawie wyników elektroforezy dla każdego białka wyznaczano optymalne warunki nadprodukcji (szczep i czas). Skalę nadprodukcji powiększono prowadząc hodowlę w 300 ml pożywki w optymalnych warunkach.

4.4.5. Uwalnianie białek z komórek bakteryjnych

Zamrożone osady po nadprodukcji (Metody 4.4.4) zawieszano w buforze HisA (Materiały 3.8) z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100, dodawano lizozymu w stosunku 1:100 (bufor : lizozym 0,1 mg/ml) oraz 250 U nukleazy Viscolase (Materiały 3.3). Przy nadprodukcji w małej skali osad zawieszano w 5 ml, a w dużej skali w 15 ml buforu. Zawiesinę inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 30°C przez 30 min, a następnie schładzano ją na lodzie przez 10 min. Następnie poddawano ją dezintegracji poprzez sonikację w 5 cyklach (30 s sonikacji i 60 s przerwy) przy pomocy homogenizatora ultradźwiękowego (Bandelin, Niemcy). Z zawiesiny pobierano 50 μ l próbki do późniejszego wykorzystania w analizie elektroforetycznej, a resztę zawiesiny wirowano (30 min, 4°C, 20000xg). Supernatant (supernatant 1 – S1) zlewano do sterylnej 50 ml probówki, a osad zawieszano w buforze HisA

(Materiały 3.8) z dodatkiem 10% sarkozyłu, 1% Tritonu X-100 i 1 mM EDTA. Zawiesinę inkubowano w 4°C z mieszaniem przez 14-16 h, po tym czasie wirowano ją (30 min, 4°C, 20000xg) i zlewano supernatant (supernatant 2 – S2) do sterylnej probówki. Próbkę zawiesiny oraz obu supernatantów poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2). Na podstawie wyników elektroforezy wyznaczano sposób uwalniania białka z komórek bakteryjnych.

4.5. Oczyszczanie chromatograficzne

4.5.1. Przygotowanie próbek białkowych do oczyszczania

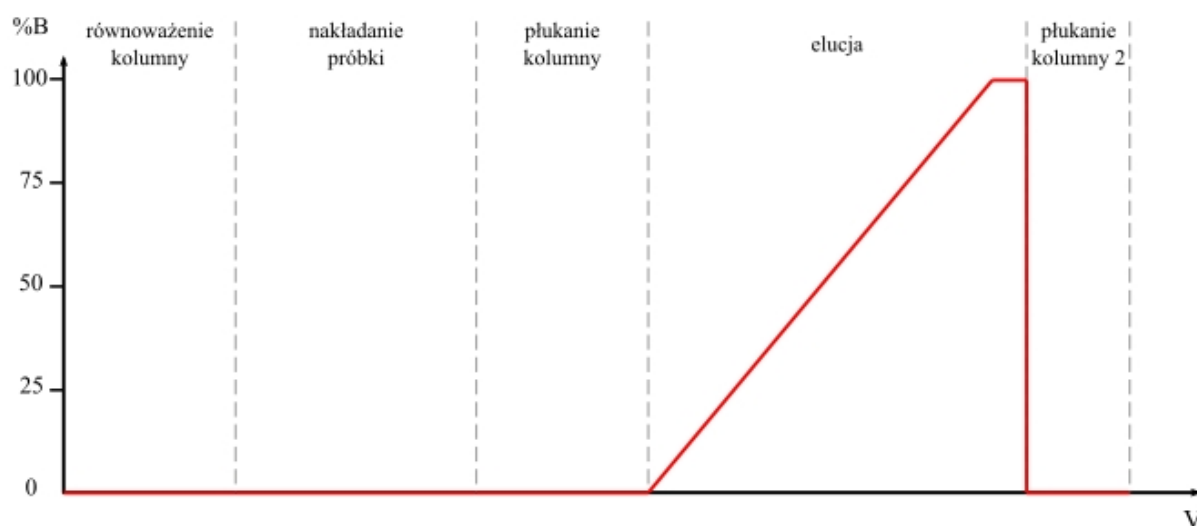
Proces przygotowania był zależny od długości procedury uwalniania (Metody 4.4.5). Jeżeli białko występowało w całości lub w znacznej większości w supernatancie 1, próbkę filtrowano przez filtr strzykawkowy 0,45 µm. Natomiast gdy białko występowało dopiero w supernatancie 2, przed filtracją należało rozcieńczyć próbkę. W przypadku chromatografii metalopowinowactwa (Metody 4.5.2) próbkę rozcieńczano 8-krotnie za pomocą buforu HisA (Materiały 3.8) i łączono z supernatantem 1. W przypadku oczyszczania próbek na kolumnie jonowymiennej (Metody 4.5.3) konieczne było 10-krotne rozcieńczenie próbki buforem JonA (Materiały 3.8). Rozcieńczone preparaty filtrowano za pomocą zestawu do filtracji ciśnieniowej z membraną o wielkości porów 0,45 µm.

4.5.2. Chromatografia metalopowinowactwa

Odpowiednio przygotowany preparat białkowy (Metody 4.5.1) oczyszczano przy użyciu kolumny EconoFit Profinity IMAC o objętości 5 ml (BioRad, USA) podłączonej do systemu chromatograficznego NGC Quest 10 Plus (BioRad, USA). Kolumnę przed nałożeniem preparatu równoważono buforem HisA (Materiały 3.8). Następnie nakładano próbkę i płukano kolumnę 25 ml buforu HisA (Materiały 3.8), w celu pozbycia się niespecyficznie związanych z kolumną białek. Elucja następowała przy gradientowym wzroście stężenia imidazolu od buforu HisA (5 mM imidazolu), do buforu HisB (300 mM imidazolu) (Materiały 3.8), w jej trakcie zbierano frakcje o objętości 2 ml. Na koniec kolumnę ponownie płukano buforem HisA (Materiały 3.8). Schemat procesu oczyszczania uwzględniający zawartość procentową

buforu HisB (%B) w poszczególnych etapach przedstawiono na rysunku 12. Cały proces oczyszczania kontrolowano rejestrując sygnał absorbancji przy długości fali 215, 260 i 280 nm oraz wartości przewodności. Na podstawie zarejestrowanych sygnałów wybrano próbki do analizy elektroforetycznej w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2).

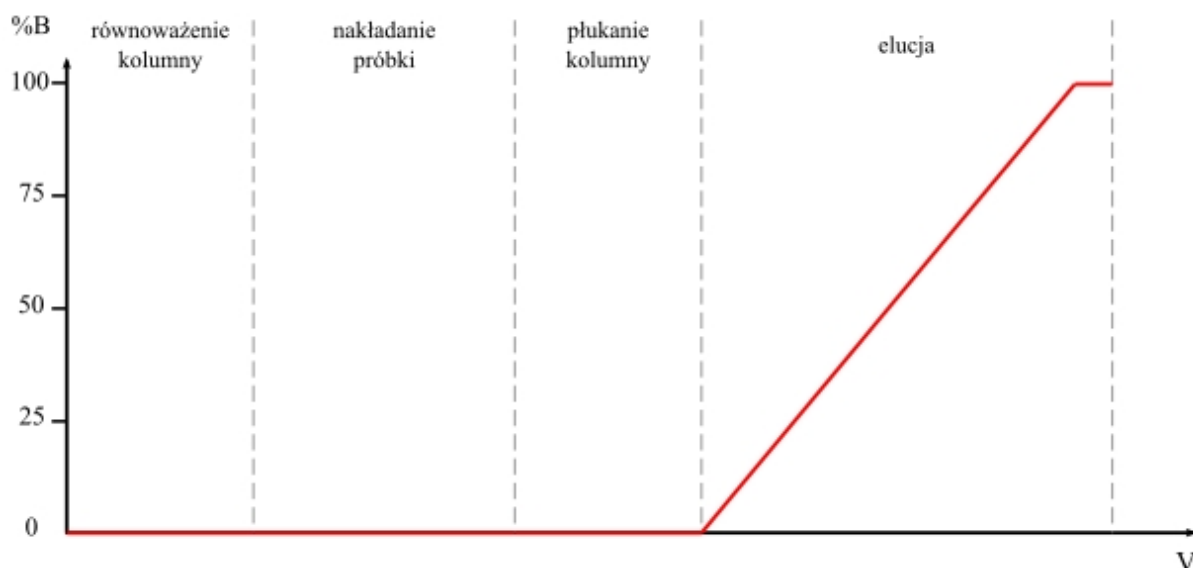
Po procesie oczyszczania białka kolumnę czyszczono poprzez płukanie kolejno 25 ml wody, 20 ml buforu Stripping (Materiały 3.8), 20 ml 0,5 M roztworu wodorotlenku sodu i 25 ml wody. Następnie regenerowano ją poprzez nałożenie 25 ml 0,1 M roztworu chlorku niklu, którego nadmiar wypłukiwano 20 ml wody, a kolumnę równoważono 25 ml buforu HisA (Materiały 3.8). Do przechowywania kolumnę zalewano 20% roztworem etanolu.



Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie procesu oczyszczania metodą metalopowinowactwa, uwzględniające zawartość procentową buforu HisB (%B) w poszczególnych etapach.

4.5.3. Chromatografia jonowymienna

Odpowiednio przygotowany preparat białkowy (Metody 4.5.1) oczyszczono przy użyciu kolumny HiTrap Heparin HP o objętości 1 ml (Cytiva, USA) podłączonej do systemu chromatograficznego NGC Quest 10 Plus (BioRad, USA). Kolumnę przed nałożeniem preparatu równoważono buforem JonA (Materiały 3.8). Następnie nakładano próbkę i płukano kolumnę 5 ml buforu JonA (Materiały 3.8), w celu pozbycia się niespecyficznie związanych z kolumną białek. Elucja następowała przy gradientowym wzroście stężenia chlorku potasu od buforu JonA (50 mM KCl), do buforu JonB (2 M KCl) (Materiały 3.8), w jej trakcie zbierano frakcje o objętości 2 ml. Schemat procesu oczyszczania uwzględniający zawartość procentową buforu JonB (%B) w poszczególnych etapach przedstawiono na rysunku 13. Cały proces oczyszczania kontrolowano rejestrując sygnał absorbancji przy długości fali 215, 260 i 280 nm oraz wartości przewodności. Na podstawie zarejestrowanych sygnałów wybierano próbki do analizy elektroforetycznej w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2). Po procesie oczyszczania kolumnę regenerowano poprzez ponownie płukanie buforem JonA (Materiały 3.8). Do długotrwałego przechowywania kolumnę zalewano 20% roztworem etanolu.



Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie procesu oczyszczania metodą jonowymienną, uwzględniające zawartość procentową buforu JonB (%B) w poszczególnych etapach.

4.5.4. Chromatografia grawitacyjna na złożu ssDNA-celuloza

Preparat białkowy po oczyszczaniu na kolumnie metalopowinowactwa (Metody 4.5.2) i odsoleniu (Metody 4.5.5), poddawano dodatkowemu procesowi oczyszczania na złożu ssDNA-celuloza (Worthington, USA). Złoże przed nałożeniem preparatu zrównoważono buforem CelA (Materiały 3.8). Następnie nakładano próbkę i płukano kolumnę buforem CelA (Materiały 3.8), w celu pozbycia się niespecyficznie związanych białek z kolumną. Elucja następowała podczas płukania kolumny trzema kolejnymi buforami: 25 ml buforu CelB, 25 ml CelC i 25 ml CelD (Materiały 3.8). Z każdej zebranej frakcji pobierano próbki do analizy elektroforetycznej w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2). Na koniec kolumnę regenerowano płuczając ją buforem CelA, a do długotrwałego przechowywania kolumnę zalewano buforem Cel0 (Materiały 3.8).

4.5.5. Odsalanie preparatów białkowych

Frakcje zawierające badane białko po oczyszczaniu na kolumnie chromatografii metalopowinowactwa (Metody 4.5.2), jonowymiennej (Metody 4.5.3) lub ze złożem ssDNA-celuloza (Metody 4.5.4) łączono i odsalano przy użyciu 10 ml kolumny Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 (BioRad, USA) podłączonej do systemu chromatograficznego NGC Quest 10 Plus (BioRad, USA). Kolumnę przed nałożeniem preparatu równoważono buforem DesA (Materiały 3.8). Następnie nakładano próbkę i eluowano białko buforem DesA (Materiały 3.8). Cały proces odsalania kontrolowano rejestrując sygnał absorbancji przy długości fali 215, 260 i 280 nm oraz wartości przewodności. Na podstawie zarejestrowanych sygnałów wybierano próbki do analizy elektroforetycznej w warunkach denaturujących (Metody 4.2.2). Po procesie oczyszczania kolumnę regenerowano poprzez ponownie płukanie buforem DesA (Materiały 3.8). Do długotrwałego przechowywania kolumnę zalewano wodą.

4.5.6. Odsalanie preparatów białkowych poprzez dializę

Fracje zawierające badane białko po oczyszczaniu na kolumnie chromatografii metalopowinowactwa (Metody 4.5.2) lub jonowymiennej (Metody 4.5.3) łączono i napełniano nimi celulozowe worki dializacyjne. Worki umieszczano w 2 l sterylnej zlewce z 600-800 ml buforu DesB (Materiały 3.8) z 10-50% dodatkiem glicerolu oraz elementem mieszającym. Zlewkę przykrywano folią aluminiową i umieszczano w 4°C na mieszadle magnetycznym, zawartość mieszano. Proces prowadzono przez 16-21 h, wymieniając bufor najpierw po 2-2,5 h, później po 12-16 h i na końcu po kolejnych 2-2,5 h. Po tym czasie zawartość worków dializacyjnych zlewano, a gdy wytrącił się osad zawiesinę filtrowano. Pobierano próbki przed dializą, po dializie i po filtrowaniu, a następnie poddawano je analizie elektroforetycznej w warunkach denaturujących, w celu oszacowania ilości strat białka przez wytrącenie.

4.6. Preparaty białkowe

4.6.1. Przygotowanie preparatów białkowych do przechowywania długoterminowego

Odsolone preparaty białkowe za pomocą kolumny (Metody 4.5.5) lub dializy (Metody 4.5.6) zagęszczano za pomocą koncentratora wirówkowego Amicon Ultra-15 (Millipore, USA), dobierając wielkość porów membrany do wielkości białka, zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie mierzono absorbancję próbki przy długości fali 280 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Aby zwiększyć trwałość przechowywanych preparatów dodawano 100% sterylne glicerolu w stosunku objętościowym 1:1 oraz DTT i EDTA do końcowego stężenia odpowiednio 1 mM i 0,1 mM. Tak zabezpieczone preparaty przechowywano w -20°C do dalszych badań. Na podstawie zmierzonej absorbancji oraz wyliczonego współczynnika ekstynkcji wyliczano stężenie białka w preparacie, korzystając ze wzoru 1.

$$c = \frac{A_{280}}{2\epsilon} \quad (1)$$

c – stężenie preparatu białkowego [mg/ml];

A_{280} – wartość absorbancji przy długości fali 280 nm;

ϵ – współczynnik ekstynkcji wyznaczony na podstawie sekwencji aminokwasowej badanego białka [ml/mg].

4.6.2. Czystość preparatów białkowych

Uzyskane preparaty białkowe sprawdzano pod kątem zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi. W tym celu nakładano $\sim 2 \mu\text{g}$ białka lub $5 \mu\text{l}$ preparatu białkowego na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1). Na podstawie wyników elektroforezy określano poziom zanieczyszczenia białek przez kwasy nukleinowe.

4.7. Charakterystyka polimeraz

4.7.1. Wyznaczanie jednostek aktywności

Do wyznaczenia jednostek aktywności wykorzystano zestaw EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) oraz termocykler real-time (BioRad, USA). Postępując zgodnie z instrukcją przygotowano szereg reakcji z kolejnymi rozcieńczeniami badanych polimeraz oraz reakcję kontrolną nie zawierającą polimerazy, każde w 3 powtórzeniach. Reakcję prowadzono w 37°C (dla wariantów z polimerazą Bsu) lub 30°C (dla wariantów z polimerazą Phi29) odczytując wartość sygnału fluorescencji co 60 s, przez 3-6 h. Na podstawie pomiarów możliwe było wyznaczenie stycznej do odcinka linowego wykresu oraz wyliczenie jednostek aktywności korzystając ze wzoru 2. Zakładając, że 1 U polimerazy przyłącza n nukleotydów w czasie t w zadanej temperaturze.

$$u = \frac{\Delta F(t)}{\Delta F_{max}} \cdot \frac{0,27}{n} \cdot R \quad (2)$$

u – ilość jednostek aktywności w $1 \mu\text{l}$ badanego preparatu białkowego [U/ μl];

t - czas ($t=30$ dla Bsu i $t=15$ dla Phi29) [min];

$\Delta F(t)$ – różnica wartości stycznej dla czasu t oraz wartości sygnału fluorescencji dla reakcji kontrolnej;

ΔF_{max} – różnica wartości sygnału fluorescencji dla fazy plateau reakcji oraz wartości sygnału fluorescencji dla reakcji kontrolnej;

0,27 – stała wyznaczona przez producenta zestawu [nmol];

n – ilość nukleotydów jaką 1 U polimerazy jest w stanie dołączyć w czasie t trwania reakcji w zadanej temperaturze ($n=10$ dla Bsu i $n=0.5$ dla Phi29) [nmol];

R – rozcieńczenie preparatu białkowego.

4.7.2. Wyznaczenie zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych

Testy wiązania różnych form kwasów nukleinowych przeprowadzono za pomocą metody EMSA (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Sprawdzano możliwość wiązania ssDNA (dT76 znakowane fluorescencyjnie 0,5 μ M), dsDNA (100 ng produktu PCR o długości 330 pz), plazmidowego DNA (100 ng pUC19), genomowego DNA (85 ng DNA genomowego z *Bacillus subtilis* 168) oraz całkowitego RNA (500 ng całkowitego RNA z *Saccharomyces cerevisiae* BY4742). Do roztworu z badanym kwasem nukleinowym w buforze DesA (Materiały 3.8) dodawano zwiększającą się ilość badanej polimerazy (0-15 U). Gotową mieszaninę wirowano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. Po zakończeniu reakcji mieszaninę nakładano na żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny: 1% (dla plazmidowego i genomowego DNA), 1,5% (dla ssDNA i dsDNA) oraz 2% (dla RNA) i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1). Na podstawie wyników elektroforezy określano zdolność wiązania różnych form kwasów nukleinowych, poprzez obserwację opóźnienie ich migracji w żelu.

4.8. Amplifikacja izotermiczna DNA

4.8.1. Reakcja amplifikacji toczącego się koła (RCA)

Mieszaninę reakcyjną do amplifikacji izotermicznej DNA przygotowano zgodnie z opisem w tabeli 10.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji amplifikacji toczącego się koła (RCA).

Nazwa	Stężenie	Ilość [μ l]
Bufor reakcyjny	10x	2 μ l
Losowe oligonukleotydy o długości 6 nt	50 μ M	1 μ l
dNTP	8 mM	2,5 μ l
pUC19	-	1 ng
Woda	-	Uzupełnić do 20-x μ l
Polimeraza	-	x

Początkowo mieszaninę reakcyjną nie zawierającą polimerazy denaturowano w 95°C przez 5 min, po czym szybko przenoszono na lód. Następnie dodawano polimerazę i prowadzono reakcję w 30°C przez 16-20 h w termocyklerze VeritiPro (Applied Biosystems, USA). Po tym czasie dezaktywowano polimerazę poprzez inkubację w 65°C przez 10 min. Następnie do mieszaniny dodawano buforu obciążającego, nakładano na 1% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1).

4.8.2. Reakcja izotermicznej amplifikacji DNA oparta o białko gp32

Mieszaninę reakcyjną do amplifikacji izotermicznej DNA przygotowano zgodnie z opisem w tabeli 11, a startery używane w reakcji przedstawiono w rozdziale Materiały 3.10 w tabeli 5.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej do izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32.

Nazwa	Stężenie	Ilość [μl]
Tris-octan pH 7,9	1 M	1 μl
Octan potasu	1 M	1 μl
Octan magnezu	280 mM	1 μl
DTT	1 M	0,04 μl
dNTP	8 mM	1 μl
Starter F6-32	10 mM	1 μl
Starter R2-31	10 mM	1 μl
Białko gp32	-	x μg
Polimeraza	-	y U
ssDNA M13	-	z ng
Woda	-	Uzupełnić do 20 μl

Reakcję prowadzono w 40°C w termocyklerze VeritiPro bez grzania pokrywy (Applied Biosystems, USA). Ilości białka gp32, polimerazy i matrycy oraz czas trwania reakcji optymalizowano dla każdej badanej polimerazy (Metody 4.9.1, 4.9.2, 4.9.4 i 4.9.3). Po zakończeniu reakcji mieszaninę nakładano na 1% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 4.2.1). Kluczowe do poprawnego zajścia reakcji było dodanie octanu magnezu na sam koniec, tuż przed inkubacją.

4.9. Optymalizacja izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32

4.9.1. Ilość białka gp32

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2 przez 40 min, dodając 7,5 U badanej polimerazy, 100 ng matrycy ssDNA M13 oraz zwiększające się ilości białka gp32 (0,6-3,9 µg). Na podstawie analizy wyników elektroforezy, wyznaczono optymalną ilość białka gp32 potrzebną do zajścia reakcji dla badanej polimerazy.

4.9.2. Ilość polimerazy

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2 przez 40 min, dodając wyznaczoną wcześniej optymalną ilość białka gp32 (Metody 4.9.1), 100 ng matrycy ssDNA M13 oraz zwiększające się ilości badanej polimerazy (0,5-7,5 U). Na podstawie analizy wyników elektroforezy, wyznaczono minimalną ilość polimerazy potrzebną do zajścia reakcji oraz jej optymalną ilość.

4.9.3. Czas reakcji

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2, dodając wyznaczoną wcześniej optymalną ilość białka gp32 (Metody 4.9.1), optymalną ilość polimerazy (Metody 4.9.2) oraz 100 ng matrycy ssDNA M13. Reakcję prowadzono w czasie 10-90 min. Na podstawie analizy wyników elektroforezy wyznaczono minimalny czas potrzebny do zajścia reakcji oraz optymalny czas dla badanej polimerazy.

4.9.4. Ilość matrycy

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2, dodając wyznaczoną wcześniej optymalną ilość białka gp32 (Metody 4.9.1), optymalną ilość polimerazy (Metody 4.9.2) oraz zwiększające się ilości matrycy ssDNA M13 (25-100 ng). Reakcję prowadzono w wyznaczonym wcześniej optymalnym czasie prowadzenia reakcji (Metody 4.9.3). Na podstawie analizy wyników elektroforezy

wyznaczono minimalną ilość matrycy potrzebną do zajścia reakcji (czułość polimerazy) oraz optymalną ilość matrycy dla badanej polimerazy.

4.10. Właściwości charakteryzujące polimerazy DNA

4.10.1. Zakres temperaturowy reakcji

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2, w wyznaczonych wcześniej optymalnych warunkach (Metody 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3 i 4.9.4). Reakcję prowadzono w zakresie temperatur 20-60°C. Na podstawie analizy wyników elektroforezy wyznaczono zakres temperatury w jakim badana polimeraza przeprowadza reakcję.

4.10.2. Wyznaczenie stabilności polimerazy DNA

Przed reakcją badaną polimerazę inkubowano w 55 lub 60°C przez 0-60 min. Następnie reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2, w wyznaczonych wcześniej optymalnych warunkach (Metody 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3 i 4.9.4). Na podstawie analizy wyników elektroforezy określano stabilność badanej polimerazy w podwyższonej temperaturze.

4.10.3. Wyznaczenie tolerancji polimeraz na inhibitory reakcji amplifikacji

Reakcję przeprowadzono według instrukcji z opisu metody 4.8.2, w wyznaczonych wcześniej optymalnych warunkach (Metody 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3 i 4.9.4). Dodano również zwiększające się ilości inhibitorów reakcji amplifikacji. Badanymi inhibitorami były: heparyna (0-3 µg), laktoferyna (0-10 µg), mocznik (0-2 M) oraz kwas humusowy (0-1 µg). Na podstawie analizy wyników elektroforezy wyznaczono zakres tolerancji na badany inhibitor dla badanej polimerazy.

Rozdział 5

Wyniki

Opis wyników podzielono na trzy części. W pierwszej zatytułowanej „Tworzenie konstruktów genetycznych”, przedstawiono proces ich otrzymywania uwzględniający projektowanie białek fuzyjnych i referencyjnych oraz etapy klonowanie. W drugiej części – pt. „Otrzymywanie preparatów białkowych polimeraz DNA i białka gp32”, zaprezentowano wyniki optymalizacji nadprodukcji oraz oczyszczania białek wraz z określeniem czystości i stężenia preparatów białkowych. W ostatniej części opisano badanie właściwości uzyskanych białek, w tym wyznaczanie jednostek aktywności polimeraz, zdolność wiązania różnych form kwasów nukleinowych, optymalizację warunków izotermicznej amplifikacji DNA, wpływ temperatury oraz tolerancję na obecność inhibitorów amplifikacji w mieszaninie reakcyjnej.

5.1. Tworzenie konstruktów genetycznych

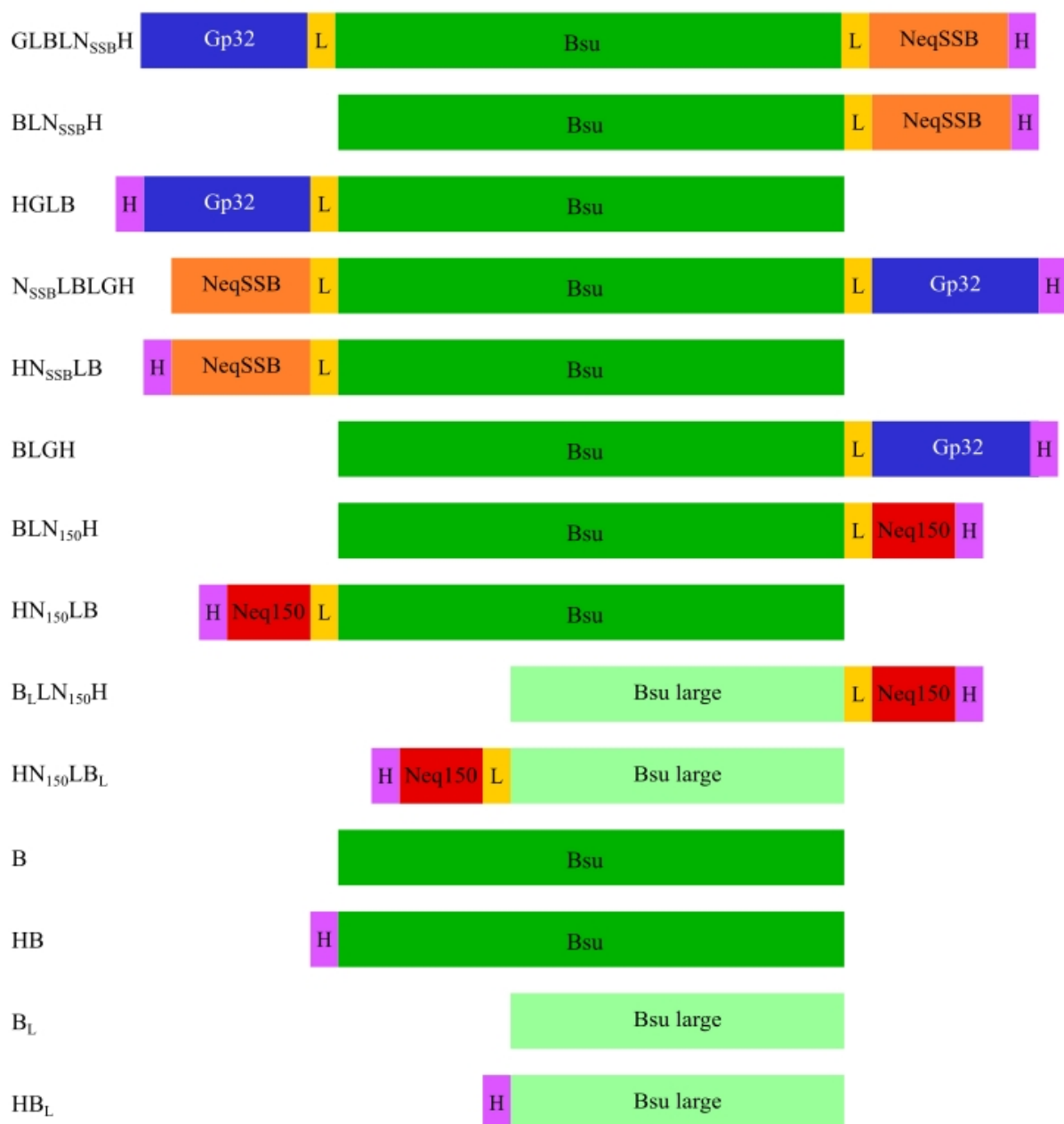
5.1.1. Projektowanie konstruktów genetycznych

Połączenie polimerazy DNA z partnerem fuzyjnym, będącym białkiem wiążącym DNA ma na celu między innymi zmianę sposobu oddziaływania fuzyjnej polimerazy z matrycą DNA, w wyniku czego dochodzi do poprawy właściwości takich jak np. czułość czy efektywność amplifikacji DNA. Do stworzenia nowych fuzyjnych polimeraz zdecydowano wykorzystać dwie polimerazy – Bsu z *B. subtilis* (GenBank NC_000964.3 region 2973182-2975824) i Phi29 z bakteriofaga Φ 29 (GenBank NC_011048.1 region 1145-2863), oraz trzy białka wiążące DNA – gp32 z faga T4 (GenBank NC_000866.4 region 146948-147853), NeqSSB z *N. equitans* (GenBank AE017199.1 region 179657-180388) oraz Neq150 również z *N. equitans* (GenBank

AE017199.1 region 137072-137365). Oprócz wariantów fuzyjnych przygotowano również odpowiednie konstrukty genowe dla białek referencyjnych. W projektowanych wariantach do połączenia polimerazy z białkiem pomocniczym zastosowano sześćioaminokwasowy łącznik, który był już wcześniej używany w podobnym celu [129, 133]. Dodatkowo do białka pomocniczego dołączono znacznik His-tag złożony z 6 reszt histydynowych, który umożliwia oczyszczanie z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa. Sekwencje aminokwasowe wszystkich powyżej wymienionych białek, łącznika oraz znacznika His-tag przedstawiono w załącznikach A1-A8.

Wszystkie zaprojektowane białka z polimerazą Bsu przedstawiono w formie schematu blokowego na rysunku 14. Początkowo skupiono się na otrzymaniu białek fuzyjnych obejmujących pełną sekwencję polimerazy Bsu z białkami gp32 i NeqSSB. Dwa z tych wariantów to fuzje z dwoma partnerami fuzyjnymi – GLBLN_{SSB}H z gp32 na N-końcu i NeqSSB na C-końcu oraz N_{SSB}LBLGH – NeqSSB na N-końcu i gp32 na C-końcu. Pozostałe warianty fuzyjne polimerazy Bsu posiadają jednego partnera białkowego – NeqSSB na C-końcu (BLN_{SSB}H) i N-końcu (HN_{SSB}LB) oraz gp32 na N-końcu (HGLB) i C-końcu (BLGH). Następnie, ze względu na uzyskane przez zespół wyniki dotyczące wiązania kwasów nukleinowych przez białko Neq150 [144], zaprojektowano również dwa warianty z białkiem Neq150 – BLN₁₅₀H i HN₁₅₀LB, które zostały wykorzystane do realizacji pracy magisterskiej Pani inż. Julii Szumskiej, której jestem opiekunem naukowym. Dodatkowo zaprojektowano dwa fuzyjne warianty z dużą podjednostką polimerazy Bsu (Bsu large) i białkiem Neq150 – B_LLN₁₅₀H i HN₁₅₀LB_L. Oprócz białek fuzyjnych zaprojektowano też cztery białka referencyjne – polimerazę Bsu (B), polimerazę Bsu ze znacznikiem His-tag na N-końcu (HB), polimerazę Bsu large (B_L) oraz polimerazę Bsu large ze znacznikiem His-tag na N-końcu (HB_L). Łącznie zaprojektowano 10 fuzyjnych i 4 referencyjne polimerazy Bsu.

Na podstawie zaprojektowanych sekwencji nukleotydowych określono długość sekwencji kodującej zmodyfikowane białko. Obliczono również teoretyczną masę cząsteczkową białka i jego punkt izoelektryczny za pomocą narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy (Materiały 3.11.2). Parametry te zestawiono w tabeli 12.



Rysunek 14. Schemat blokowy zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Bsu. B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

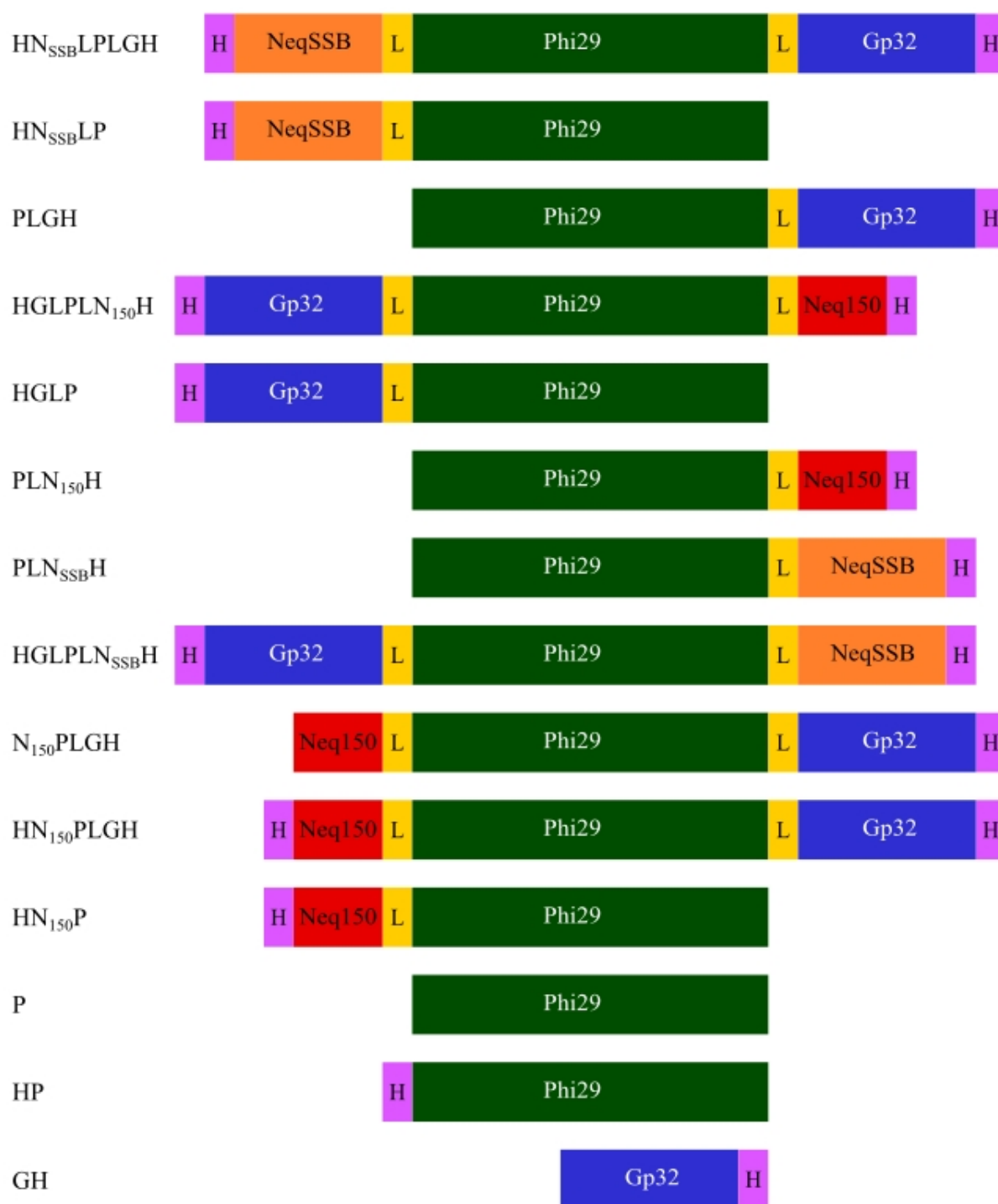
Tabela 12. Podstawowe parametry zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Bsu.

Wariant	Długość sekwencji kodującej białko [nt]	Teoretyczna masa cząsteczkowa białka [kDa]	pI [-]
GLBLN _{SSB} H	4323	161,87	5,32
BLN _{SSB} H	3405	128,04	5,52
HGLB	3579	133,76	5,1
N _{SSB} LBLGH	4323	161,87	5,32
HN _{SSB} LB	3405	128,04	5,52
BLGH	3579	133,76	5,1
BLN ₁₅₀ H	2967	112,03	5,48
HN ₁₅₀ LB	2967	112,03	5,48
B _L LN ₁₅₀ H	2076	78,89	5,89
HN ₁₅₀ LB _L	2076	78,89	5,89
B	2643	98,98	5,1
HB	2661	99,8	5,22
B _L	1749	65,95	5,24
HB _L	1773	66,79	5,46

Teoretyczne masy cząsteczkowe białek oraz punkty izoelektryczne zostały wyznaczone na podstawie sekwencji aminokwasowej białek, z wykorzystaniem narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy. B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Na rysunku 15 przedstawiono schematy blokowe białek z polimerazą Phi29 oraz schemat białka gp32. Zaprojektowano je analogicznie do powyżej opisanych fuzji z polimerazą Bsu. Podwójne fuzje z: NeqSSB na N-końcu i gp32 na C-końcu – HN_{SSB}LPLGH, gp32 na N-końcu i Neq150 na C-końcu – HGLPLN₁₅₀H, gp32 na N-końcu i NeqSSB na C-końcu – HGLPLN_{SSB}H oraz Neq150 na N-końcu i gp32 na C-końcu – N₁₅₀LPLGH i HN₁₅₀LPLGH, różniące się od siebie ilością znacznika His-tag. Pojedyncze fuzje NeqSSB na N-końcu – HN_{SSB}LP i C-końcu – PLN_{SSB}H, gp32 na N-końcu – HGLP i C-końcu – PLGH, Neq150 na N-końcu – HN₁₅₀LP i C-końcu – PLN₁₅₀H. Zaprojektowano też polimerazy referencyjne – polimerazę Phi29 (P) oraz polimerazę Phi29 ze znacznikiem His-tag na N-końcu (HP). Łącznie zaplanowano 11 fuzyjnych i 2 referencyjne białka z polimerazą Phi29 oraz białko gp32 ze znacznikiem His-tag na C-końcu (GH).

Na podstawie zaprojektowanych sekwencji nukleotydowych określono długość sekwencji kodującej zmodyfikowane białko. Obliczono również teoretyczną masę cząsteczkową białka i jego punkt izoelektryczny za pomocą narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy (Materiały 3.11.2). Parametry te zestawiono w tabeli 13.



Rysunek 15. Schemat blokowy zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Phi29 i białka gp32. P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Tabela 13. Podstawowe parametry zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Phi29 i białka gp32.

Wariant	Długość sekwencji kodującej białko [nt]	Teoretyczna masa cząsteczkowa białka [kDa]	pI [-]
HN _{SSB} LPLGH	3426	130,42	7,74
HN _{SSB} LP	2490	95,77	8,88
PLGH	2664	101,49	6,56
HGLPLN ₁₅₀ H	2988	114,43	7,77
HGLP	2664	101,49	6,56
PLN ₁₅₀ H	2052	79,77	8,97
PLN _{SSB} H	2490	95,77	8,84
HGLPLN _{SSB} H	3426	130,42	7,53
N ₁₅₀ LPLGH	2970	111,82	7,95
HN ₁₅₀ LPLGH	2988	114,41	7,77
HN ₁₅₀ LP	2052	79,77	8,97
P	1728	66,83	8,76
HP	1746	67,66	8,76
GH	924	34,3	5,18

Teoretyczne masy cząsteczkowe białek oraz punkty izoelektryczne zostały wyznaczone na podstawie sekwencji aminokwasowej białek, z wykorzystaniem narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy. P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Cztery z zaprojektowanych konstruktów (GLBLN_{SSB}H, N_{SSB}LBLGH, HN_{SSB}LPLGH i HGLPLN₁₅₀H) zamówiono w firmie Invitrogen, w celu syntezy sekwencji nukleotydowej zoptymalizowanej pod kątem preferencji kodonowych gospodarza docelowego *E. coli*. Dodatkowo usunięto miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne wykorzystywane do klonowania. Zmodyfikowane sekwencje posłużyły również jako matryca DNA do tworzenia pozostałych zaprojektowanych konstruktów genetycznych.

5.1.2. Klonowanie genów kodujących polimerazy DNA i białko gp32

Pozostałe zaprojektowane konstrukty otrzymano metodą klonowania Gibsona (Metody 4.4.3). Warianty, których sekwencja zawierała się w czterech zamówionych konstruktach, uzyskano poprzez klonowanie z użyciem jednej wstawki. Były to warianty BLN_{SSB}H, HGLB, HN_{SSB}LB, BLGH, HN_{SSB}LP, PLGH, HGLP, PLN₁₅₀H, HN₁₅₀LP oraz wszystkie białka referencyjne i białko gp32. Pozostałe warianty (PLN_{SSB}H, HGLPLN_{SSB}H, N₁₅₀LPLGH, HN₁₅₀LPLGH, BLN₁₅₀H, HN₁₅₀LB, B_LLN₁₅₀H oraz HN₁₅₀LB_L) uzyskano klonując z użyciem dwóch wstawek. Sekwencje starterów wykorzystywanych do otrzymania wstawek przedstawiono w rozdziale Materiały 3.10 w tabeli 4. Poniżej w tabeli 14 zestawiono pary starterów oraz wielkości dla poszczególnych wstawek. W przypadku wariantów składających się z jednej wstawki, nazwa wariantu jest tożsama z nazwą wstawki. Natomiast dla wariantów składających się z dwóch wstawek, do nazwy wariantu dopisano numer wstawki.

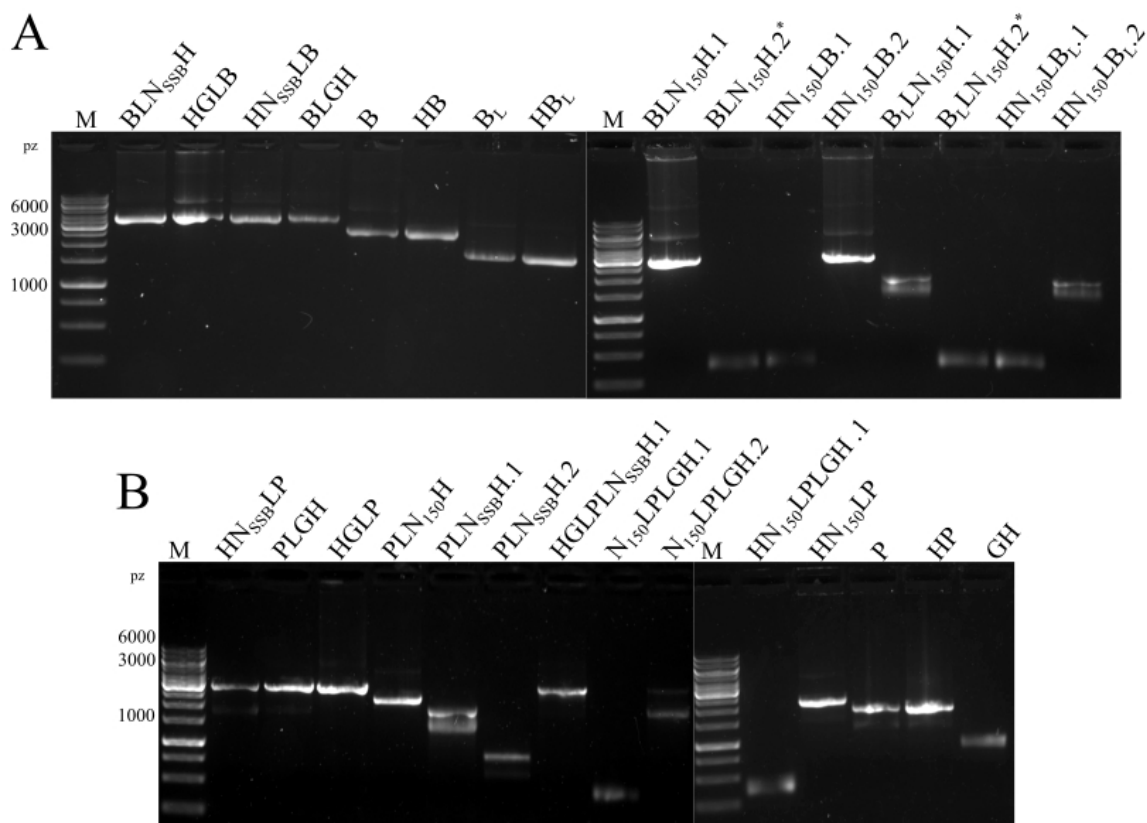
Tabela 14. Tabelaaryczne zestawienie par starterów wykorzystywanych do uzyskania odpowiednich wstawek do klonowania metodą Gibsona oraz ich wielkości.

Nazwa wstawki	Wariant	Starter Forward	Starter Reverse	Wielkość wstawki [pz]
BLN _{SSB} H	BLN _{SSB} H	pET.B.O.F	pET.HN.O.R	3472
HGLB	HGLB	pET.HG.O.F	pET.B.O.R	3646
HN _{SSB} LB	HN _{SSB} LB	pET.HN.O.F	pET.B.O.R	3472
BLGH	BLGH	pBAD.B.O.F	pBAD.HG.O.R	3648
BLN ₁₅₀ H.1	BLN ₁₅₀ H	pET.B.O.F	R-N150LB	2690
BLN ₁₅₀ H.2*		F-BLN150	pET.HN150.O.R	375
HN ₁₅₀ LB.1	HN ₁₅₀ LB	pET.HN150.O.F	N150.O.R	341
HN ₁₅₀ LB.2		F-N150LB	pET.B.O.R	2728
B _L LN ₁₅₀ H.1	B _L LN ₁₅₀ H	pET.BL.O.F	R-N150LB	1802
B _L LN ₁₅₀ H.2*		F-BLN150	pET.HN150.O.R	375
HN ₁₅₀ LB _L .1	HN ₁₅₀ LB _L	pET.HN150.O.F	R-BLLN150	371
HN ₁₅₀ LB _L .2		F-N150LBL	pET.B.O.R	1805
B	B	pET.B.O.F	pET.B.O.R	2710
HB	HB	pET.HB.O.F	pET.B.O.R	2728

Nazwa wstawki	Wariant	Starter Forward	Starter Reverse	Wielkość wstawki [pz]
B _L	B _L	pET.BL.O.F	pET.B.O.R	1822
HB _L	HB _L	pET.HBL.O.F	pET.B.O.R	1840
HN _{SSB} LP	HN _{SSB} LP	pET.HN.O.F	pET.P.O.R	2557
PLGH	PLGH	pET.P.O.F	pET.HG.O.R	2731
HGLP	HGLP	pET.HG.O.F	pET.P.O.R	2731
PLN ₁₅₀ H	PLN ₁₅₀ H	pET.P.O.F	pET.HN150.O.R	2119
PLN _{SSB} H.1	PLN _{SSB} H	pET.P.O.F	NLP.O.R	1810
PLN _{SSB} H.2**		PLN.O.F	pET.HN.O.R	782
HGLPLN _{SSB} H.1	HGLPLN _{SSB} H	pET.HG.O.F	NLP.O.R	2746
HGLPLN _{SSB} H.2**		PLN.O.F	pET.HN.O.R	782
N ₁₅₀ LPLGH.1	N ₁₅₀ LPLGH	pET.N150.O.F	N150.O.R	323
N ₁₅₀ LPLGH.2***		N150LP.O.F	pET.HG.O.R	2749
HN ₁₅₀ LPLGH.1	HN ₁₅₀ LPLGH	pET.HN150.O.F	N150.O.R	341
HN ₁₅₀ LPLGH.2***		N150LP.O.F	pET.HG.O.R	2749
HN ₁₅₀ LP	HN ₁₅₀ LP	pET.HN150.O.F	pET.P.O.R	2119
P	P	pET.P.O.F	pET.P.O.R	1795
HP	HP	pET.HP.O.F	pET.P.O.R	1813
GH	GH	pET.G.O.F	pET.HG.O.R	978

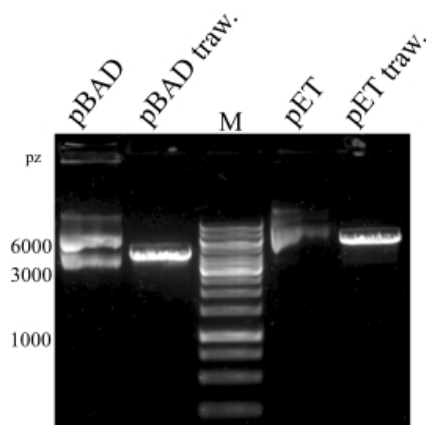
* – tożsame wstawki BLN₁₅₀H.2 i B_LLN₁₅₀H.2; ** – tożsame wstawki PLN_{SSB}H.2 i HGLPLN_{SSB}H.2; *** – tożsame wstawki N₁₅₀LPLGH.2 i HN₁₅₀LPLGH.2; B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Startery zaprojektowano w taki sposób, aby pary wariantów BLN₁₅₀H i B_LLN₁₅₀H, PLN_{SSB}H i HGLPLN_{SSB}H oraz N₁₅₀LPLGH i HN₁₅₀LPLGH, mogły być otrzymane z wykorzystaniem jednej wspólnej wstawki. W celu zachowania czytelności, a zarazem oznaczenia tożsamych wstawek w tabeli 14 wstawki BLN₁₅₀H.2 i B_LLN₁₅₀H.2 oznaczono jedną gwiazdką (*), PLN_{SSB}H.2 i HGLPLN_{SSB}H.2 – dwoma gwiazdkami (**) oraz N₁₅₀LPLGH.2 i HN₁₅₀LPLGH.2 – trzema gwiazdkami (***). Wszystkie wstawki otrzymano i przedstawiono na rysunku 16.



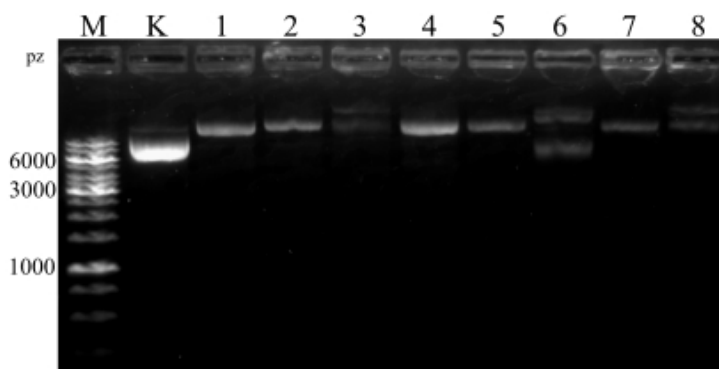
Rysunek 16. Analiza wielkości wstawek DNA wykorzystywanych do klonowania, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – wstawki do klonowania wariantów polimerazy Bsu; B – wstawki do klonowania wariantów polimerazy Phi29 oraz białka gp32. M – marker SM0311 (Materiały 3.5). * – tożsame wstawki BLN₁₅₀H.2 i B_LLN₁₅₀H.2; B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Do klonowania potrzebny był również zlinearyzowany wektor. W przypadku wariantu BLGH użyto plazmidu pBAD/Myc-His A trawionego enzymami FastDigest NcoI i FastDigest SalI (Materiały 3.3, Metody 4.3.4). Pozostałe konstrukty uzyskano z wykorzystaniem plazmidu pET-21a(+), trawionego enzymami FastDigest NdeI i FastDigest SalI (Materiały 3.3, Metody 4.3.4). Zastosowanie plazmidu z serii pBAD miało na celu sprawdzenie wydajności klonowania i późniejszej nadprodukcji białka z wykorzystaniem wektora z innym operonem, jednak nie wykazano znaczących różnic w obu procesach, dlatego kontynuowano pracę z wektorem serii pET. Na rysunku 17 przedstawiono różnicę między wielkością nietrawionych oraz trawionych plazmidów. Plazmid pET-21a(+) ma wielkość 5443 pz, a trawiony enzymami 5384 pz, natomiast plazmid pBAD/Myc-His A 4094 pz, a trawiony enzymami 3995 pz.



Rysunek 17. Analiza wielkości plazmidowego DNA wykorzystywanego do klonowania, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. pBAD – plazmid pBAD/Myc-His A; pBAD traw. – plazmid pBAD/Myc-His A trawiony enzymami FastDigest NcoI i FastDigest Sall; pET – plazmid pET-21a(+); pET traw. – plazmid pET-21a(+) trawiony enzymami FastDigest NdeI i FastDigest Sall; M – marker SM0311 (Materiały 3.5).

Po klonowaniu wyizolowano plazmidowe DNA z komórek bakteryjnych *E. coli* (Metody 4.3.2) i sprawdzono ich wielkość oraz poprawność sekwencji nukleotydowej. Test retardacji polegający na rozdzieleniu plazmidów w żelu agarozowym (Metody 4.2.1), pozwolił na wytypowanie plazmidów rekombinowanych. Te, które migrowały w żelu wolniej niż plazmid kontrolny powinny zawierać wstawkę, dlatego poddano je sekwencjonowaniu w firmie Genomed, aby potwierdzić poprawność sekwencji nukleotydowej. Przykładowy wynik testu retardacji przedstawiono na rysunku 18. Wszystkie planowane do otrzymania metodą klonowania konstrukty genetyczne uzyskano i potwierdzono prawidłowość ich sekwencji nukleotydowych.



Rysunek 18. Analiza wielkości plazmidowego DNA wyizolowanego z wybranych koloni bakteryjnych po klonowaniu, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. K – plazmid pET-21a(+) nierekombinowany; 1-8 – plazmidy izolowane z kolejnych koloni; M – marker SM0311 (Materiały 3.5).

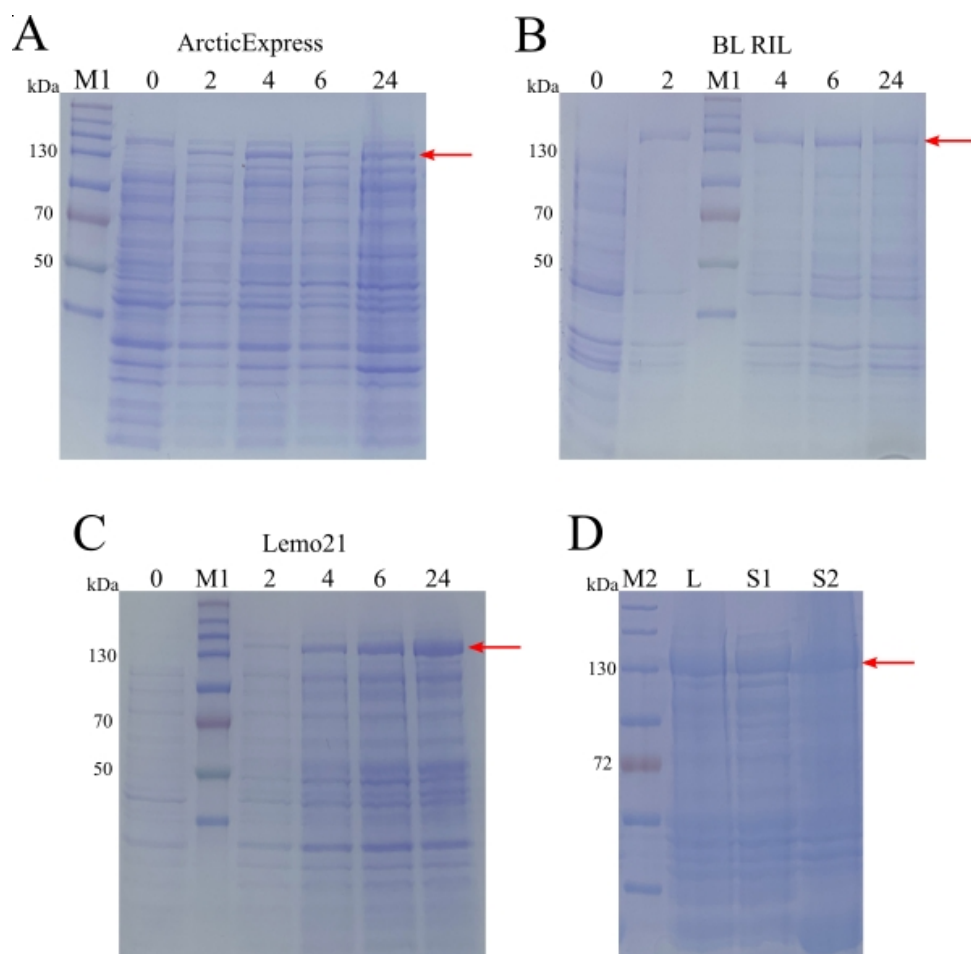
5.2. Otrzymywanie preparatów białkowych polimeraz DNA i białka gp32

5.2.1. Nadprodukcja białek rekombinowanych

Plazmidowe DNA zawierające sekwencje kodujące dla wszystkich zaplanowanych wariantów białek wtransformowano do szczepów ekspresyjnych bakterii *E. coli*, początkowo Arctic Express (DE3), BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (BL RIL) i Lemo21 (DE3) (Materiały 3.6, Metody 4.4.2). Przeprowadzono optymalizację procesu nadprodukcji i sprawdzono sposób uwalniania białka. Każdy wariant testowano w ten sam sposób, a przykładowe wyniki przedstawiono na rysunku 19 dla białka HGLB oraz 20 dla białka PLGH. Dla wybranych białek widać różnicę nadprodukcji rekombinowanych białek w zależności od gospodarza i sposobu ich uwalniania. Białko HGLB (rysunek 19) optymalnie nadprodukuje się w szczepie Lemo21 po 24 h od indukcji, a większość białka uwalniana jest do supernatantu 1 (S1). Natomiast białko PLGH (rysunek 20) optymalnie nadprodukuje się w szczepie ArcticExpress, również po 24 h od indukcji i uwalniane jest dopiero do supernatantu 2 (S2). W przypadku gdy obserwowano brak nadprodukcji lub jej bardzo niski poziom w wyżej wymienionych 3 szczepach ekspresyjnych, testowano dodatkowe szczepy Rosetta (DE3) i Tuner (DE3). Na podstawie wyników eksperymentów określano optymalne warunki nadprodukcji i uwalniania dla każdego z zaprojektowanych wariantów.

W przypadku wariantu BLGH, który jest kodowany przez sekwencję DNA znajdującą się w wektorze pBAD/Myc-His A, do optymalizacji zastosowano wyłącznie szczep TOP10, ze względu na inny sposób indukcji pozwalający na nadprodukcję białka (Metody 4.4.4). Zastosowany wektor nie posiada operonu laktozowego, lecz arabinozowy, co determinuje potrzebę zastosowania do nadprodukcji białka innych szczepów *E. coli* niż w przypadku wektorów serii pET oraz indukowanie przy pomocy 0,2% arabinozy, a nie IPTG.

Wyniki optymalizacji nadprodukcji i uwalniania rekombinowanych białek zebrano w tabeli 15 dla wariantów polimerazy Bsu oraz w tabeli 16 dla wariantów polimerazy Phi29 i białka gp32.



Rysunek 19. Analiza produktów rozdziłu elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie optymalizacji nadprodukcji białka HGLB oraz jego uwalniania. A – optymalizacja nadprodukcji w szczepie Arctic Express (DE3); B – optymalizacja nadprodukcji w szczepie BL21-CodonPlus (DE3)-RIL; C – optymalizacja nadprodukcji w szczepie Lemo21 (DE3); D – uwalnianie białka HGLB. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (133,76 kDa). M1 – marker 26625, M2 – marker P7719 (Materiały 3.5). 0 – przed indukcją IPTG; 2, 4, 6, 24 – 2, 4, 6, 24 h po indukcji IPTG; L – lizat; S1 – supernatant 1; S2 – supernatant 2; B – polimeraza Bsu; G – białko gp32; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

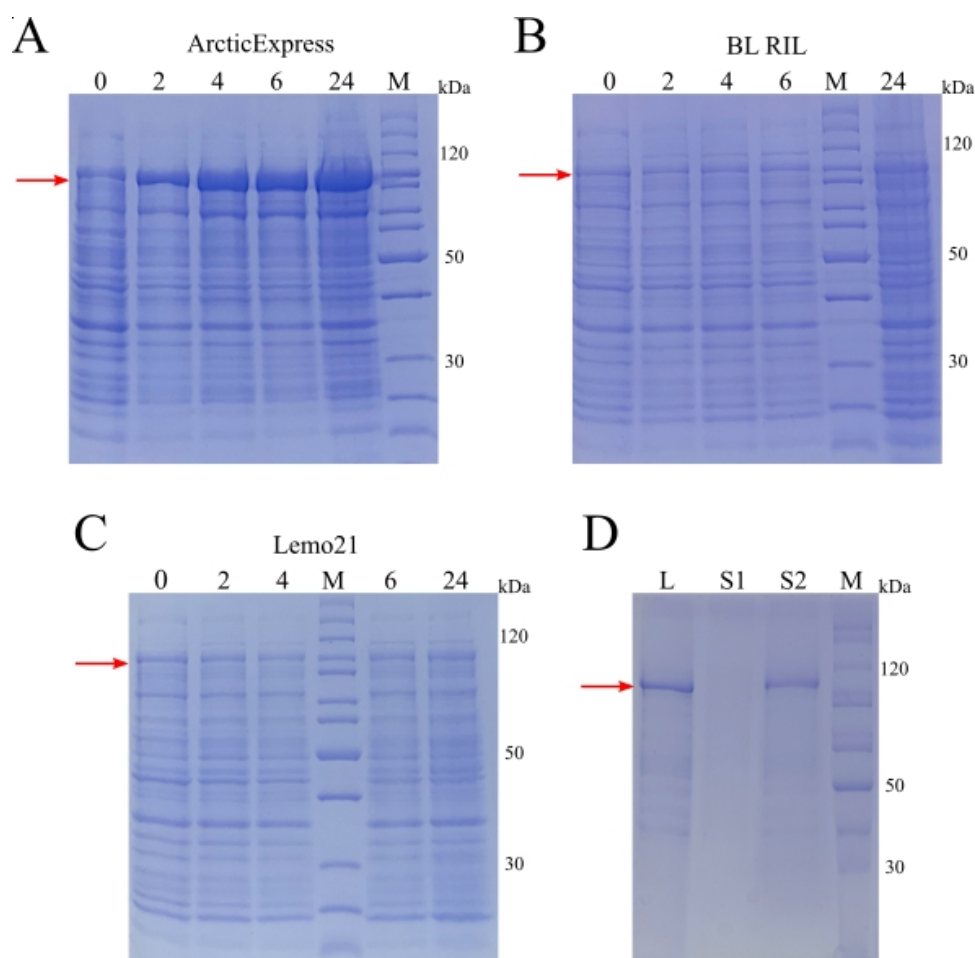
Tabela 15. Zestawienie optymalnych warunków nadprodukcji białek rekombinowanych z polimerazą Bsu.

Wariant	Teoretyczna masa cząsteczkowa białka [kDa]	Szczep ekspresyjny	Czas [h]	Uwalnianie
GLBLN _{SSB} H	161,87	Lemo21	6	S1
BLN _{SSB} H*	128,04	Rosetta	24	S1
HGLB	133,76	Lemo21	24	S1
N _{SSB} LBLGH	161,87	Arctic Express	6	S1 i S2
HN _{SSB} LB	128,04	Arctic Express	24	S1
BLGH	133,76	TOP10	24	S1
BLN ₁₅₀ H	112,03	Arctic Express	24	S1
B _L LN ₁₅₀ H	78,89	Arctic Express	24	S1
B	98,98	Arctic Express	24	S1
HB	99,8	Arctic Express	24	S1
B _L	65,95	Arctic Express	24	S1
HB _L	66,79	Arctic Express	4	S1

Masy białek zostały wyznaczone na podstawie sekwencji aminokwasowej białek, z wykorzystaniem narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy. * – nadprodukcja w 20°C z użyciem pożywki SB (Materiały 3.9); B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Analiza wyników rozdziału elektroforetycznego dla białek rekombinowanych z polimerazą Bsu zestawionych w tabeli 15 wykazała, że dla większości wariantów optymalnymi warunkami jest 24 godzinna nadprodukcja w szczepie Arctic Express. Ponadto warianty uwalniane są do supernatantu 1 (S1), tylko w przypadku białka N_{SSB}LBLGH połowa zostaje uwolniona dopiero do supernatantu 2 (S2). Szczególnym przypadkiem jest białko BLN_{SSB}H, którego nadprodukcję ze względu na bardzo słabą wydajność, w ustalonych dla innych wariantów warunkach, dodatkowo testowano w obniżonej temperaturze (20°C) z użyciem pożywki SB (Materiały 3.9) i szczepu Rosetta. Zmiana warunków poprawiła wydajność, natomiast warto zaznaczyć, że poziom nadprodukcji białka BLN_{SSB}H był najniższy spośród wszystkich testowanych białek. W przypadku białka referencyjnego HB_L krótszy czas nadprodukcji wynika

z zaobserwowanego nieznacznego spadku ilości białka powyżej 4 h od indukcji, co może sugerować wzmożoną aktywność proteaz wewnątrzkomórkowych. W celu zabezpieczenia białka przed możliwą proteolizą podczas prowadzenia hodowli w większej skali, do pożywki dodano mieszaninę inhibitorów proteaz cOmplete™. Mimo krótszego czasu wydajność nadprodukcji była na wysokim poziomie i przy powiększeniu skali nie obserwowano już spadków poziomu ilości nadprodukowanego białka w czasie. Wszystkie wyniki testowej nadprodukcji i uwalniania dla wariantów z polimerazą Bsu zebrano w tabeli 15.



Rysunek 20. Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie optymalizacji nadprodukcji białka PLGH oraz jego uwalniania. A – optymalizacja nadprodukcji w szczepie Arctic Express (DE3); B – optymalizacja nadprodukcji w szczepie BL21-CodonPlus (DE3)-RIL; C – optymalizacja nadprodukcji w szczepie Lemo21 (DE3); D – uwalnianie białka HGLB. Czerwona strzałka wskazuje na wielkość badanego białka. M – marker 26614 (Materiały 3.5). 0 – przed indukcją IPTG; 2, 4, 6, 24 – 2, 4, 6, 24 h po indukcji IPTG; L – lizat; S1 – supernatant 1; S2 – supernatant 2; P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Tabela 16. Zestawienie optymalnych warunków nadprodukcji białek rekombinowanych z polimerazą Phi29 i białka gp32.

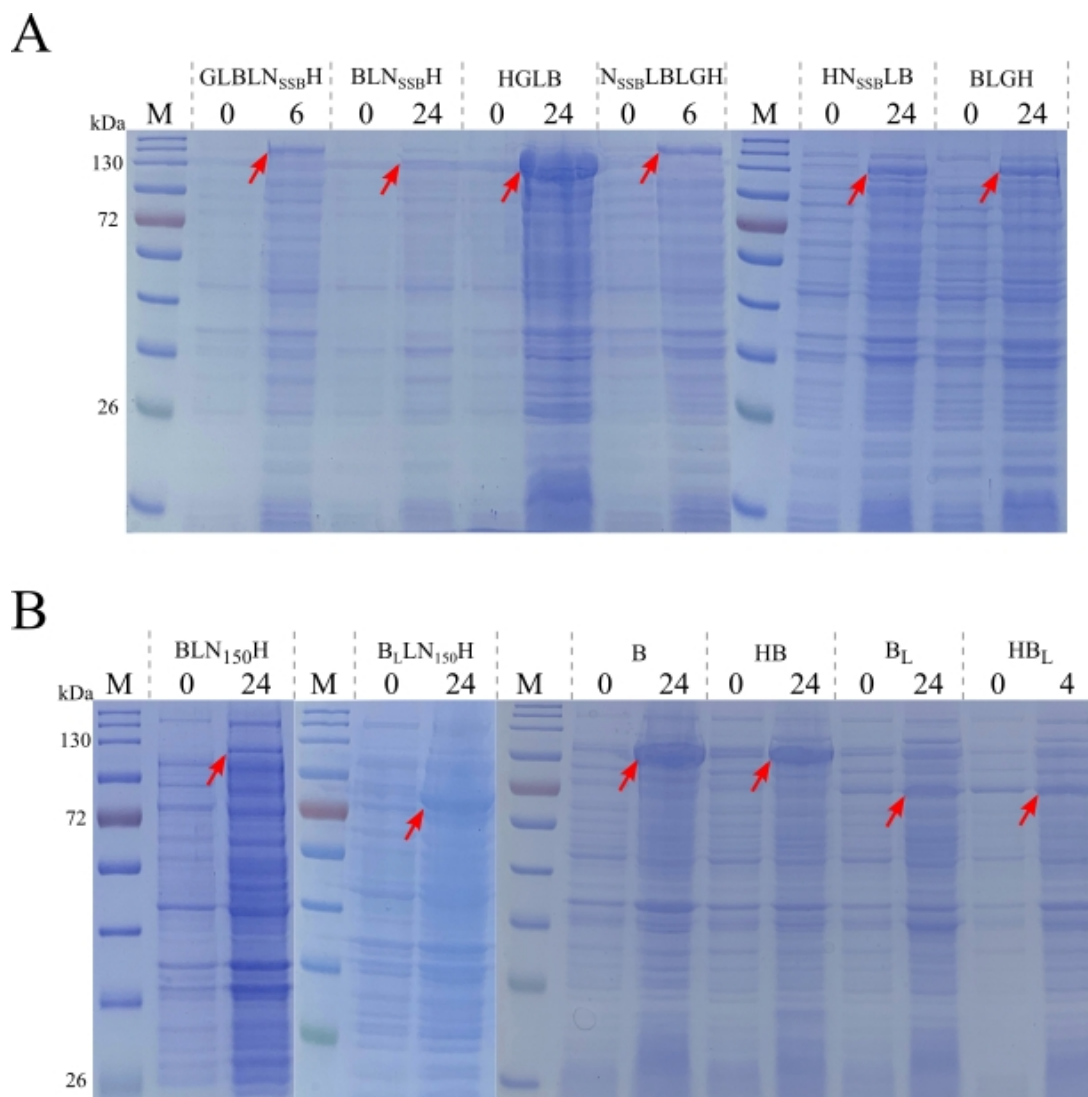
Wariant	Teoretyczna masa cząsteczkowa białka [kDa]	Szczep ekspresyjny	Czas [h]	Uwalnianie
HN _{SSB} LPLGH	130,42	BL RIL	6	S2
HN _{SSB} LP	95,77	Arctic Express	24	S2
PLGH	101,49	Arctic Express	24	S2
HGLPLN ₁₅₀ H	114,43	Arctic Express	6	S2
HGLP	101,49	Arctic Express	24	S2
PLN ₁₅₀ H	79,77	Arctic Express	24	S2
PLN _{SSB} H	95,77	Lemo21	24	S2
HGLPLN _{SSB} H	130,42	Lemo21	24	S2
N ₁₅₀ LPLGH	111,82	Arctic Express	6	S2
HN ₁₅₀ LPLGH	114,41	Arctic Express	24	S2
HN ₁₅₀ LP	79,77	Arctic Express	24	S2
P	66,83	Tuner	24	S2
HP	67,66	Tuner	24	S2
GH	34,3	Lemo21	6	S1

Masy białek zostały wyznaczone na podstawie sekwencji aminokwasowej białek, z wykorzystaniem narzędzi Translate tool oraz ProtParam portalu ExPASy. P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

W przypadku białek rekombinowanych z polimerazą Phi29 optymalny czas również wynosił 24 h, natomiast szczepem, w którym zaobserwowaną największą nadprodukcję był Arctic Express. Wszystkie białka uwalniają się dopiero do supernatantu 2 (S2). Polimerazy referencyjne wymagały przetestowania nadprodukcji w dodatkowych szczepach, w celu zwiększenia jej wydajności. Dla obu białek optymalnym okazało się zastosowanie szczepu Tuner. Białko gp32 (GH) najwydajniej nadprodukowało się w szczepie Lemo21 w przeciągu 6 h oraz uwolniło się do supernatantu 1 (S1). Wyniki testowej nadprodukcji dla wariantów z polimerazą Phi29 i białka gp32 zebrano w tabeli 16.

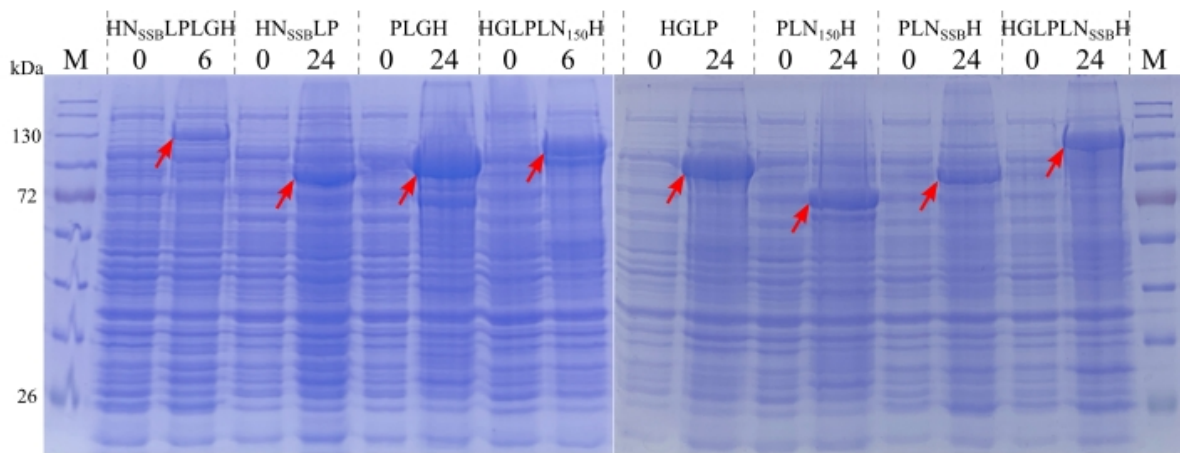
Wybrane warunki nadprodukcji białek rekombinowanych zebrane w tabelach 15 i 16 zastosowano do 15-krotnego zwiększenia skali ich nadprodukcji. Zwiększenie

skali nie zmniejszyło wydajności procesu oraz nie wpłynęło na sposób ich uwalniania. Wyniki nadprodukcji w większej skali przedstawiono na rysunkach 21 oraz 22. Białka rekombinowane z sukcesem nadprodukowano w powiększonej 15-krotnie skali, a osady bakteryjne wykorzystano w procedurze ich oczyszczania.

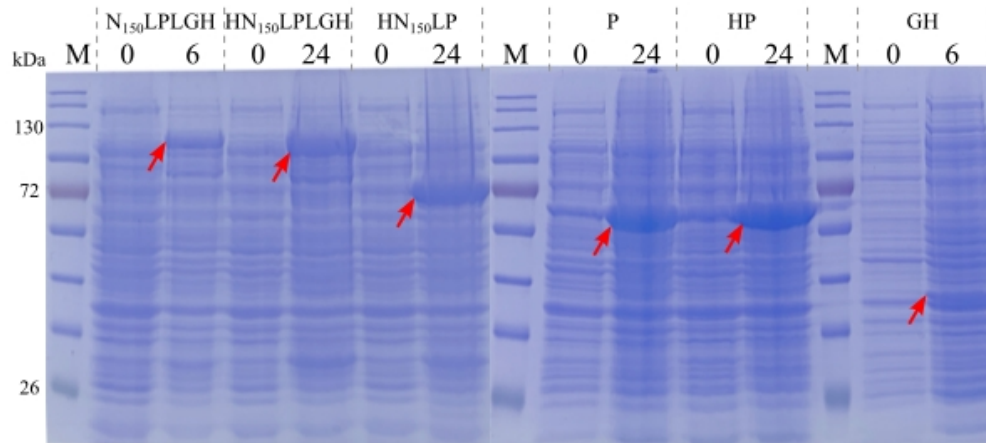


Rysunek 21. Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie nadprodukcji w zwiększonej skali dla wariantów z polimerazą Bsu. A – nadprodukcja białek GLBLN_{SSB}H, BLN_{SSB}H, HGLB, N_{SSB}LBLGH, HN_{SSB}LB i BLGH; B – nadprodukcja białek BLN₁₅₀H, B_LLN₁₅₀H, B, HB, B_L i HB_L. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka. M – marker P7719 (Materiały 3.5). 0 – przed indukcją IPTG lub arabinozą; 4, 6, 24 – 4, 6, 24 h po indukcji IPTG lub arabinozą; B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

A



B



Rysunek 22. Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie nadprodukcji w zwiększonej skali dla wariantów z polimerazą Phi29 i białka gp32. A – nadprodukcja białek HN_{SSB}LPLGH, HN_{SSB}LP, PLGH, HGLPLN₁₅₀H, HGLP, PLN₁₅₀H, PLN_{SSB}H i HGLPLN_{SSB}H; B – nadprodukcja białek N₁₅₀LPLGH, HN₁₅₀LPLGH, HN₁₅₀LP, P, HP i GH. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka. M – marker P7719 (Materiały 3.5). 0 – przed indukcją IPTG; 6, 24 – 6, 24 h po indukcji IPTG; P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

5.2.2. Oczyszczanie białek rekombinowanych

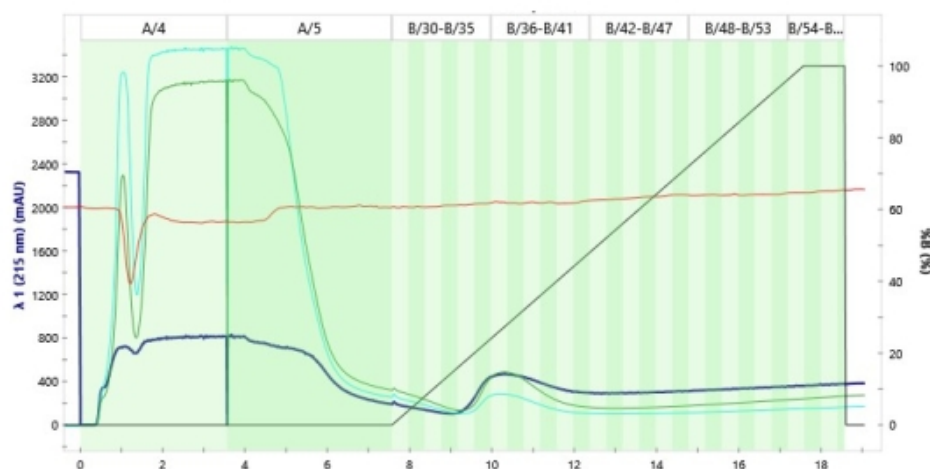
Naprodukowane białka uwalniano z komórek bakteryjnych i oczyszczano z wykorzystaniem metod chromatograficznych. W zależności od sposobu uwalniania białka oraz obecności znacznika His-tag w konstrukcie, oczyszczanie przeprowadzano na jeden z czterech sposobów. W przypadku białek ze znacznikiem His-tag oczyszczano je metodą chromatografii metalopowinowactwa. Roztwory białek rekombinowanych uwolnionych do supernatantu 1 (S1) przed nałożeniem na kolumnę filtrowano, natomiast roztwory białek uwolnionych do supernatantu 2 (S2) najpierw rozcieńczano, a następnie filtrowano. Białka referencyjne bez znacznika oczyszczano przy pomocy chromatografii jonowymiennej. Natomiast białko gp32 (GH) oczyszczano dwuetapowo z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa oraz złoża ssDNA-celuloza.

5.2.2.1. Oczyszczanie polimeraz DNA ze znacznikiem His-tag uwolnionych do supernatantu 1

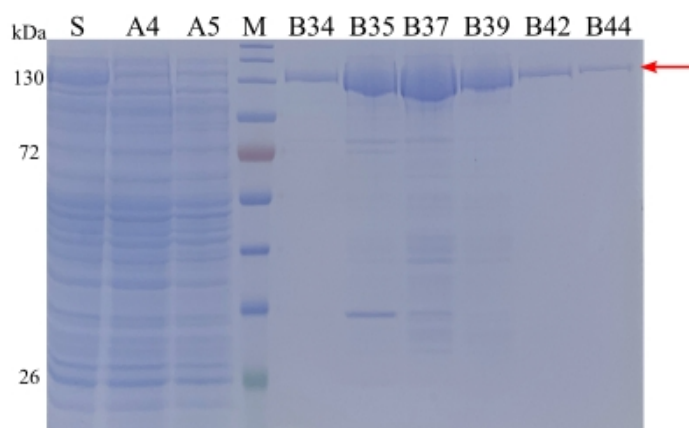
Jednym z białek rekombinowanych ze znacznikiem His-tag, które uwolniło się do supernatantu 1 (S1) jest białko HGLB. Wyniki procesu oczyszczania tego białka przedstawiono na rysunkach 23 i 24. Oczyszczanie rozpoczęto od nałożenia na zrównoważoną kolumnę metalopowinowactwa supernatantu 1. Objętość nakładanej próbki to ~15-20 ml, a prędkość przepływu w trakcie nakładania próbki wynosiła 0,5 ml/min. Wolny przepływ zwiększa czas kontaktu białka ze złożem, dzięki czemu oczyszczane białko może silniej z nim oddziaływać. Jest to szczególnie istotne przy dużym jego stężeniu w nanoszonej próbce. Płukanie złoża i elucja prowadzone były zgodnie z opisem w rozdziale Metody 4.5.2. Analiza elektroforetyczna poszczególnych frakcji w porównaniu z wartościami przedstawionymi na chromatogramie wykazała, że białko HGLB związało się do kolumny, a następnie eluowało przy stężeniu imidazolu ~50 mM (Rysunek 23). Frakcje zawierające białko (B34-B44) zagęszczono do 6 ml i odsolono na kolumnie trzykrotnie nakładając próbkę (Metody 4.5.5). Ponownie wykonano analizę elektroforetyczną i zagęszczono frakcję białkową (B66) (Rysunek 24). Na koniec spektrofotometrycznie zmierzono stężenie białka w preparacie i przygotowano je do długotrwałego przechowywania w -20°C (Metody 4.6.1).

Pozostałe białka rekombinowane ze znacznikiem His-tag uwolnione do supernatantu 1 oczyszczono w analogiczny sposób.

A

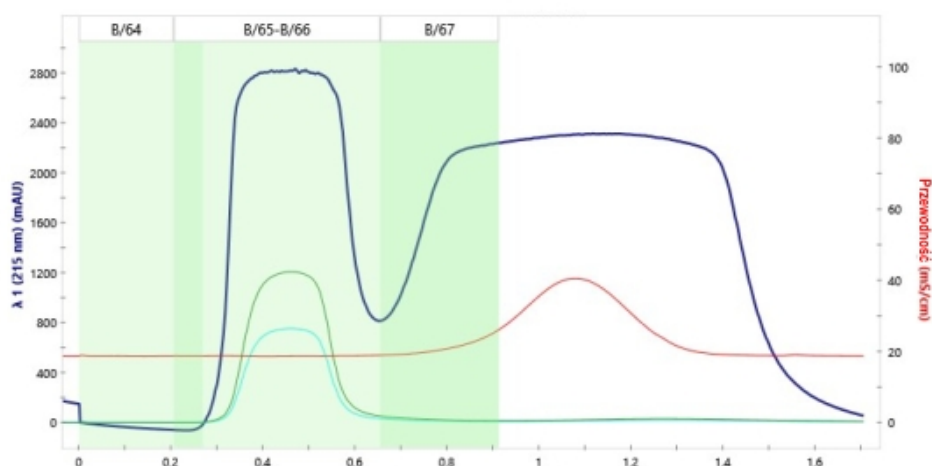


B

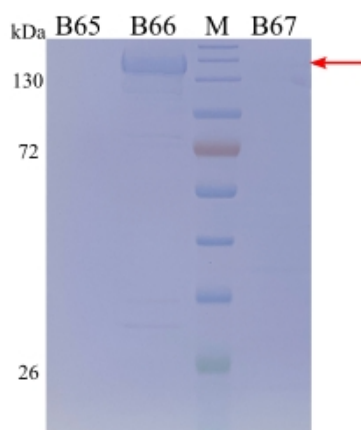


Rysunek 23. Wyniki oczyszczania białka HGLB metodą chromatografii metalopowinowactwa. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (133,76 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); S – supernatant nałożony na kolumnę; A4 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; A5 – frakcja zebrana podczas płukania kolumny; B20-B57 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; krzywa czerwona – przewodności.

A



B



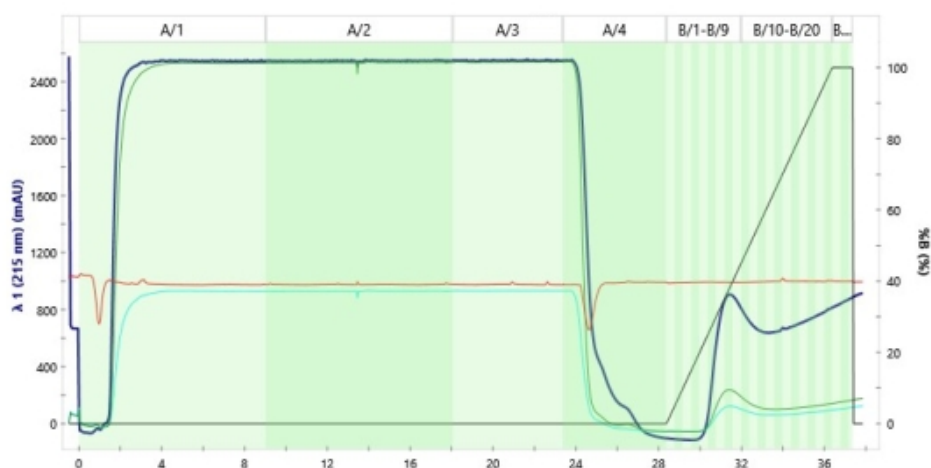
Rysunek 24. Wyniki odsalania białka HGLB. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych Czerwona strzałka wskazuje na wielkość badanego białka (133,76 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); B64 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; B65-B67 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

5.2.2.2. Oczyszczanie polimeraz DNA ze znacznikiem His-tag uwolnionych do supernatantu 2

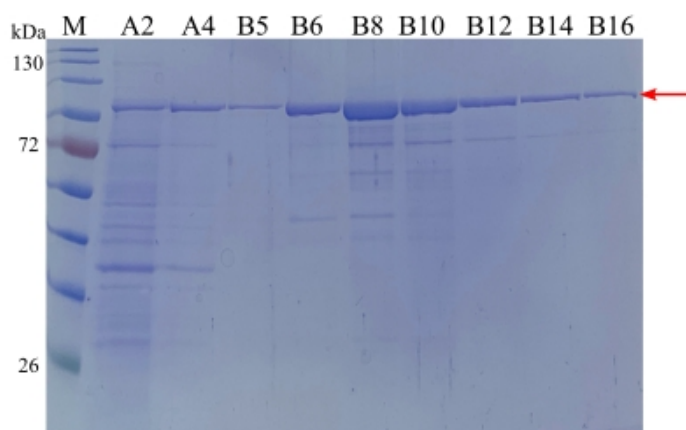
Jednym z białek rekombinowanych ze znacznikiem His-tag, które uwolniło się do supernatantu 2 (S2) jest białko PLGH. Wyniki procesu oczyszczania tego białka przedstawiono na rysunkach 25 i 26. Oczyszczanie rozpoczęto od nałożenia na zrównoważoną kolumnę metalopowinowactwa rozcieńczonego supernatantu 2 (Metody 4.5.1). Objętość nakładanej próbki to ~ 120 ml, a prędkość przepływu podczas nakładania wynosiła 1,5 ml/min. Ze względu na 8-krotne rozcieńczenie próbki, nie było konieczności wydłużania czasu oddziaływania białka z kolumną, poprzez zmniejszanie prędkości przepływu. Płukanie złoża i elucję prowadzono zgodnie z opisem w rozdziale Metody 4.5.2. Analiza elektroforetyczna poszczególnych frakcji, w porównaniu z wartościami przedstawionymi na chromatogramie, wykazała że białko W9 niecałkowicie związało się z kolumną, a następnie eluowało przy stężeniu imidazolu ~ 50 mM (Rysunek 25). Frakcje zawierające białko (B5-B16) odsolono poprzez dializę (Metody 4.5.6), zagęszczono a następnie wykonano analizę elektroforetyczną (Rysunek 26). Na koniec spektrofotometrycznie zmierzono stężenie białka w preparacie i przygotowano je do długotrwałego przechowywania w -20°C (Metody 4.6.1). Pozostałe białka rekombinowane ze znacznikiem His-tag uwolnione do supernatantu 2 oczyszczono w analogiczny sposób.

Odsalanie za pomocą dializy okazało się konieczne dla wszystkich wariantów polimerazy Phi29, gdyż zagęszczanie bezpośrednio po chromatografii metalopowinowactwa powodowało wytrącanie się białka, czego nie obserwowano podczas dializy. Taki sposób odsalania pozwolił na zredukowanie strat w ilości białka w trakcie oczyszczania.

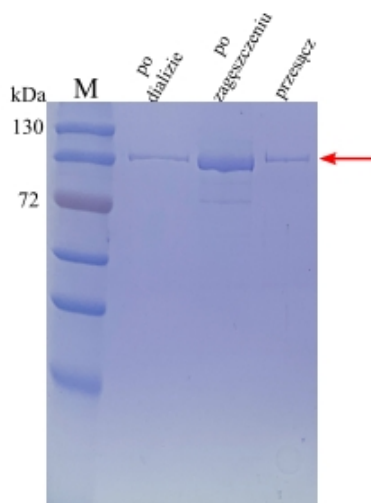
A



B



Rysunek 25. Wyniki oczyszczania białka PLGH metodą chromatografii metalopowinowactwa. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (101,49 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); A2 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; A4 – frakcja zebrana podczas płukania kolumny; B1-B23 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.



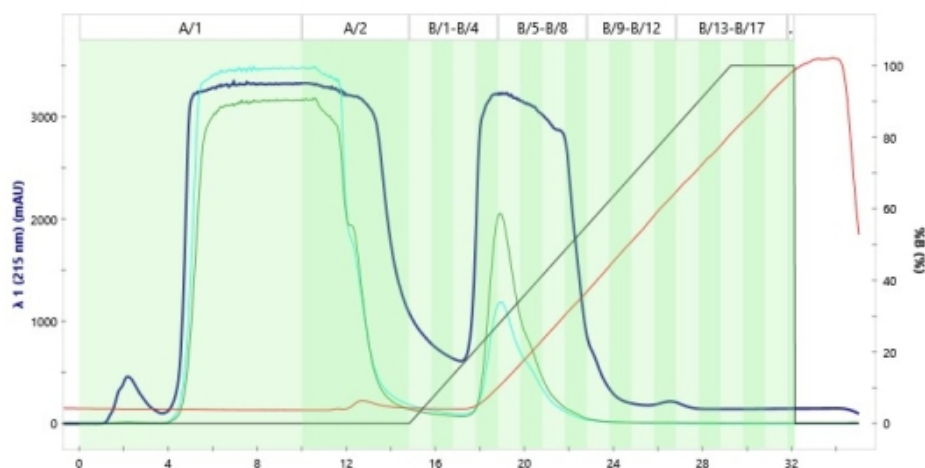
Rysunek 26. Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji po odsalania białka PLGH poprzez dializę. Czerwona strzałka wskazuje na wielkość badanego białka (101,49 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5).

5.2.2.3. Oczyszczanie polimeraz DNA bez znacznika His-tag

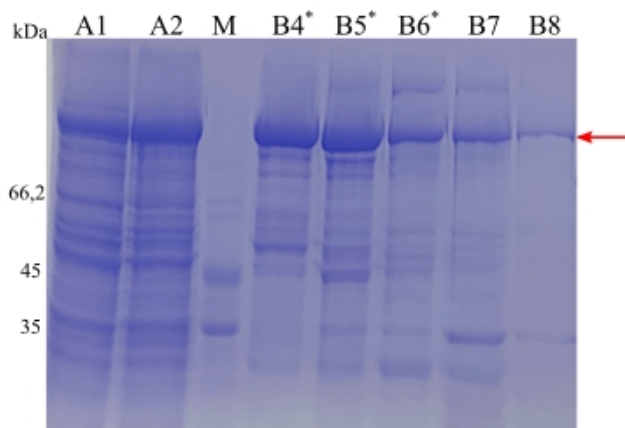
Białka bez znacznika His-tag oczyszczano przy pomocy chromatografii jonowymiennej, czego przykładem jest polimeraza Bsu (wariant B). Wyniki procesu oczyszczania tego białka przedstawiono na rysunkach 27 i 28. Odpowiednio przygotowany supernatant (S1 lub S2) nakładano na zrównoważoną kolumnę, z prędkością przepływu 0,5 ml/min dla S1 i 1,5 ml/min dla S2. Płukanie złoża i elucję prowadzono zgodnie z opisem w rozdziale Metody 4.5.3. Analiza elektroforetyczna poszczególnych frakcji w porównaniu z wartościami przedstawionymi na chromatogramie wykazała, że białko niecałkowicie związało się z kolumną, a następnie eluowało się przy stężeniu KCl ~ 400 mM (Rysunek 27). Ze względu na wysoką wartość absorbancji przy długościach fali 215 i 280 nm, próbki z frakcji B4-B6 do analizy elektroforetycznej rozcieńczono 5-krotnie (oznaczenie * na rysunku 27 B). Mimo niecałkowitego związania białka ze złożem kolumny, jego ilość w poszczególnych frakcjach była wystarczająca do przeprowadzenia dalszych etapów oczyszczania. Frakcje elucyjne podzielono na 3 grupy, w zależności od występujących zanieczyszczeń. Pierwszą z nich stanowiła frakcja B4, drugą – B5-B6 i trzecią – B7-B8. Zagęszczono każdą z nich do 2 ml i osobno odsolono na kolumnie. Na rysunku 27 przedstawiono wynik odsalania dla frakcji B4. Odsolone frakcje (A3-A5) zagęszczono, spektrofotometrycznie zmierzono stężenie białka w preparacie

i przygotowano je do długotrwałego przechowywania w -20°C (Metody 4.6.1). Białka B_L i P oczyszczano w analogiczny sposób, natomiast polimeraza referencyjna P nie związała się do kolumny, przez co nie otrzymano preparatu białkowego tego wariantu.

A

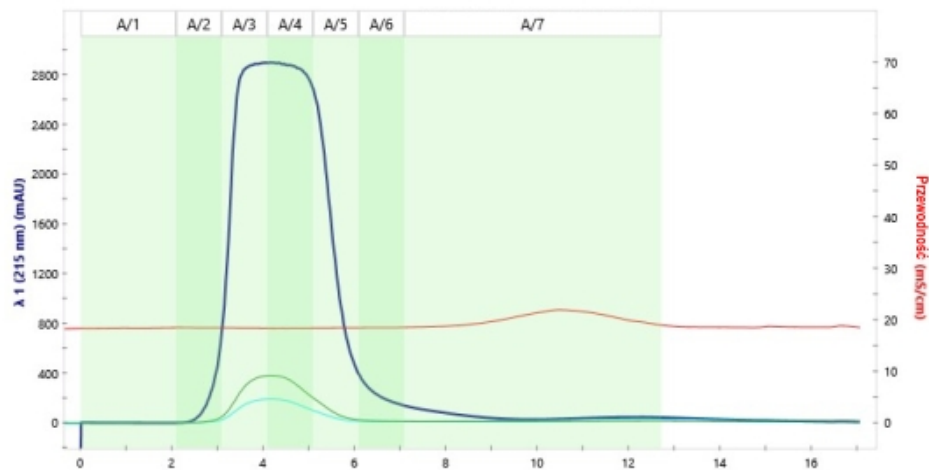


B

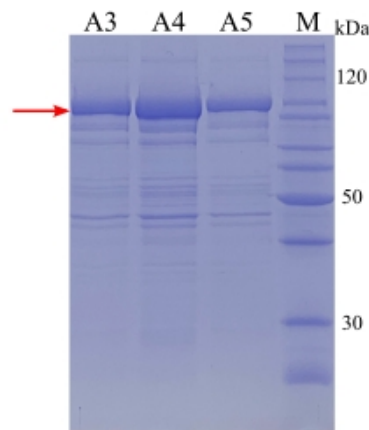


Rysunek 27. Wyniki oczyszczania polimerazy Bsu (wariant B) metodą chromatografii jonowymiennej. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdzielu elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (98,98 kDa). M – marker 26610 (Materiały 3.5); A1 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; A2 – frakcja zebrana podczas płukania kolumny; B1-B17 – frakcje elucyjne; * – oznaczenie frakcji rozcieńczonych 5-krotnie. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

A



B



Rysunek 28. Wyniki odsalania polimerazy Bsu (wariant B). A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (98,98 kDa). M – marker 26614 (Materiały 3.5); A1 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; A2-A7 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

5.2.2.4. Oczyszczanie białka gp32

Oczyszczanie białka gp32 (GH) przeprowadzono dwuetapowo. Pierwsza część procesu przebiegała w analogiczny sposób jak dla pozostałych białek, które uwolniły się do supernatantu 1 (S1). Drugi etap oczyszczania przeprowadzono z wykorzystaniem złoża ssDNA-celuloza (Metody 4.5.4). Wyniki procesu oczyszczania tego białka przedstawiono na rysunkach 29, 30, 31 i 32. Po oczyszczaniu na kolumnie metalopowinowactwa wybrano frakcje o jak najniższym stopniu zanieczyszczeń (B10-14) (Rysunek 29), zagęszczono je do 2 ml i odsolono na kolumnie Bio-Gel (Rysunek 30). Odsoloną próbkę (B90) nałożono na zrównoważoną kolumnę ze złożem ssDNA-celuloza i oczyszczono zgodnie z opisem w rozdziale Metody 4.5.4 (Rysunek 31). Następnie osobno zagęszczono frakcję CelB oraz CelC do 2 ml i odsolono je. Na rysunku 32 przedstawiono tylko proces odsalania frakcji CelC. Odsoloną frakcję (C58) zagęszczono, spektrofotometrycznie zmierzono stężenie białka w preparacie i przygotowano je do długotrwałego przechowywania w -20°C (Metody 4.6.1). Frakcję CelB przygotowano analogicznie. Uzyskane dwa preparaty charakteryzowały się wysoką czystością, przy czym preparat frakcji CelC wyższą niż CelB. Zastosowanie dwuetapowego procesu pozytywnie wpłynęło na zwiększenie czystości preparatów, natomiast negatywnie na wydajność całego procesu.

A

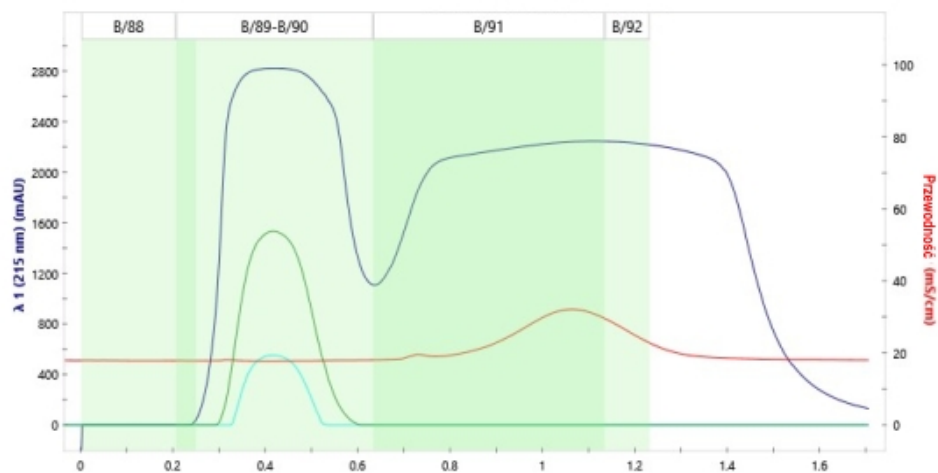


B

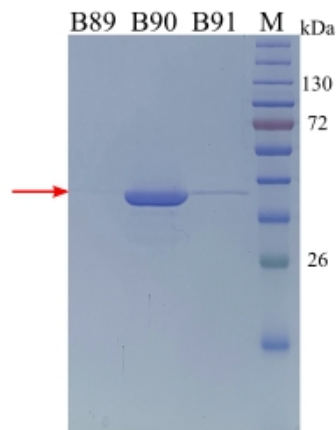


Rysunek 29. Wyniki oczyszczania białka GH metodą chromatografii metalopowinowactwa. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziłu elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (34,3 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); A1 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; A2 – frakcja zebrana podczas płukania kolumny; B1-B27 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

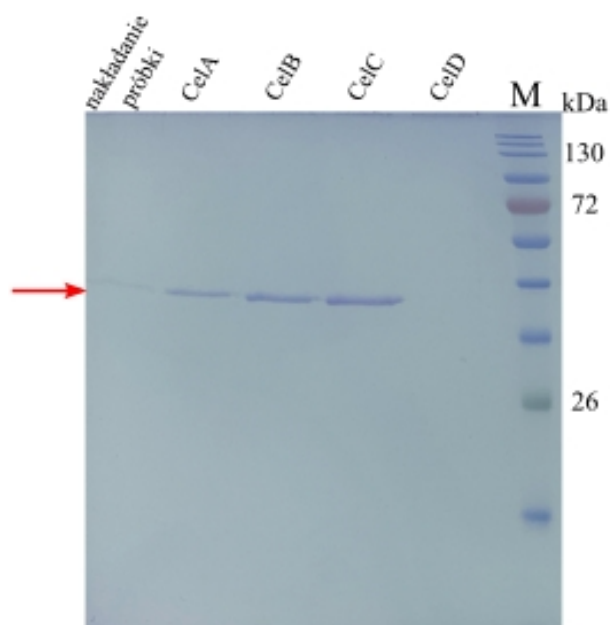
A



B

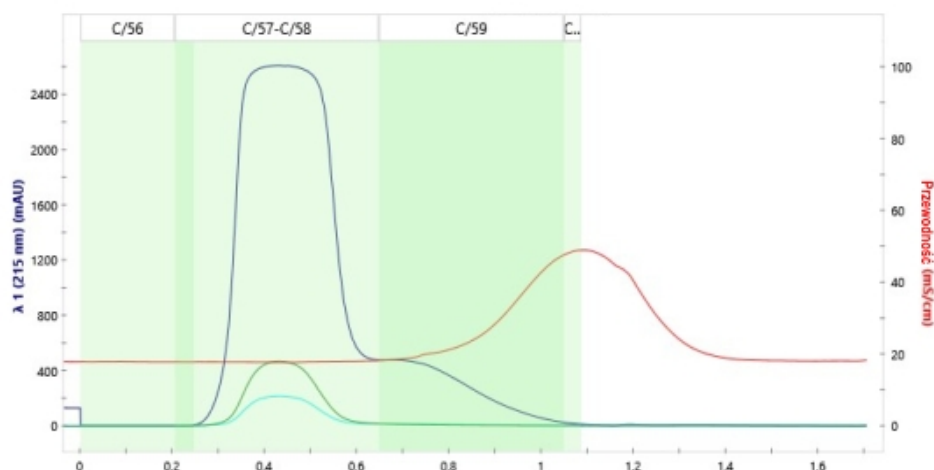


Rysunek 30. Wyniki odsalania białka GH. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (34,3 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); B88 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; B89-B92 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

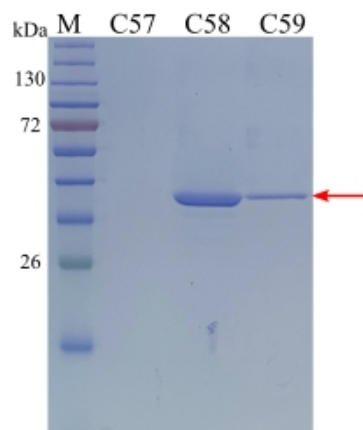


Rysunek 31. Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji po oczyszczaniu białka GH na złożu ssDNA-celuloza. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (34,3 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); CelA, CelB, CelC, CelD – frakcje elucyjne.

A



B



Rysunek 32. Wyniki ponownego odsalania białka GH. A – chromatogram z zaznaczonymi zebranymi frakcjami białkowymi; B – analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji białkowych. Czerwona strzałka wskazuje wielkość badanego białka (34,3 kDa). M – marker P7719 (Materiały 3.5); C56 – frakcja zebrana podczas nakładania próbki; C57-C60 – frakcje elucyjne. Krzywa ciemnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=215$ nm; krzywa zielona – absorbancja przy $\lambda=280$ nm; krzywa jasnoniebieska – absorbancja przy $\lambda=255$ nm; linia czerwona – sygnał przewodności.

Korzystając z czterech przedstawionych powyżej sposobów oczyszczono i zabezpieczono do długotrwałego przechowywania wszystkie białka. Wyjątek stanowiło, wspomniane wcześniej, białko referencyjne P. Zmierzone stężenia preparatów białkowych przedstawiono w poniższej tabeli 17. W przypadku białek referencyjnych w tabeli umieszczono stężenie najmniej zanieczyszczonej innymi białkami frakcji, a dla gp32 stężenie frakcji CelC, których używano do dalszych badań.

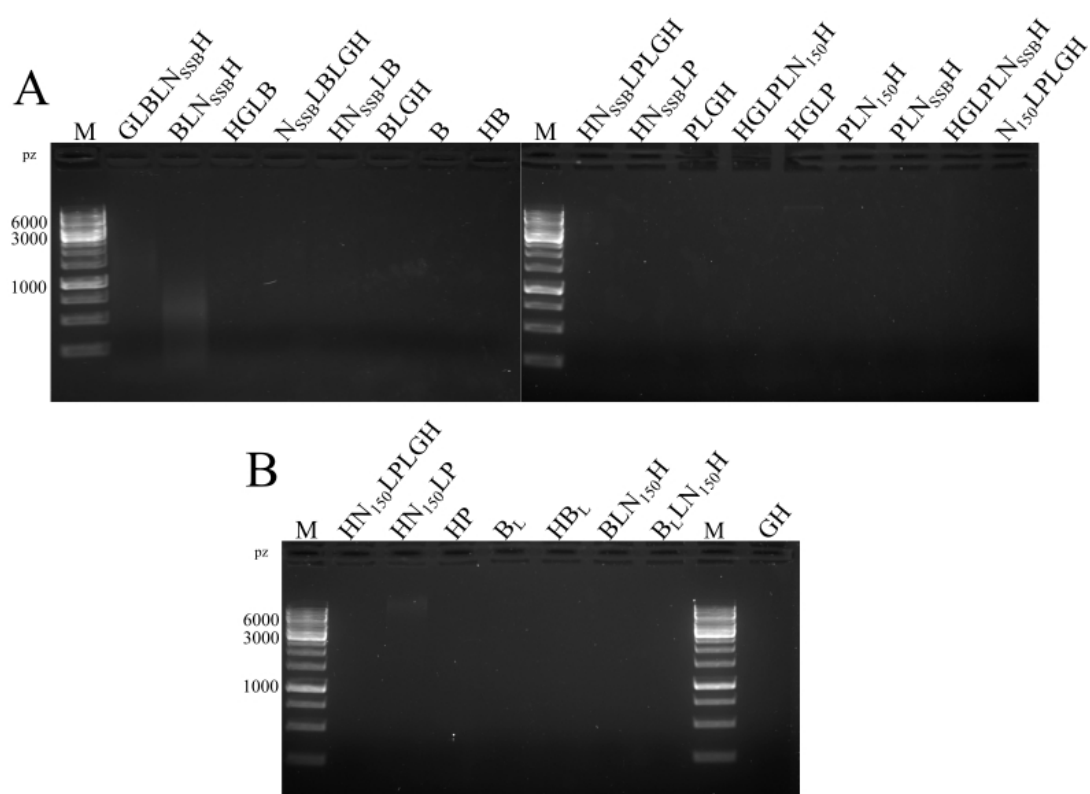
Tabela 17. Zestawienie stężeń oczyszczonych preparatów białkowych.

Wariant	Stężenie [mg/ml]	Wariant	Stężenie [mg/ml]
GLBLN _{SSB} H	1,06	HN _{SSB} LPLGH	0,35
BLN _{SSB} H	0,37	HN _{SSB} LP	0,14
HGLB	3,69	PLGH	0,18
N _{SSB} LBLGH	0,44	HGLPLN ₁₅₀ H	0,29
HN _{SSB} LB	0,60	HGLP	0,05
BLGH	0,86	PLN ₁₅₀ H	0,17
BLN ₁₅₀ H	0,19	PLN _{SSB} H	0,12
B _L LN ₁₅₀ H	19,41	HGLPLN _{SSB} H	0,30
B	1,59	N ₁₅₀ LPLGH	0,21
HB	0,74	HN ₁₅₀ LPLGH	0,18
B _L	2,07	HN ₁₅₀ LP	0,12
HB _L	0,90	HP	0,17
GH	2,60	P	brak

B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

5.2.3. Określenie czystości preparatów białkowych

Otrzymane preparaty białkowe zweryfikowano pod kątem obecności zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi (Metody 4.6.2). Na żełe nakładano po 2 μ g białka dla wariantów polimerazy Bsu oraz białka gp32, natomiast w przypadku polimerazy Phi29, ze względu na niskie stężenie białka na żelu analizowano 5 μ l tych preparatów. Wyniki testu przedstawiono na rysunku 33. Dla białka W2 zaobserwować można nieznaczne zanieczyszczenie kwasami nukleinowymi, natomiast z względu na niewielki stopień tego zanieczyszczenia uznano, że nie powinno to wpływać na reakcję amplifikacji DNA. Dla pozostałych białek nie obserwowano zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi.

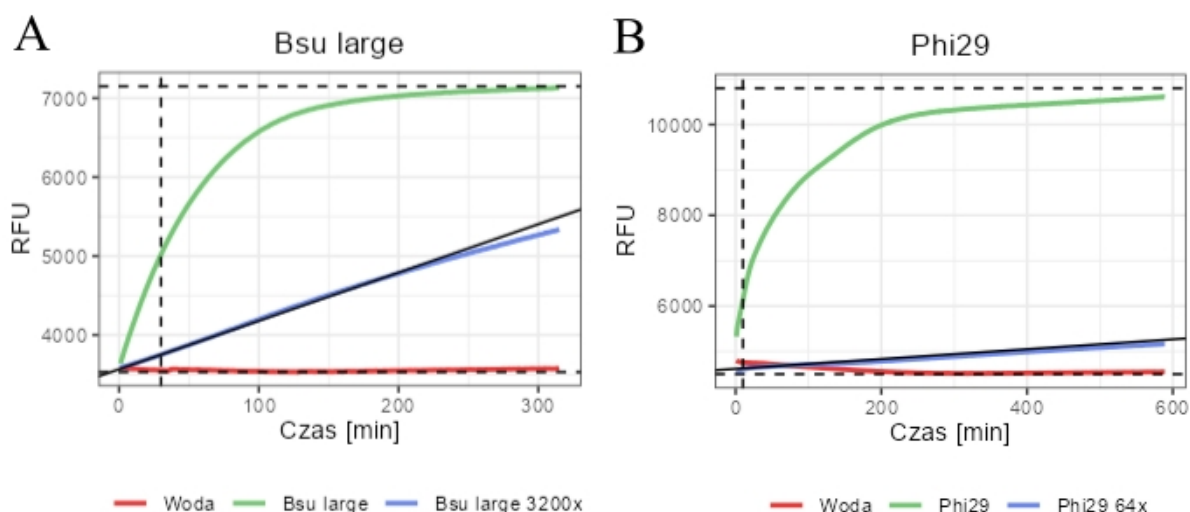


Rysunek 33. Analiza czystości otrzymanych preparatów białkowych, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym. A – sprawdzenie czystości preparatów białkowych GLBLN_{SSB}H, BLN_{SSB}H, HGLB, N_{SSB}LBLGH, HN_{SSB}LB, BLGH, B, HB, HN_{SSB}LPLGH, HN_{SSB}LP, PLGH, HGLPLN₁₅₀H, HGLP, PLN₁₅₀H, PLN_{SSB}H, HGLPLN_{SSB}H i N₁₅₀LPLGH; B – sprawdzenie czystości preparatów białkowych HN₁₅₀LPLGH, HN₁₅₀LP, HP, B_L, HB_L, BLN₁₅₀H, B_LN₁₅₀H i GH. M – marker SM0311 (Materiały 3.5); B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

5.3. Właściwości polimeraz DNA

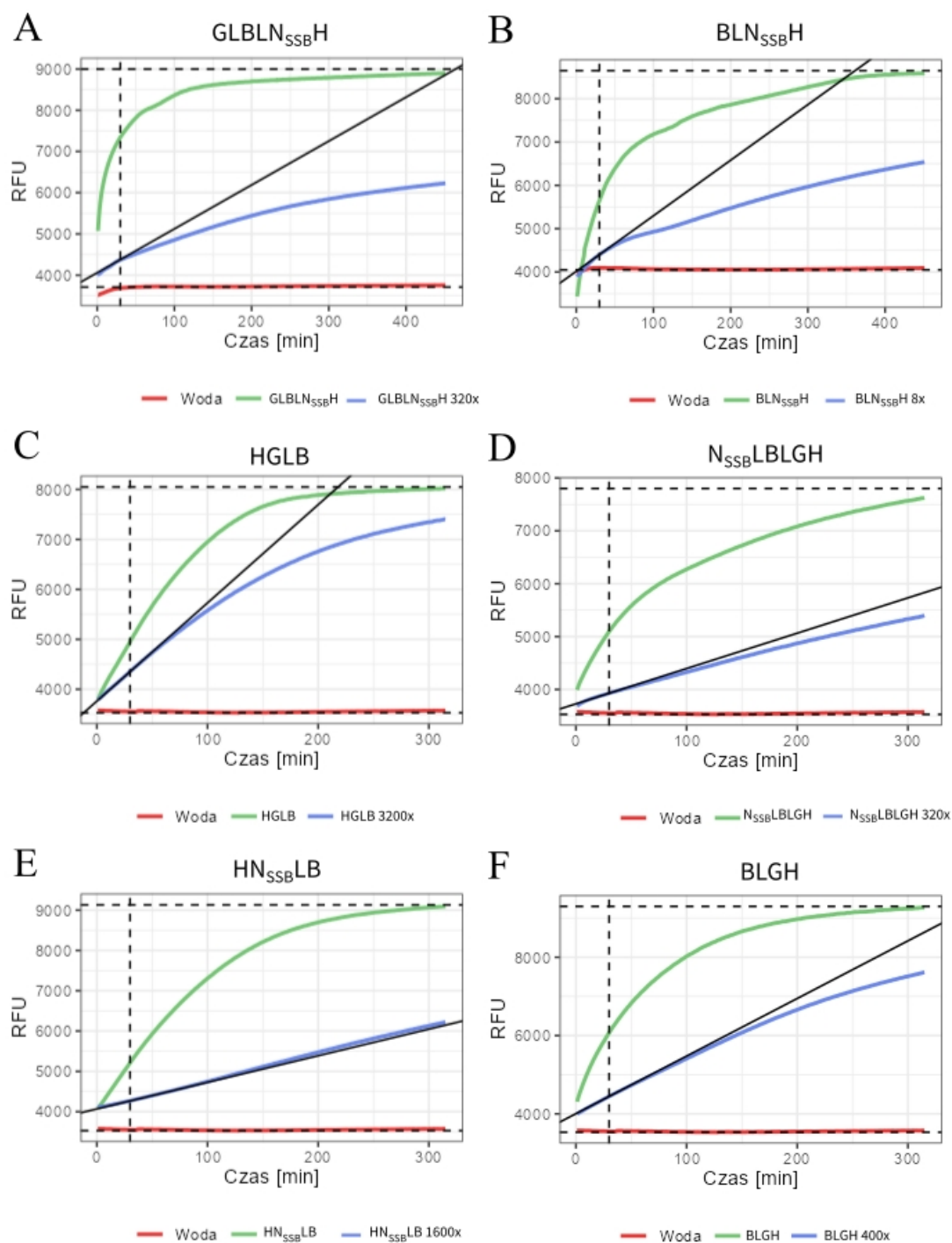
5.3.1. Wyznaczanie jednostek aktywności polimeraz DNA

Ważnym parametrem wszystkich białek enzymatycznych jest ilość jednostek aktywności w preparacie białkowym. W celu wyznaczenia tego parametru, w pierwszej kolejności zbadano polimerazy komercyjne przeprowadzając reakcję wyznaczania jednostek aktywności opisaną w rozdziale Metody 4.7.1, polegającą na pomiarze w czasie sygnału fluorescencji (RFU) rosnącego wprost proporcjonalnie do ilości dsDNA, powstałego w skutek powielania jednoniciowej matrycy DNA. Zarówno dla Bsu large jak i Phi29 reakcja przebiegła zgodnie z opisem przebiegu opracowanym przez producenta zestawu do wyznaczania jednostek aktywności. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono ilość jednostek aktywności w 1 μ l preparatu białkowego. Wyniki eksperymentalne pokryły się z wartościami podanymi przez producenta, co potwierdziło słuszność stosowanego podejścia. Wykresy, na podstawie których obliczono ilość jednostek aktywności przedstawiono na rysunku 34. Krzywa czerwona na wykresie (woda) obrazuje sygnał tła dla próbki, natomiast linia przerywana znajdująca się na jej wysokości obrazuje przyjęty poziom tła do obliczeń. Krzywą zieloną oznaczono sygnał dla stężonego preparatu białkowego (Bsu large lub Phi29), na podstawie którego wyznaczono poziom wysycenia reakcji - górna linia przerywana. Krzywa niebieska to sygnał dla rozcieńczenia wybranego do obliczeń (Bsu large 3200x i Phi29 64x), natomiast linia czarna to styczna wyznaczona do początkowego odcinka liniowego danych pomiarowych. Pionową linią przerywaną zaznaczono czas dla którego wyznaczano aktywność. Obliczenia wykonano w oparciu o definicję jednostek aktywności podanych przez producentów. Dla polimerazy Bsu large: „1 U polimerazy to ilość, która przyłącza 10 nmoli deoksynukleotydów w czasie 30 min w temperaturze 37°C” [37] oraz dla polimerazy Phi29 „1 U polimerazy to ilość, która przyłącza 0,5 pmola deoksynukleotydów w czasie 10 min w temperaturze 30°C” [53].

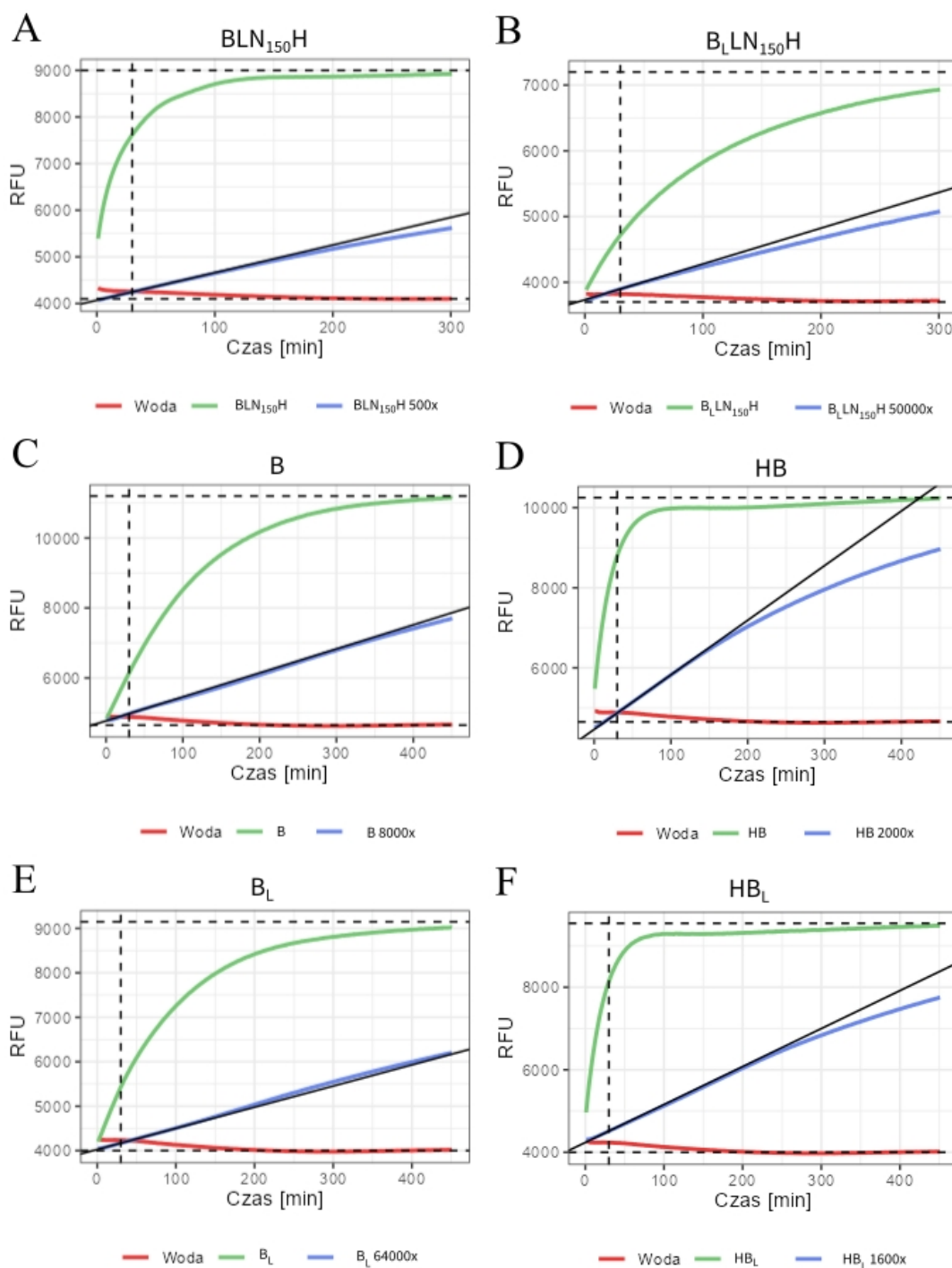


Rysunek 34. Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla komercyjnych polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). A – polimeraza DNA Bsu large (New England Biolabs, USA); B – polimeraza DNA Phi29 (Thermo Fisher Scientific, USA) (Materiały 3.3). Krzywa czerwona – fluorescencja tła; krzywa zielona – fluorescencja dla stężonego preparatu; krzywa niebieska – fluorescencja dla rozcieńzonego preparatu; linia czarna – styczna do odcinka liniowego początkowego fragmentu krzywej niebieskiej; linie przerywane – pomocnicze linie obrazujące poziom wysycenia reakcji, poziom tła oraz czas do wyliczenia ilości jednostek aktywności w preparacie.

Dla pozostałych wariantów polimeraz przeprowadzono analogiczne reakcje w celu wyznaczenia ich jednostkowości oraz korzystano z tych samych definicji. Ze względu na dużą różnicę w stężeniach badanych preparatów oraz ich aktywnościach, kolejne rozcieńczenia dobierano eksperymentalnie. Wykresy na podstawie, których wyliczana była ilość jednostek aktywności dla wariantów polimerazy Bsu przedstawiono na rysunkach 35 i 36. Oznaczenia na wykresach są tożsame z tymi dla polimeraz komercyjnych. Wyliczone parametry charakteryzujące polimerazy przedstawiono w tabeli 18.



Rysunek 35. Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). A – GLBLN_{SSB}H; B – BLN_{SSB}H; C – HGLB; D – N_{SSB}LBLGH; E – HN_{SSB}LB; F – BLGH. Krzywa czerwona – fluorescencja tła; krzywa zielona – fluorescencja dla stężonego preparatu; krzywa niebieska – fluorescencja dla rozcieńczonego preparatu; linia czarna – styczna do odcinka liniowego początkowego fragmentu krzywej niebieskiej; linie przerywane – pomocnicze linie obrazujące poziom wysycenia reakcji, poziom tła oraz czas do wyliczenia ilości jednostek aktywności w preparacie. B – polimeraza Bsu; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.



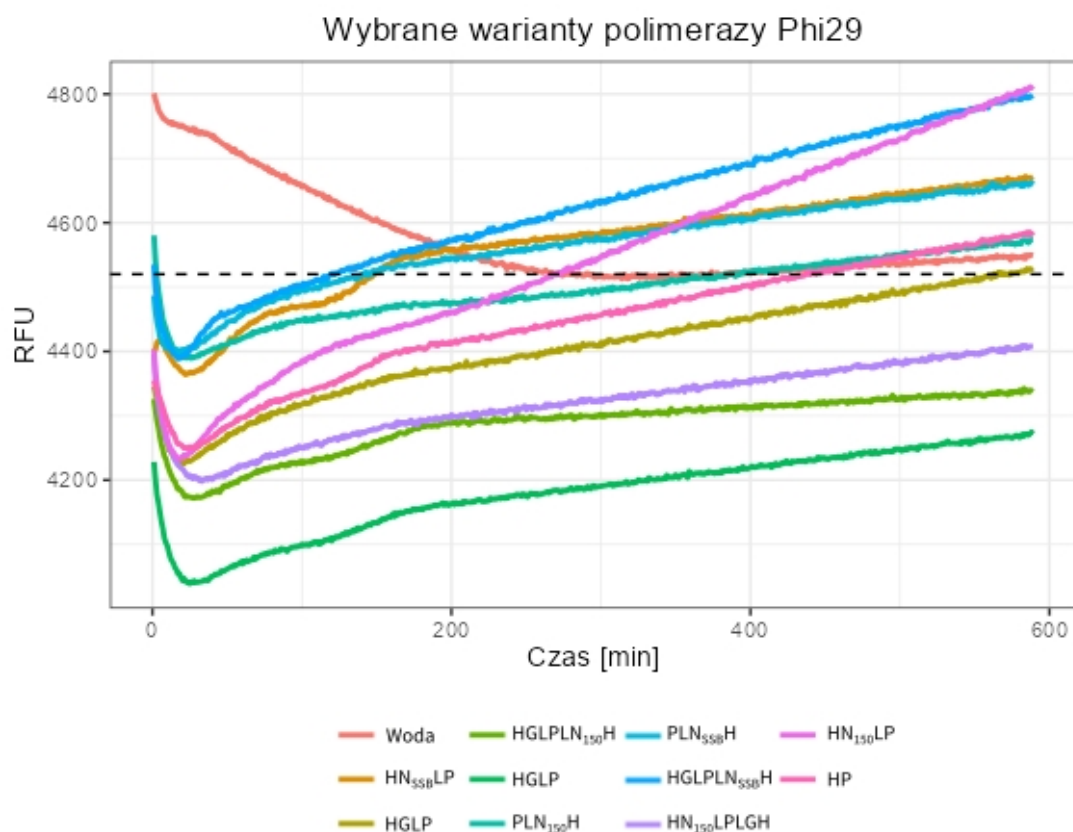
Rysunek 36. Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). A – $BLN_{150}H$; B – $B_L LN_{150}H$; C – B; D – HB; E – B_L ; F – HB_L . Krzywa czerwona – fluorescencja tła; krzywa zielona – fluorescencja dla stężonego preparatu; krzywa niebieska – fluorescencja dla rozcieńczonego preparatu; linia czarna – styczna do odcinka liniowego początkowego fragmentu krzywej niebieskiej; linie przerywane – pomocnicze linie obrazujące poziom wysycenia reakcji, poziom tła oraz czas do wyliczenia ilości jednostek aktywności w preparacie. B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); N_{150} – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Tabela 18. Podsumowanie wyników wyznaczania jednostek aktywności z wyliczeniem jednostkowości specyficznej dla wariantów z polimerazą Bsu.

Wariant	Stężenie [mg/ml]	Jednostkowość [U/μl]	Jednostkowość specyficzna [U/μg]
GLBLN _{SSB} H	1,06	1,0	0,9
BLN _{SSB} H	0,37	0,02	0,05
HGLB	3,69	15,0	4,1
N _{SSB} LBLGH	0,44	1,0	2,3
HN _{SSB} LB	0,6	5,0	8,4
BLGH	0,86	1,5	1,7
BLN ₁₅₀ H	0,19	0,4	2,1
B _L LN ₁₅₀ H	19,41	70,0	3,6
B	1,59	14,0	8,8
HB	0,74	3,0	4,1
B _L	2,07	65,0	31,4
HB _L	0,9	30,0	33,4

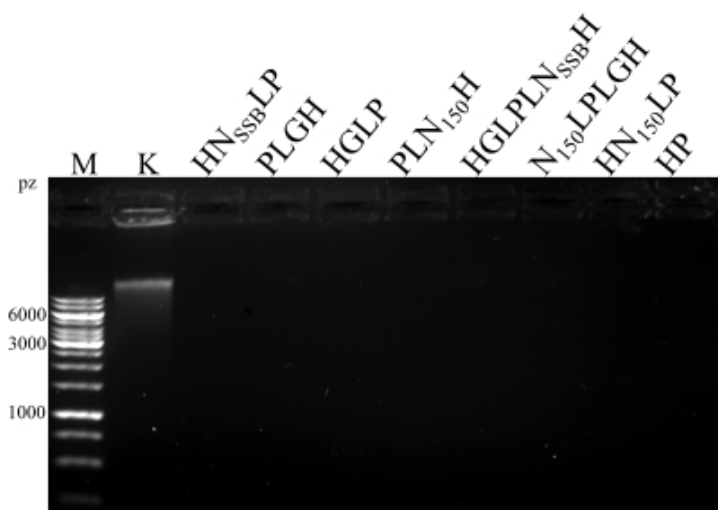
B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Warianty polimerazy Phi29 pomimo wielokrotnych prób dobrania odpowiednich ilości preparatów nie pozwalały na uzyskanie wyższego sygnału niż tło. Na rysunku 37 przedstawiono wykres obrazujący przebieg reakcji dla wybranych wariantów polimerazy Phi29 w stosunku do fluorescencji tła (woda), dodatkowo przerywaną linią zaznaczono wyznaczony poziom tła.



Rysunek 37. Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla wybranych wariantów polimerazy Phi29, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). Linia czerwona – sygnał tła; linia przerywana – pomocnicza linia obrazująca poziom tła. P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Przedstawione na rysunku 37 wyniki sugerują brak aktywności enzymatycznej otrzymanych wariantów polimerazy Phi29. W celu potwierdzenia tej obserwacji przeprowadzono reakcję RCA (Metody 4.8.1) dla uzyskanych polimeraz Phi29 oraz dla białka komercyjnego. Niezależnie od ilości dodawanej polimerazy nie zaobserwowano amplifikacji DNA, podczas gdy dla polimerazy komercyjnej za każdym razem otrzymywano spodziewany produkt. Przykładowy wynik takiej reakcji przedstawiono na rysunku 38. Doświadczenie to potwierdziło brak aktywności uzyskanych preparatów białkowych polimerazy Phi29. W związku z tym w dalszej części pracy badano wyłącznie warianty polimerazy Bsu.



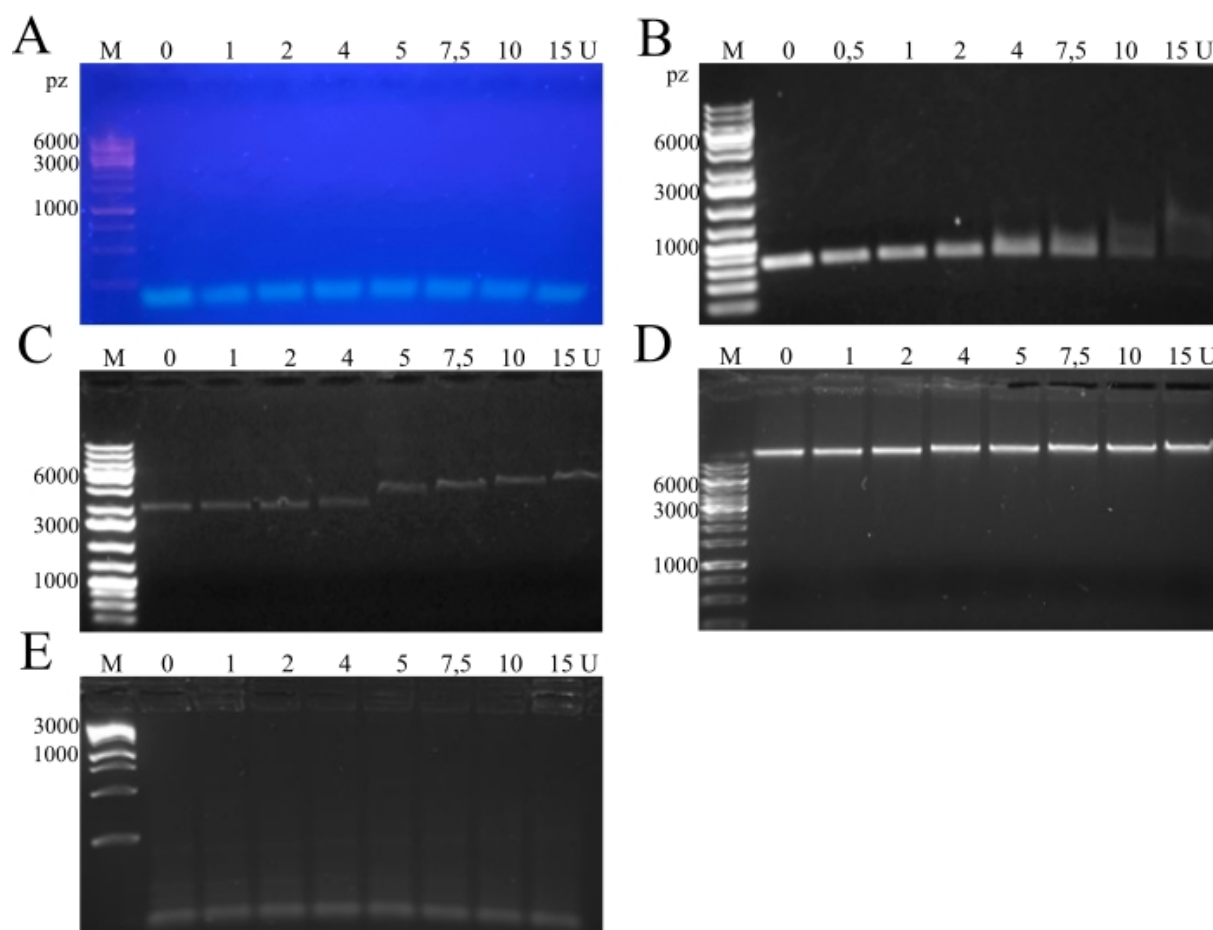
Rysunek 38. Analiza produktów reakcji RCA, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym dla wybranych wariantów polimerazy Phi29. K – kontrola pozytywna (reakcja z komercyjną polimerazą Phi29); HN_{SSB}LP–HN₁₅₀LP – reakcja z kolejnymi wybranymi wariantami fuzyjnymi polimerazy Phi29; HP – reakcja z referencyjną polimerazą Phi29 ze znacznikiem His-tag; M – marker SM0311 (Materiały 3.5); P – polimeraza Phi29; G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

5.3.2. Wyznaczanie zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazy DNA

Podstawową cechą partnerów fuzyjnych otrzymanych polimeraz DNA jest zdolność wiązania łańcuchów nukleotydowych. Określenie tych właściwości dla otrzymanych polimeraz DNA, przeprowadzono za pomocą testu wiązania różnych form kwasów nukleinowych (Metody 4.7.2). W celu jak najszerszego scharakteryzowania zdolności wiązania DNA i RNA przez otrzymane białka, do testu wybrano pięć różnych form kwasów nukleinowych: ssDNA – oligonukleotyd dT76, składający się z 76 reszt tymidyny z dołączonym znacznikiem fluorescencyjnym na 5'-końcu, dsDNA – produkt PCR o długości 330 pz, plazmidowe DNA – wektor pUC19 (Metody 4.3.2), genomowe DNA – izolowane z bakterii *B. subtilis* 168 (Metody 4.3.3) oraz RNA – izolowane z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Metody 4.3.1).

W pierwszej kolejności zbadano polimerazę komercyjną. Na rysunku 39 i w pierwszym wierszu tabeli 19 przedstawiono otrzymane wyniki (B_L NEB – polimeraza Bsu large (New England Biolabs, USA) (Materiały 3.3). Uzyskane dla niej wyniki stanowią punkt odniesienia, na podstawie którego można ocenić, czy

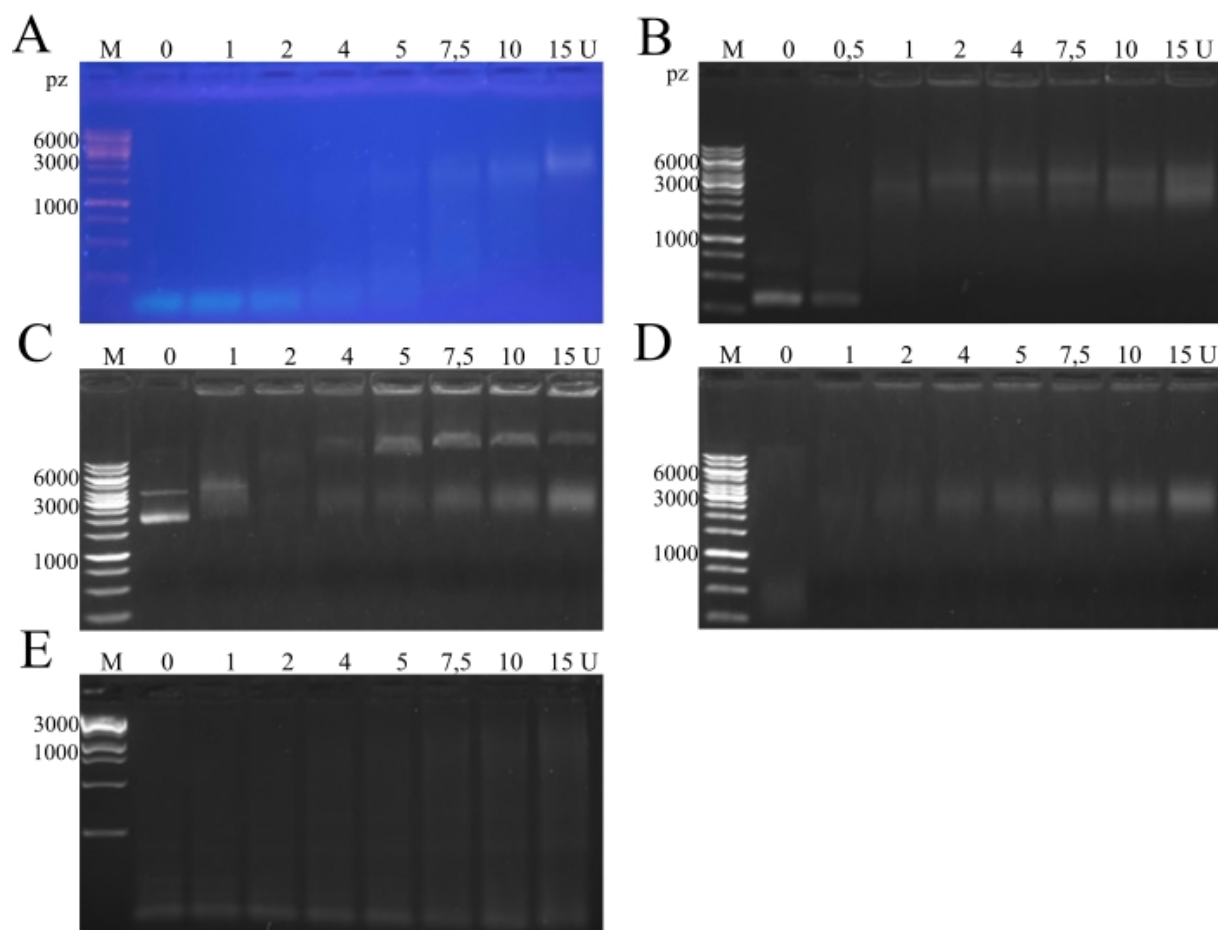
dana właściwość uległa zmianie. Polimeraza komercyjna nie wiąże pojedynczej nici DNA (Rysunek 39 A) oraz genomowego DNA (Rysunek 39 D). Bardzo słabo wiąże RNA (Rysunek 39 E), gdyż wiązanie jest widoczne dopiero przy dodaniu aż 15 U polimerazy. Natomiast wiąże dwuniciowe DNA (Rysunek 39 B), będące produktem PCR oraz plazmidowe DNA (Rysunek 39 C), w tym przypadku wystarczą odpowiednio 4 i 5 U aby zaobserwować wiązanie.



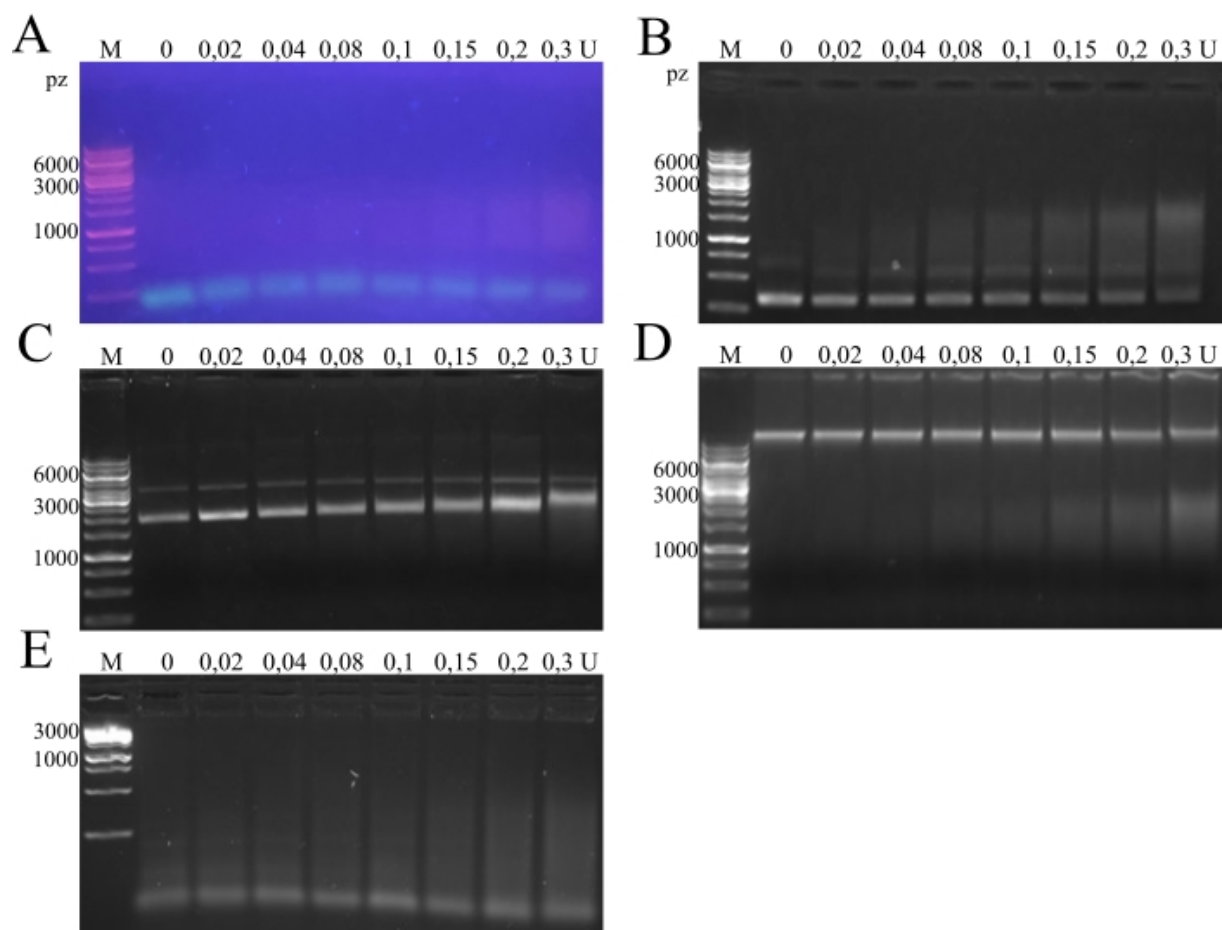
Rysunek 39. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę komercyjną Bsu large, za pomocą rozdzielu elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).

Po przeprowadzeniu badań dla polimerazy komercyjnej w analogiczny sposób przetestowano wszystkie aktywne preparaty polimeraz DNA (Metody 4.7.2). Otrzymane wyniki porównywano z polimerazą komercyjną. Na rysunkach 40 – 51 przedstawione zostały wyniki testów, na zdjęciu A przedstawione zostały wyniki wiązania ssDNA (znakowany fluoresceiną oligonukleotyd dT76), B – dsDNA (produkt PCR o długości

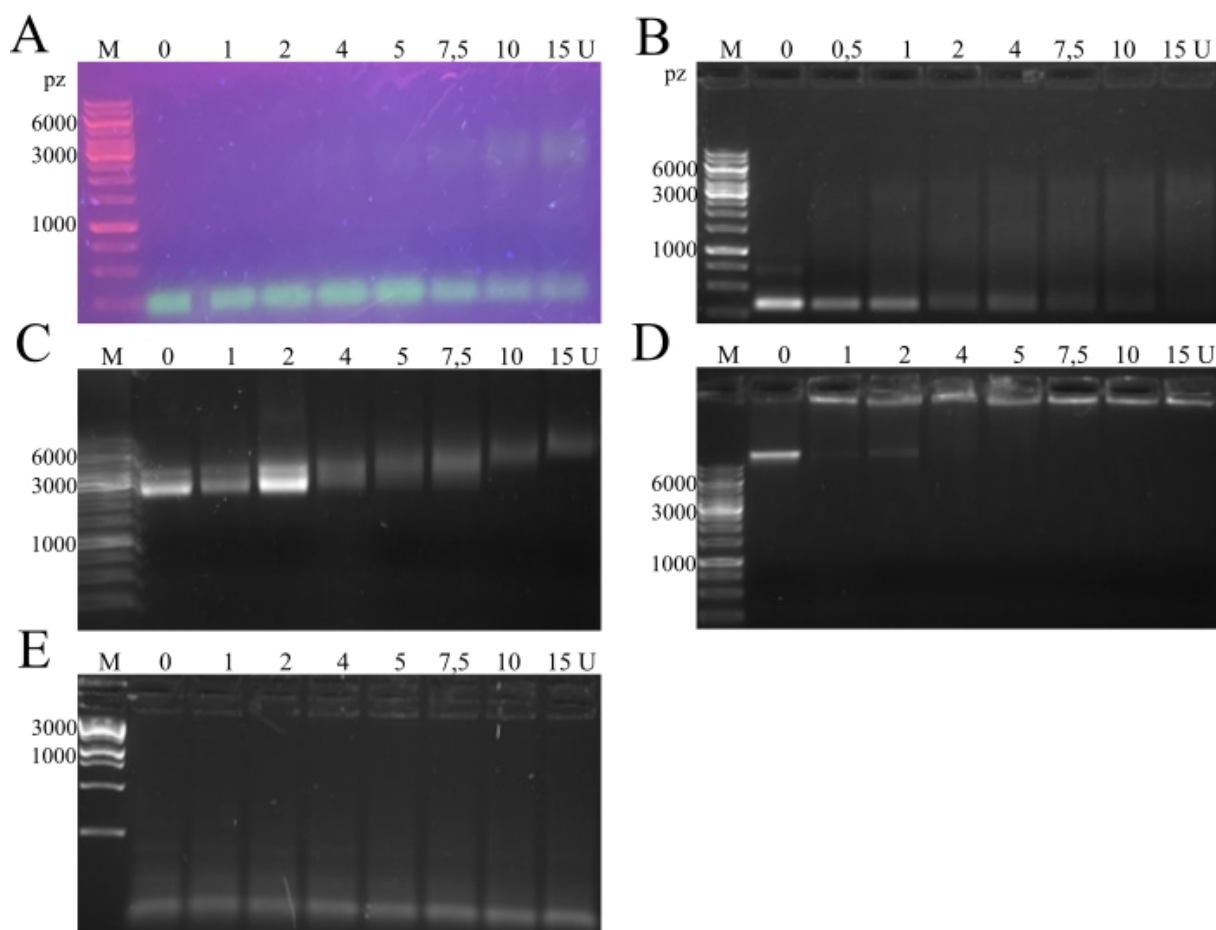
330pz), C – plazmidowego DNA (wektor pUC19 (Metody 4.3.2)), D – genomowego DNA (izolowane z bakterii *B. subtilis* 168 (Metody 4.3.3)) i E – RNA (izolowane z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Metody 4.3.1)). Dane liczbowe z tych testów zostały zebrane w tabeli 19.



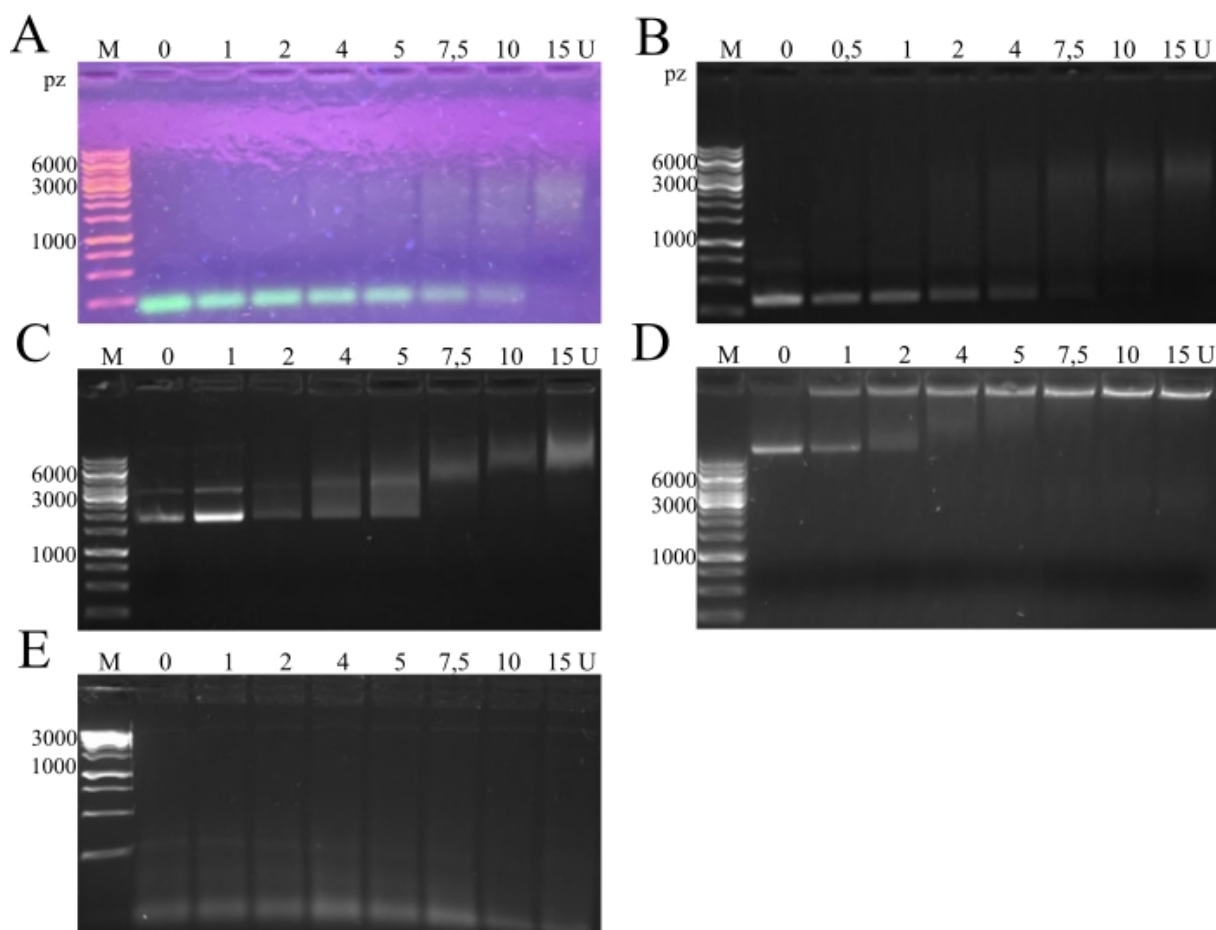
Rysunek 40. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę GLBLN_{SSB}H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



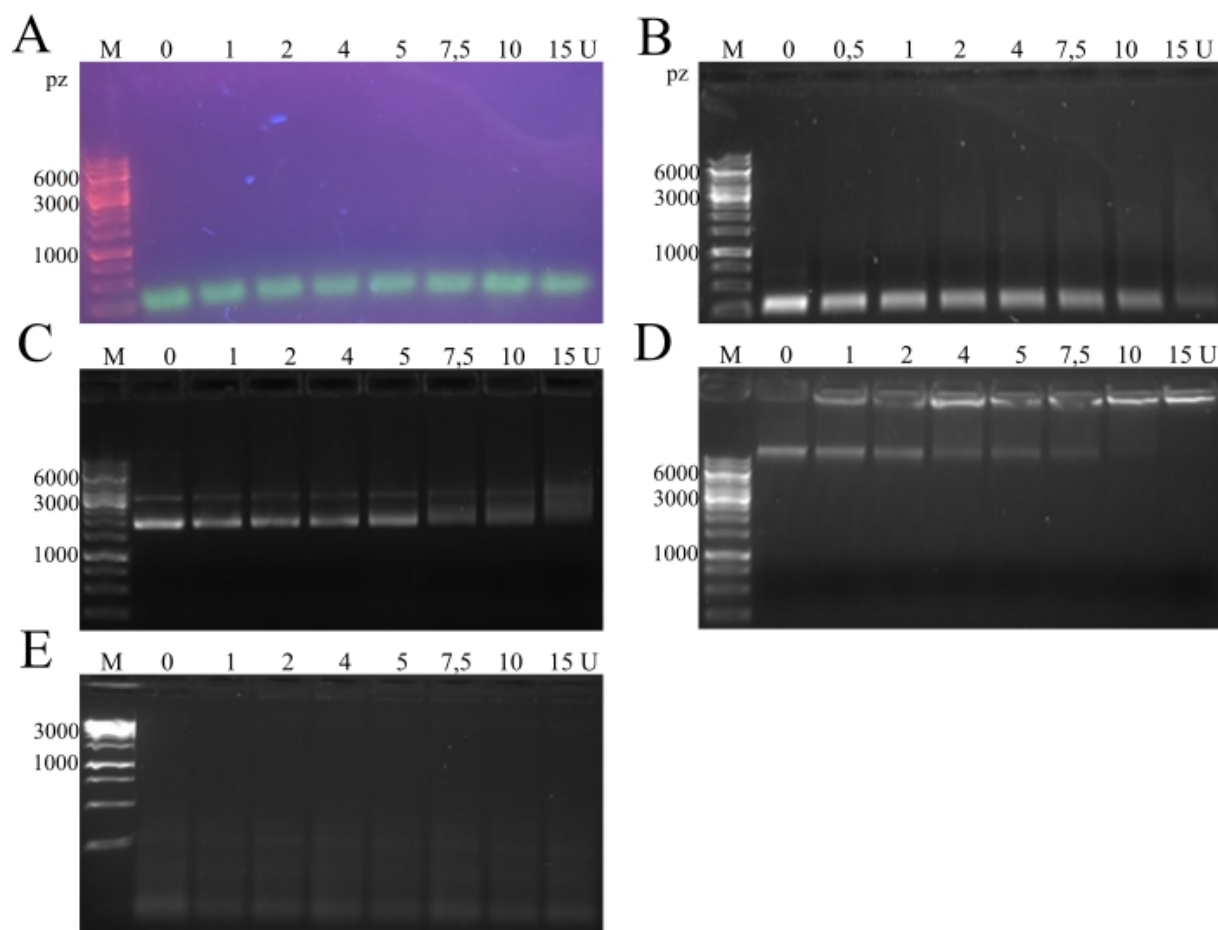
Rysunek 41. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLN_{SSB}H, za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



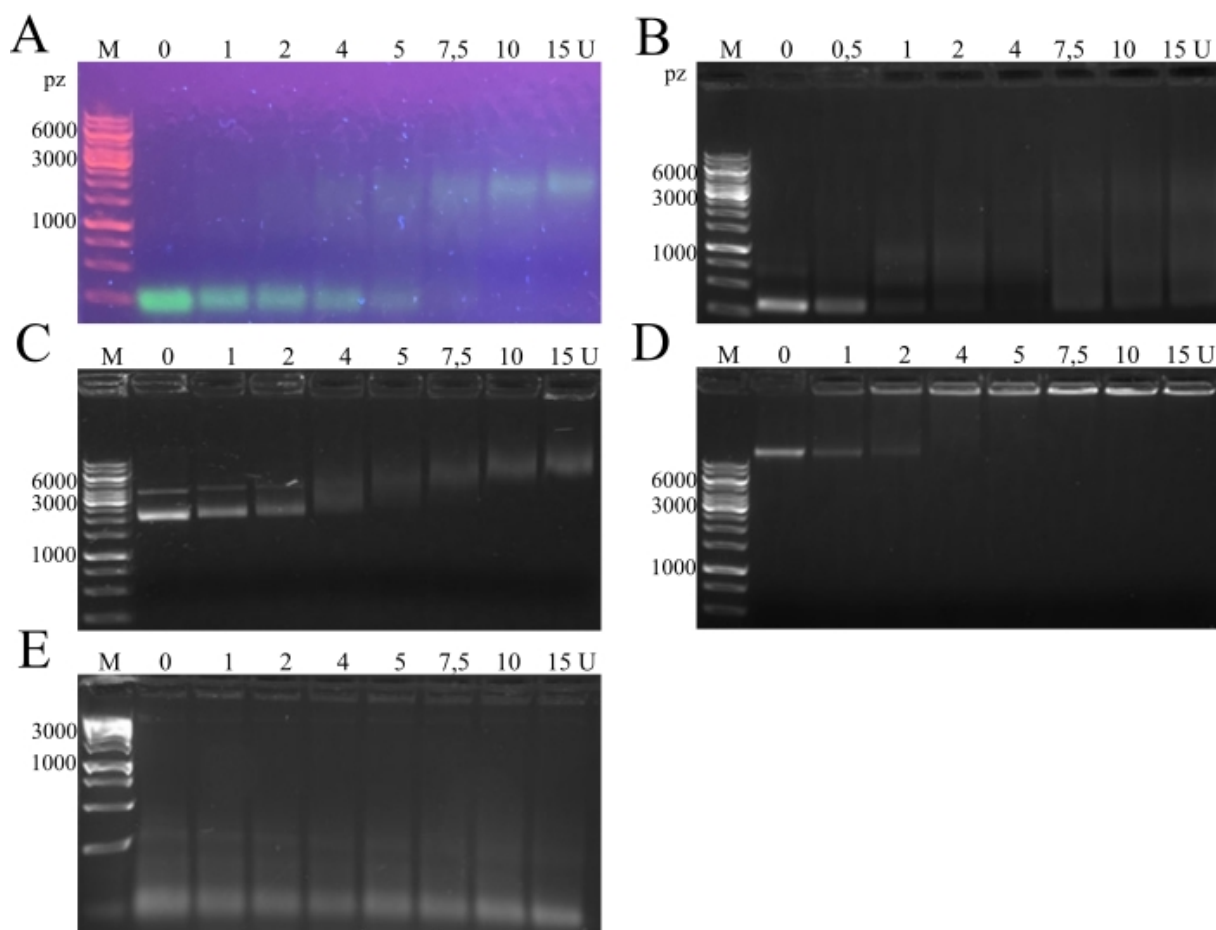
Rysunek 42. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HGLB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



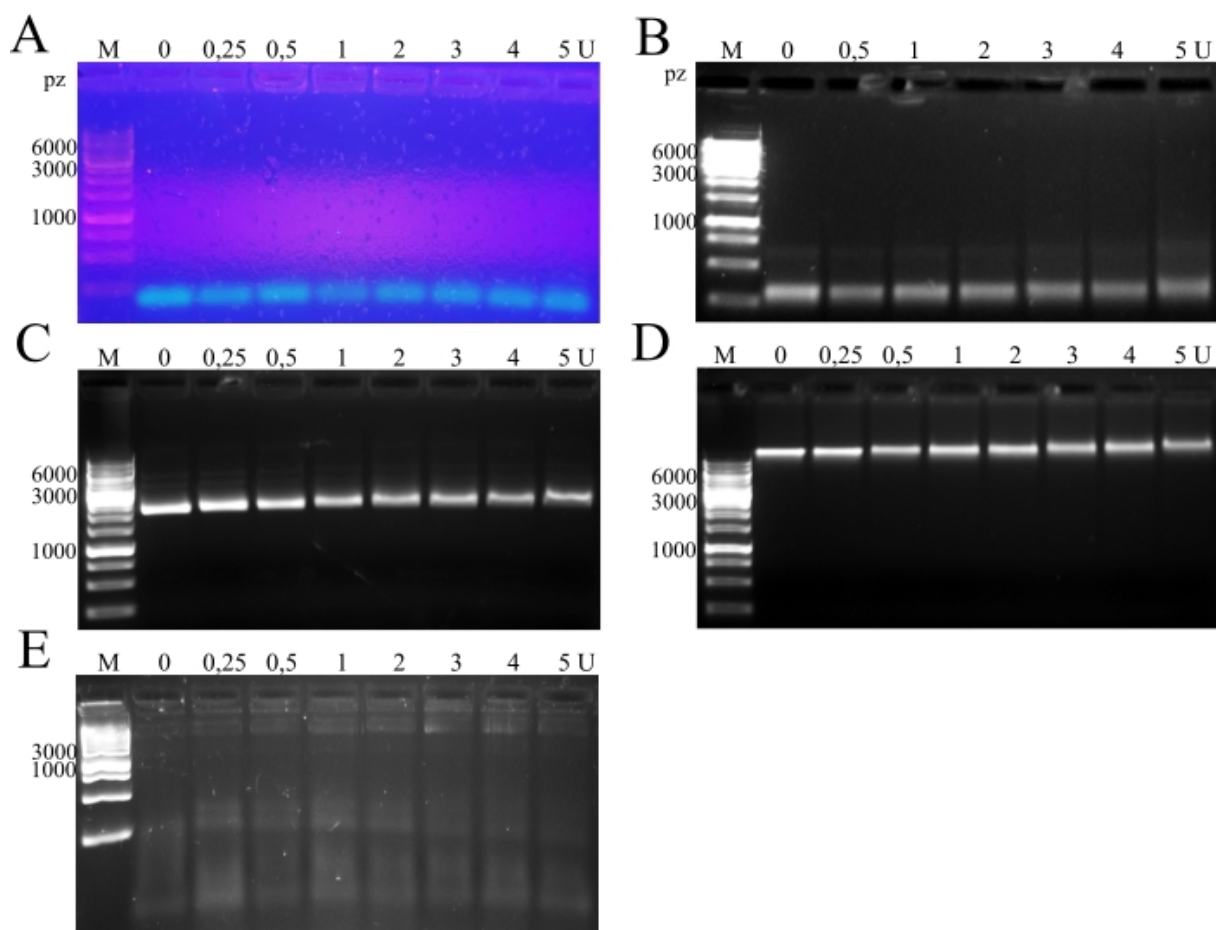
Rysunek 43. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę N_{SSB}LBLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



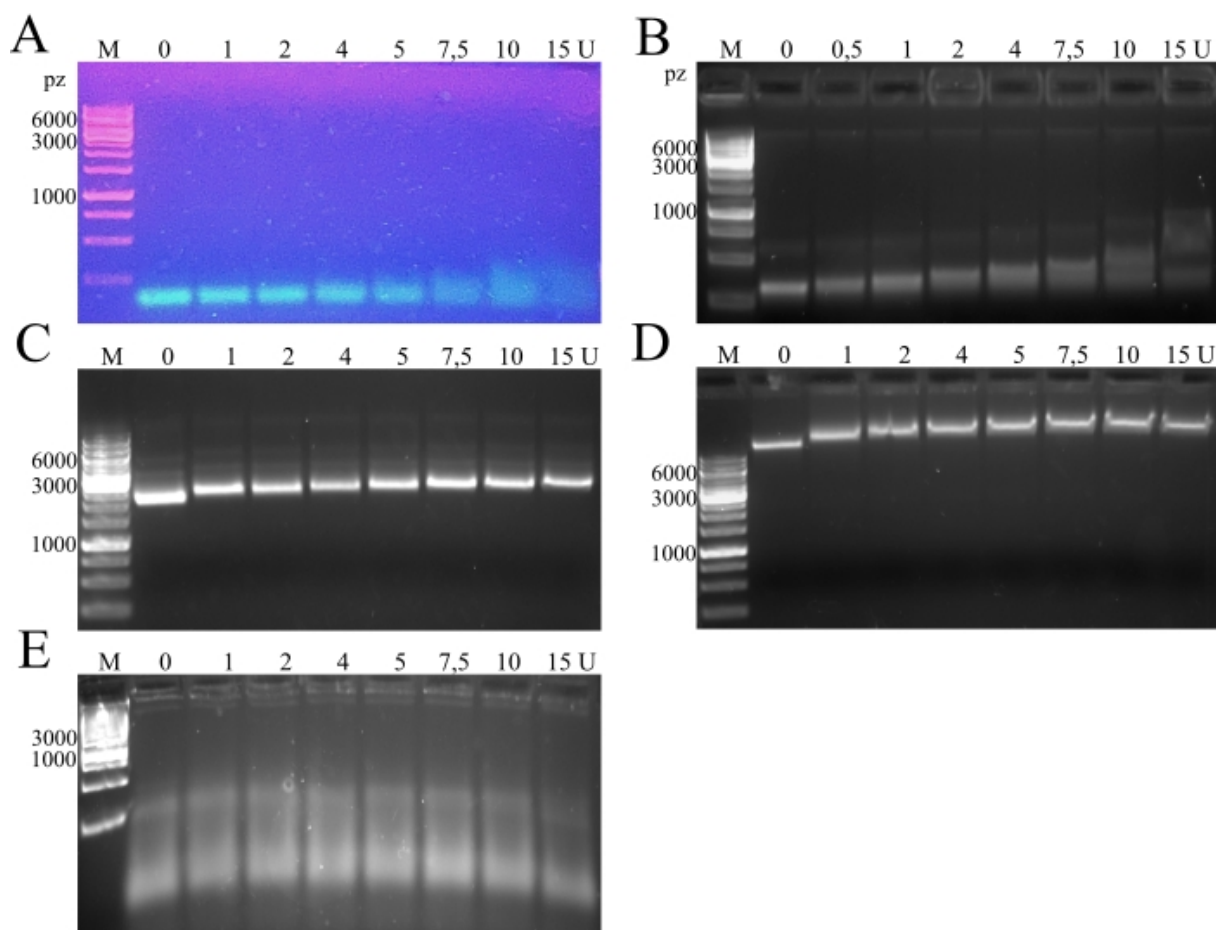
Rysunek 44. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HN_{SSB}LB, za pomocą rozdzielu elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



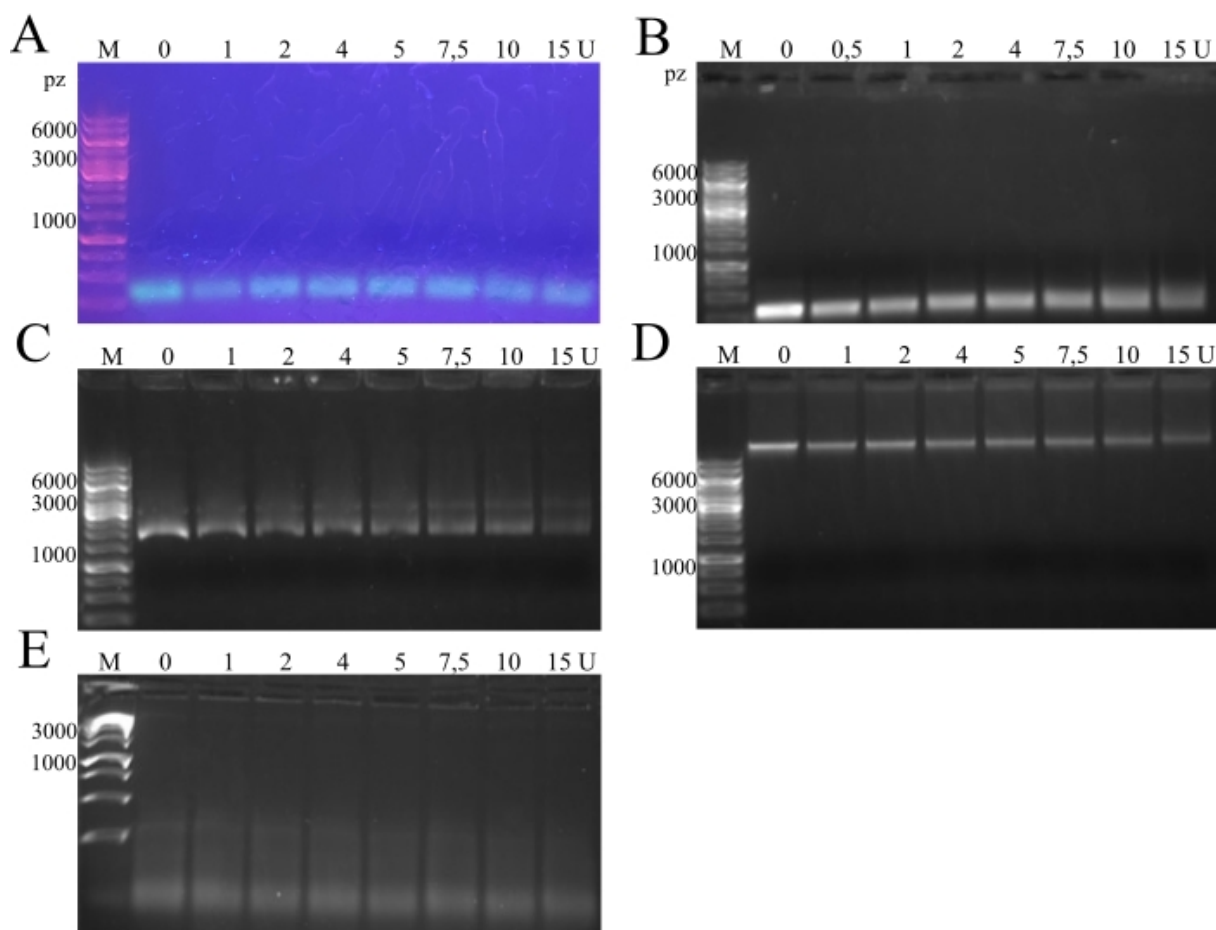
Rysunek 45. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLGH, za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



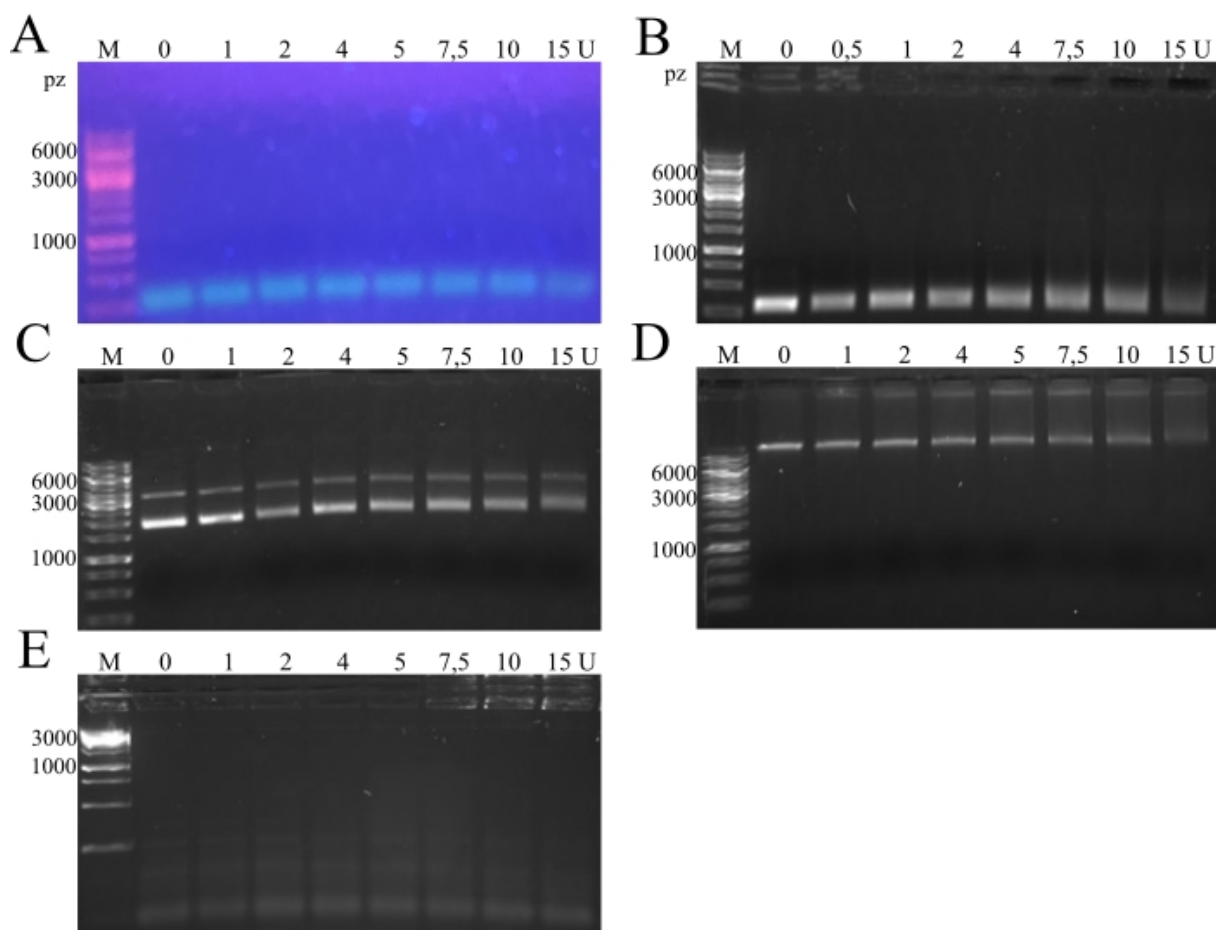
Rysunek 46. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLN₁₅₀H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



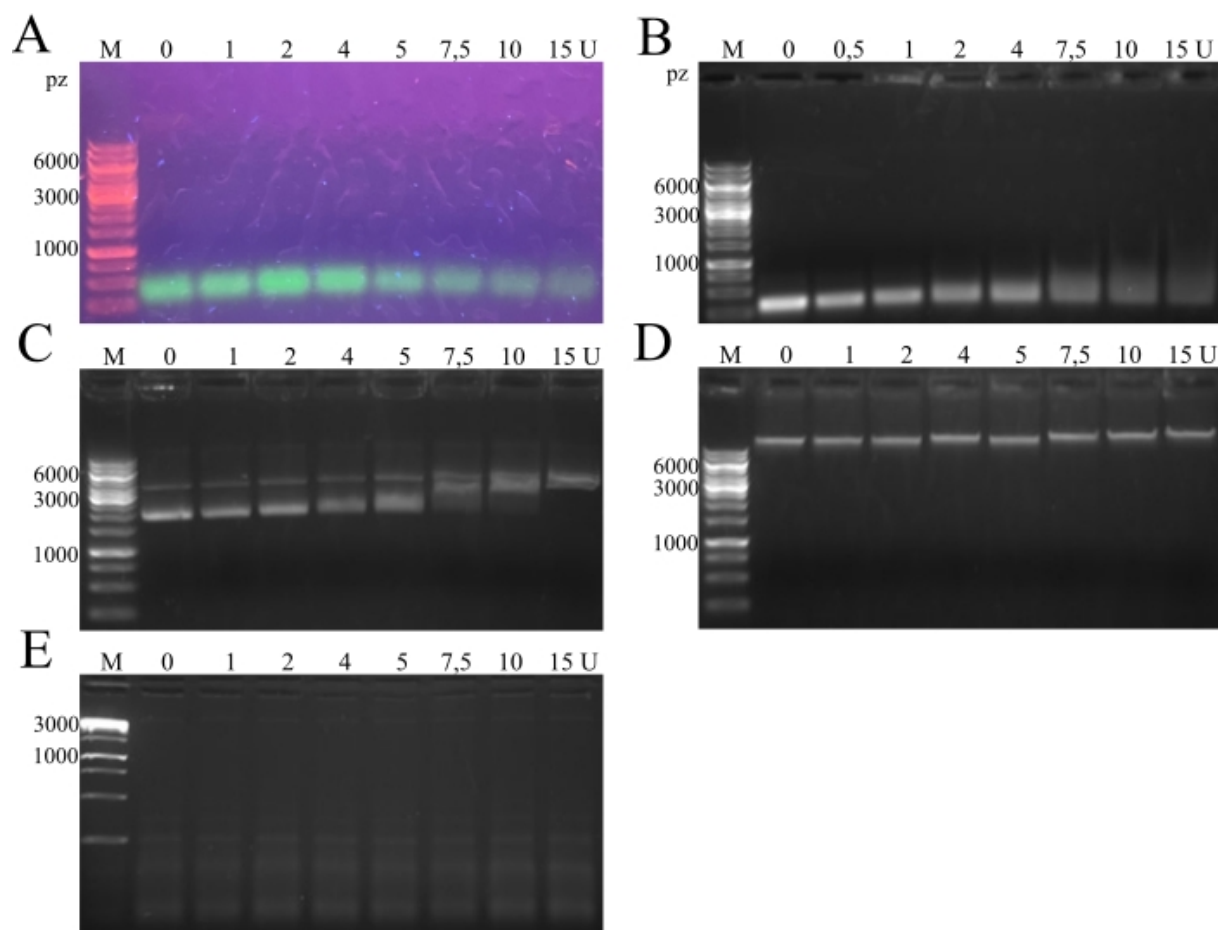
Rysunek 47. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę B_LLN₁₅₀H, za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



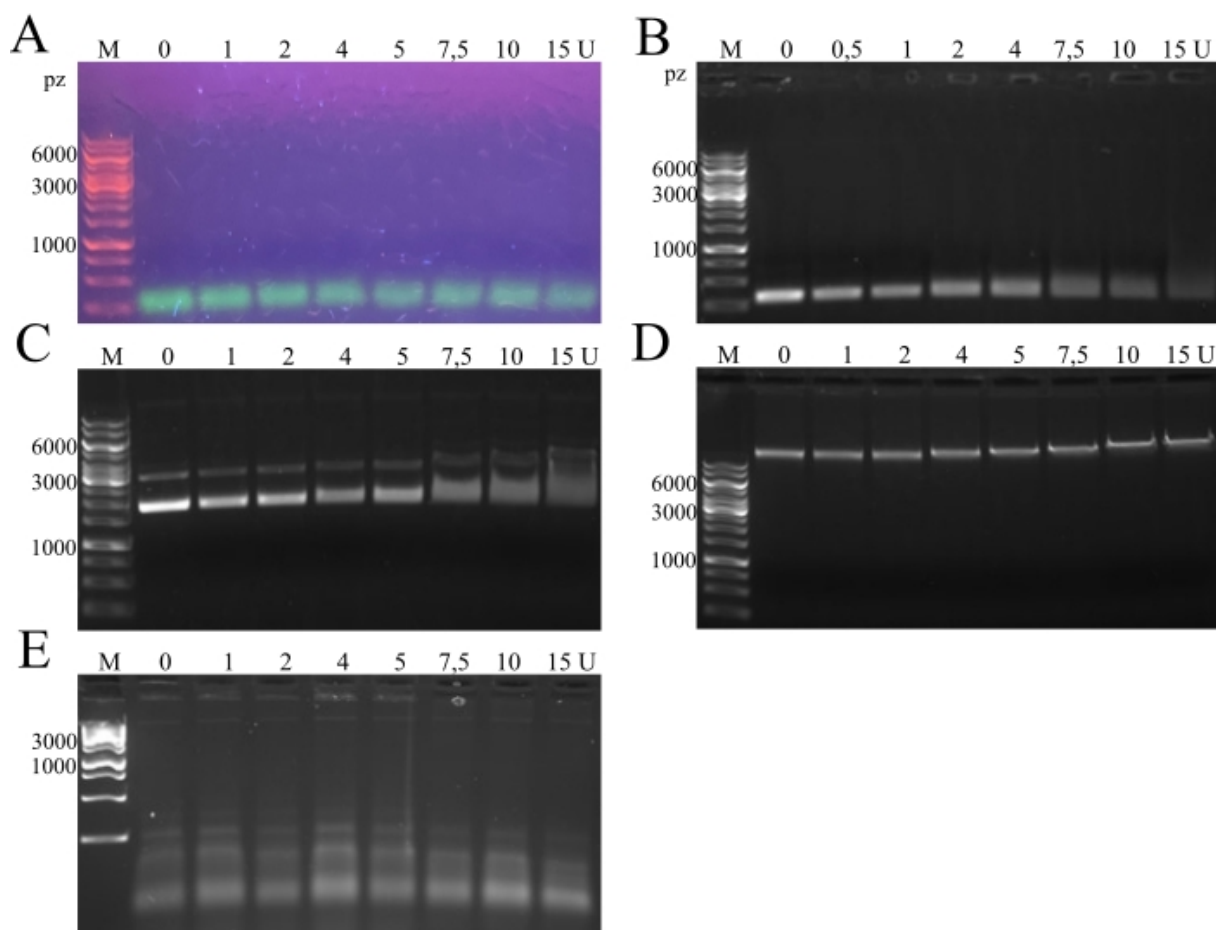
Rysunek 48. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę Bsu (wariant B), za pomocą rozdzielu elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 49. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HB, za pomocą rozdzielu elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 50. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę B_L za pomocą, rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 51. Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HB_L, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym. A – ssDNA; B – dsDNA; C – plazmidowego DNA; D – genomowego DNA; E – RNA. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).

Wyniki testów zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych dla wszystkich badanych polimeraz zestawiono w tabeli 19, podając ilość użytych jednostek aktywności do zaobserwowania opóźnienia migracji w żelu. W celu wskazania różnic wiązania względem komercyjnej polimerazy Bsu (New England Biolabs, USA) (B_L (NEB), pierwszy wiersz tabeli 19) zastosowano oznaczenia kolorystyczne. W przypadku poprawy właściwości otrzymanych polimeraz DNA względem polimerazy komercyjnej zastosowano kolor zielony, natomiast przy ich pogorszeniu – czerwony. Analogiczny system oznaczeń kolorystycznych został zastosowany w kolejnych tabelach przedstawiających wyniki testów badania pozostałych właściwości polimeraz DNA.

Białka BLN_{SSB}H i BLN₁₅₀H były badane w innym zakresie jednostek aktywności ze względu na niską wartość jednostkowości. Dodatkowo wartość 5 U wiązania dsDNA, plazmidowego i genomowego DNA przez polimerazę BLN₁₅₀H, wynika z zaobserwowanej niewielkiej różnicy w wysokości prążka co może sugerować wiązanie, lecz nie jest jednoznacznym potwierdzeniem tego wyniku. Dlatego wartości te w tabeli 19 oznaczono dodatkowo symbolem gwiazdki (*).

Tabela 19. Zestawienie ilość użytych jednostek aktywności polimeraz DNA do zaobserwowania opóźnienia migracji w żelu dla różnych form kwasów nukleinowych.

Wariant	ssDNA	dsDNA	Plazmidowe DNA	Genomowe DNA	RNA
B _L (NEB)	-	4	5	-	15
GLBLN _{SSB} H	4	2	1	1	7,5
BLN _{SSB} H	-	0,15	0,3	0,02	0,15
HGLB	7,5	4	4	1	-
N _{SSB} LBLGH	7,5	7,5	7,5	1	10
HN _{SSB} LB	-	15	7,5	1	-
BLGH	5	2	2	2	-
BLN ₁₅₀ H	-	5*	5*	5*	-
B _L LN ₁₅₀ H	7,5	5	1	1	-
B	-	15	-	4	-
HB	-	7,5	-	2	7,5
B _L	-	7,5	7,5	10	-
HB _L	-	7,5	7,5	-	-

B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag; * – wynik niejednoznaczny. Kolor zielony – poprawa właściwości względem polimerazy komercyjnej Bsu large; kolor czerwony – pogorszenie właściwości względem polimerazy komercyjnej Bsu large.

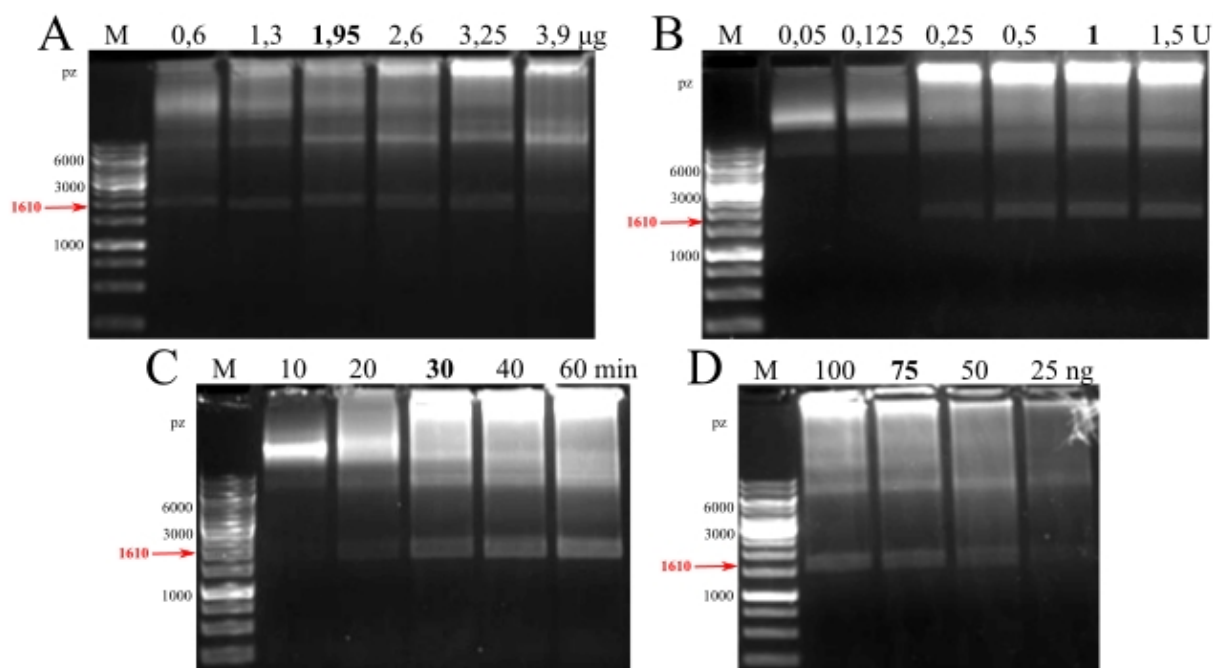
Analiza wyników zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych wskazała na to, że żadne z badanych białek referencyjnych nie wiążą pojedynczej nici DNA. Wiązanie podwójnej nici DNA przez białka referencyjne było słabsze niż w przypadku polimerazy komercyjnej. Co więcej, w przypadku plazmidowego DNA warianty B i HB nie wykazywały zdolności do jego wiązania, a warianty B_L i HB_L wiązały je słabiej. W przypadku wiązania genomowego DNA takiej właściwości nie wykazywał jedynie wariant HB_L, natomiast RNA wiązane było wyłącznie przez wariant HB. Okazało się, że białka referencyjne różnią się od polimerazy komercyjnej i kolejne testy należało analizować zarówno w odniesieniu do otrzymanych białek referencyjnych jak i białka komercyjnego.

Fuzyjne polimerazy Bsu zyskały zdolność wiązania pojedynczej nici DNA, z wyjątkiem wariantów wyłącznie z białkiem NeqSSB (BLN_{SSB}H i HN_{SSB}LB). Białka GLBLN_{SSB}H, BLN_{SSB}H i BLGH wiązały dwuniciowe DNA lepiej, białko HGLB wiązało je tak samo, a pozostałe wiązały słabiej niż kontrola komercyjna. W przypadku plazmidowego DNA zauważono poprawę właściwości wiązania dla GLBLN_{SSB}H, HGLB, BLN_{SSB}H, BLGH i B_LLN₁₅₀H oraz pogorszenie dla pozostałych polimeraz. Wszystkie białka fuzyjne wiązały genomowe DNA. RNA było lepiej wiązane przez GLBLN_{SSB}H, BLN_{SSB}H i N_{SSB}LBLGH, a pozostałe białka go nie wiązały.

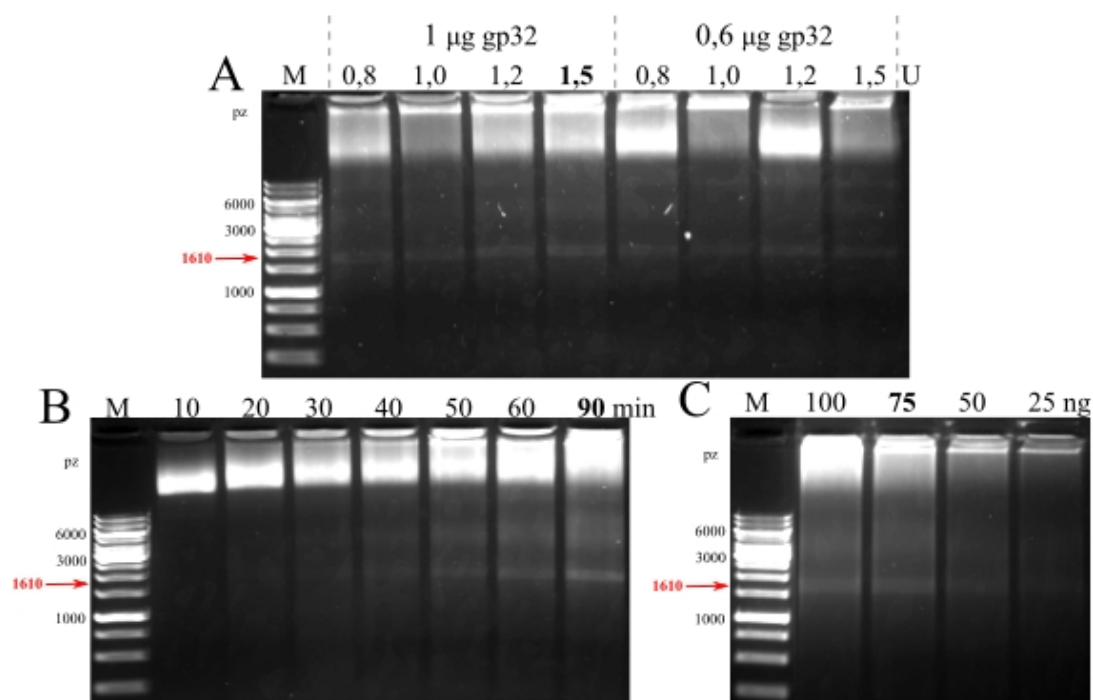
5.3.3. Optymalizacja warunków prowadzenia izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32

Każdy aktywny wariant uzyskanych polimeraz DNA zbadano pod względem optymalnych warunków prowadzenia izotermicznej amplifikacji DNA. Badano wpływ ilości białka gp32, polimerazy, matrycy oraz czasu trwania reakcji (Metody 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3 i 4.9.4). Warunki te wpływają na skuteczność amplifikacji DNA, dlatego ich optymalizacja była niezbędna, aby uzyskać wiarygodne i powtarzalne rezultaty. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunkach 52 – 60 określono warunki optymalne, pozwalające na wydajne powielenie DNA i nie będące jednocześnie warunkami granicznymi. Na początku wyznaczono parametry dla polimerazy komercyjnej, a wyniki badań przedstawiono na rysunku 52 oraz w pierwszym wierszu tabeli 20. Wyniki dla pozostałych polimeraz obrazują rysunki 53

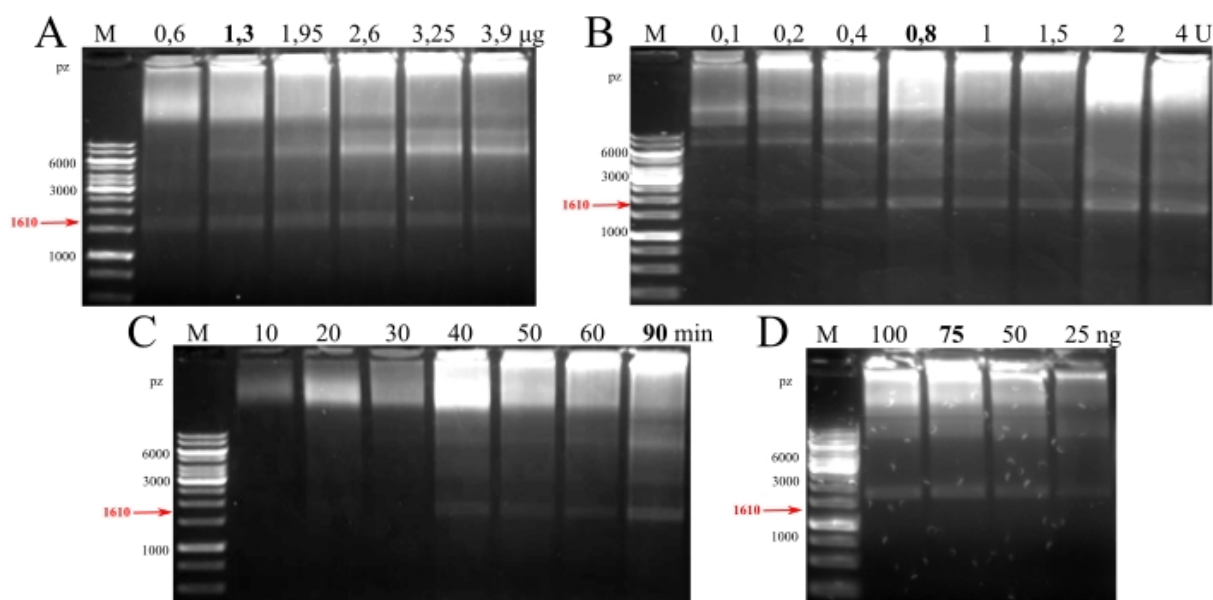
– 60, natomiast wartości liczbowe zebrano w tabeli 20. Dla wariantów HGLB i BLGH (Rysunki 53 i 56) konieczna była modyfikacja procedur ze względu na silne oddziaływanie białek z matrycą, dlatego dla obu polimeraz wyznaczono optymalny stosunek ilości białka gp32 do ilości polimerazy. Na rysunkach 52 – 60 czerwoną strzałką zaznaczono produkt reakcji o długości 1610 pz, a pogrubioną czcionką optymalne parametry.



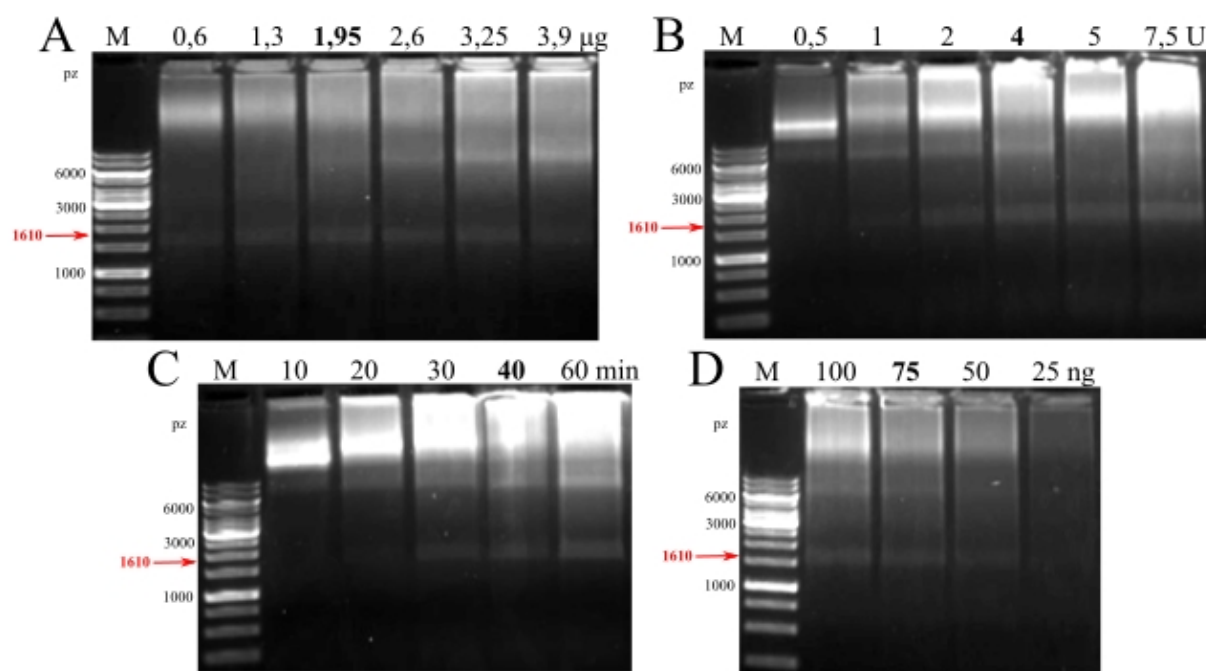
Rysunek 52. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy komercyjnej Bsu large, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



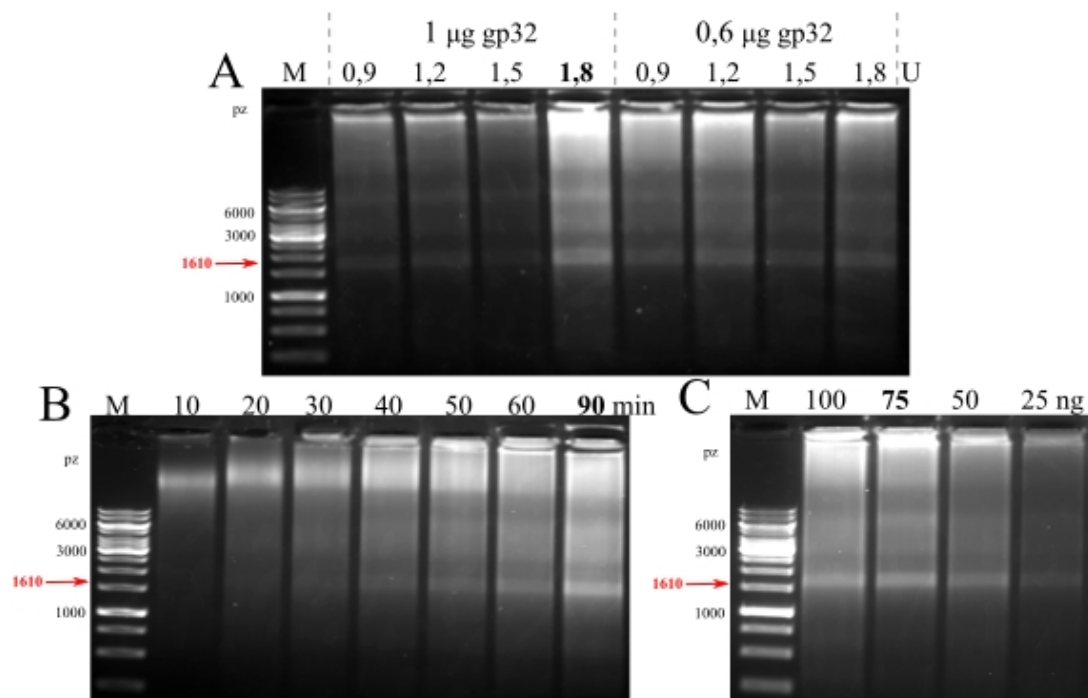
Rysunek 53. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy HGLB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – stosunek ilości białka gp32 do polimerazy; B – czas reakcji; C – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



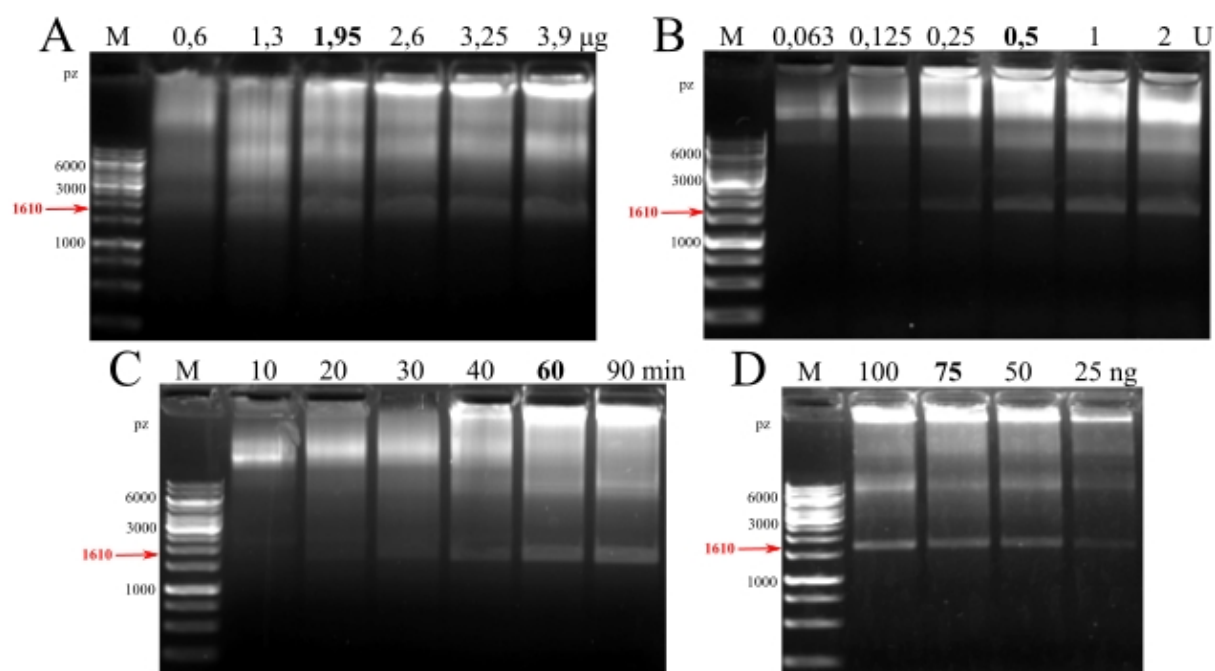
Rysunek 54. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy N_{SSB}LBLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



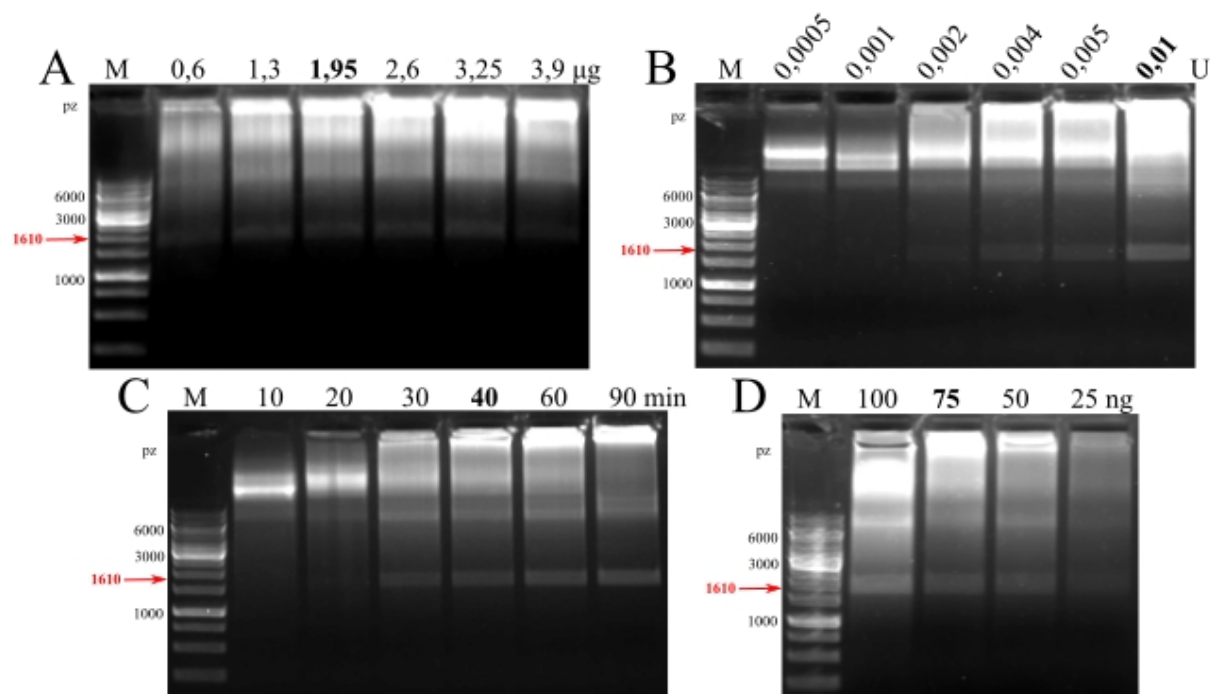
Rysunek 55. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy HN_{SSB}LB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



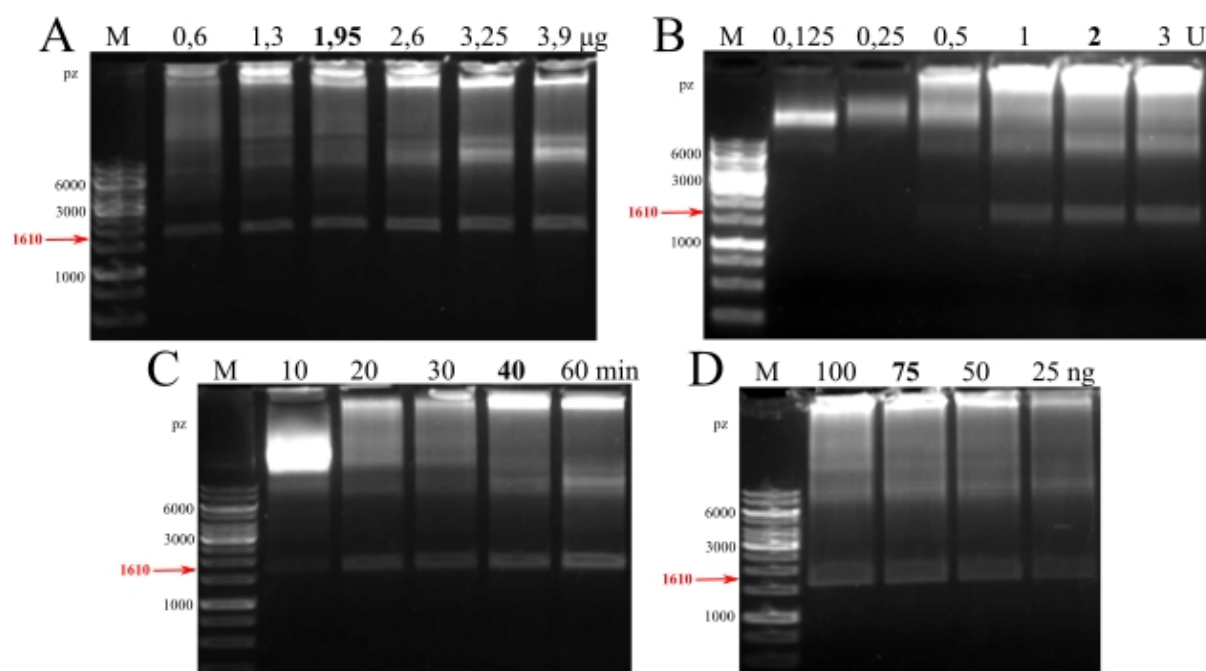
Rysunek 56. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy BLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – stosunek ilości białka gp32 do polimerazy; B – czas reakcji; C – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



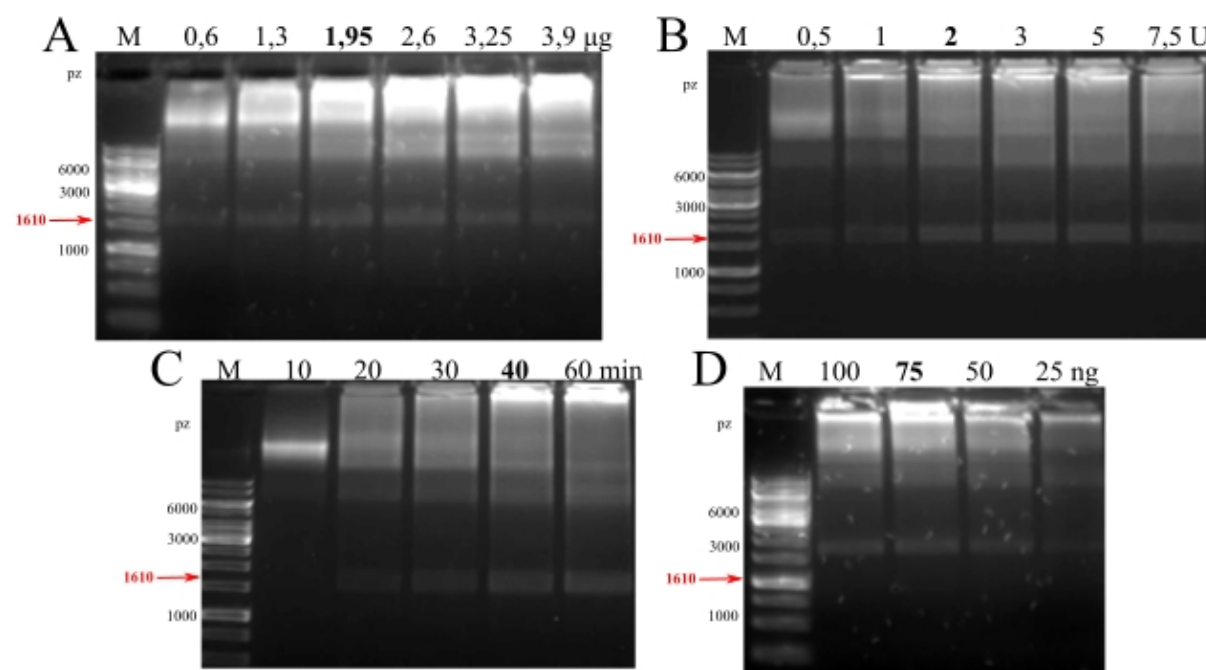
Rysunek 57. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy BLN₁₅₀H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 58. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy BL_LLN₁₅₀H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 59. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy B_L , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).



Rysunek 60. Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy H_{B_L} , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – ilość białka gp32; B – ilość polimerazy; C – czas reakcji; D – ilość matrycy. M – marker SM0311 (Materiały 3.5).

Tabela 20. Zestawienie optymalnych warunków izotermicznej amplifikacji DNA dla wszystkich badanych polimeraz.

Wariant	Ilość gp32 [µg]	Ilość polimerazy [U]	Czas reakcji [min]	Ilość matrycy [ng]
B _L (NEB)	1,9	2	30	75
HGLB	1	1,5	90	75
N _{SSB} LBLGH	1,9	0,8	90	75
HN _{SSB} LB	1,9	4	40	75
BLGH	1	1,8	90	75
BLN ₁₅₀ H	1,9	0,5	60	75
B _L LN ₁₅₀ H	1,9	0,01	40	75
B _L	1,9	2	40	75
HB _L	1,9	2	40	75

B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag.

Analizując uzyskane wyniki, wyznaczono również minimalne ilości polimerazy i matrycy oraz najkrótszy czas reakcji, czyli wartości graniczne dla których powstaje specyficzny produkt. Porównanie minimalnych warunków jest bardziej miarodajne niż porównywanie optymalnych, ze względu na eliminację subiektywnego oceniania wydajności reakcji. Dane te przedstawiono w tabeli 21.

Wyższą czułość niż polimeraza referencyjna wykazują warianty BLGH, BLN₁₅₀H, B_LLN₁₅₀H, B_L i HB_L. Minimalny czas reakcji nie uległ poprawie dla żadnej z badanych polimeraz DNA, a wręcz pogorszył się dla N_{SSB}LBLGH, HN_{SSB}LB, BLGH i HB_L. W przypadku minimalnej ilości jednostek polimerazy zauważono poprawę dla wariantów N_{SSB}LBLGH, BLN₁₅₀H i B_LLN₁₅₀H, oraz pogorszenie dla HN_{SSB}LB, B_L i HB_L. Dla wariantów HGLB i BLGH nie wyznaczono minimalnej ilości polimerazy. Szczególną uwagę warto zwrócić na bardzo małą ilość polimerazy B_LLN₁₅₀H koniecznej do przeprowadzenia reakcji. Względem polimerazy komercyjnej jest to aż 125-krotna różnica, co jest znaczną poprawą efektywności amplifikacji DNA i wyróżnia się na tle pozostałych polimeraz DNA.

Tabela 21. Zestawienie minimalnych ilości polimerazy i matrycy oraz najkrótszego czasu izotermicznej amplifikacji DNA dla wszystkich badanych polimeraz.

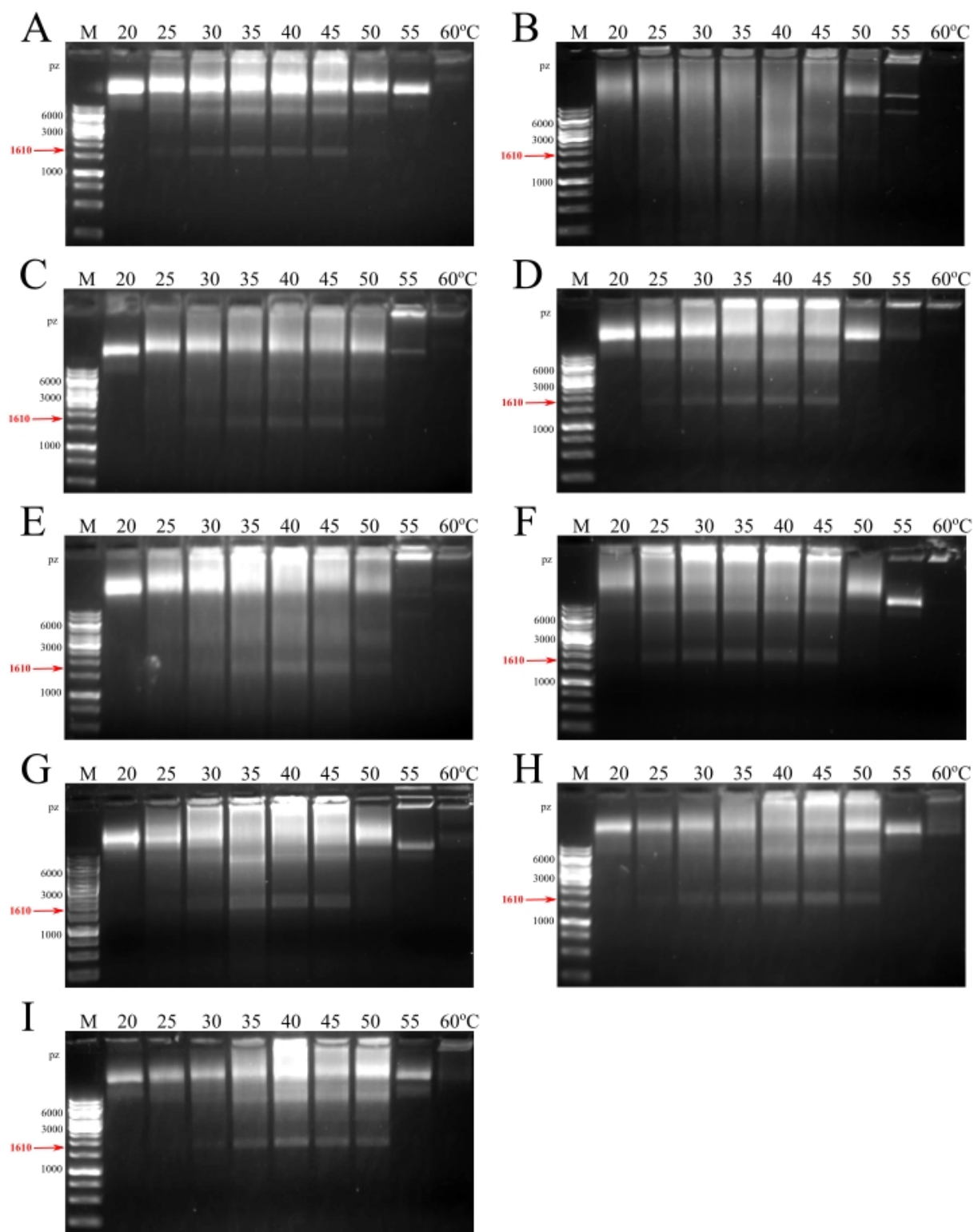
Wariant	Ilość polimerazy [U]	Czas reakcji [min]	Ilość matrycy [ng]
B _L (NEB)	0,25	20	50
HGLB	-	20	50
N _{SSB} LBLGH	0,2	30	50
HN _{SSB} LB	1	30	50
BLGH	-	30	25
BLN ₁₅₀ H	0,125	20	25
B _L LN ₁₅₀ H	0,002	20	25
B _L	0,5	20	25
HB _L	1	30	25

B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag. Kolor zielony – poprawa parametru względem polimerazy komercyjnej Bsu large; kolor czerwony – pogorszenie parametru względem polimerazy komercyjnej Bsu large.

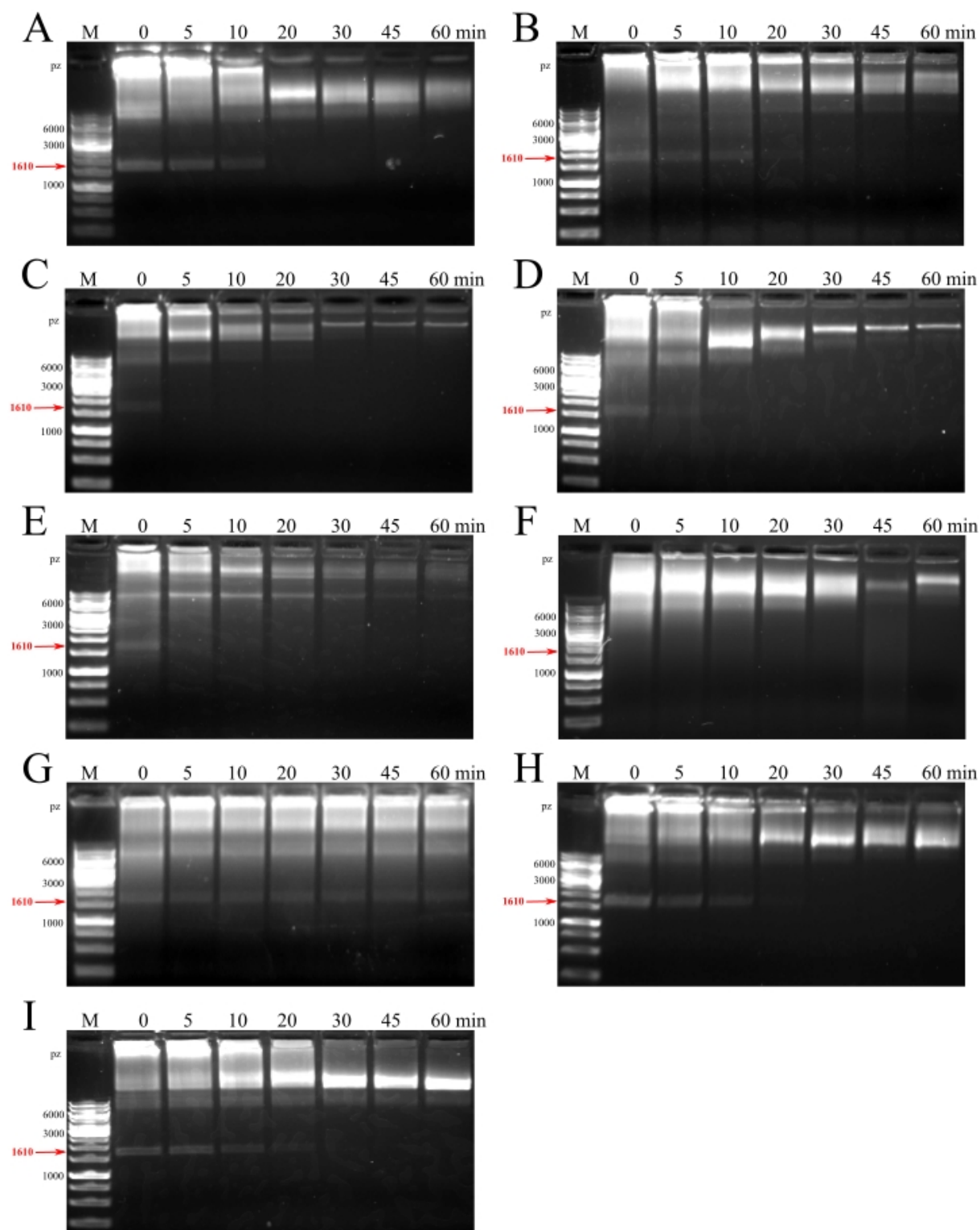
5.3.4. Wpływ temperatury na właściwości polimeraz DNA

Temperatura może wpływać zarówno na przebieg reakcji amplifikacji DNA, jak również na aktywność polimerazy. W pierwszej kolejności zbadano zakres temperatur prowadzenia reakcji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimeraz DNA (20-60°C) (Metody 4.10.1). Wyniki przedstawiono na rysunku 61, a dane liczbowe zakresu temperatur zebrano w tabeli 22.

W drugim teście polimerazy zostały najpierw poddane inkubacji w podwyższonej temperaturze (55°C) przez określony czas, a następnie wykorzystane w reakcji izotermicznej amplifikacji prowadzonej w optymalnych warunkach temperaturowych, co umożliwiło ocenę ich stabilności w podwyższonej 55°C w czasie (Metody 4.10.2). Wyniki przedstawiono na rysunku 62, a dane liczbowe maksymalnego czasu inkubacji w podwyższonej temperaturze, po którym polimeraza nie traci aktywności, zebrano również w tabeli 22.



Rysunek 61. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w zakresie temperatur 20-60°C dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.

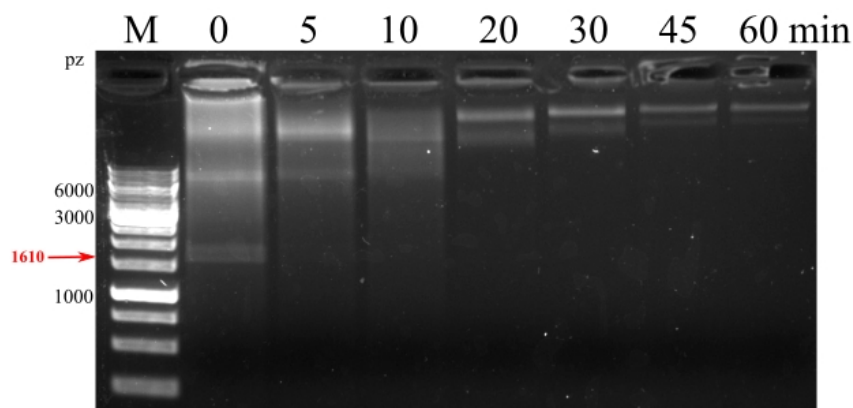


Rysunek 62. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA z zastosowaniem polimeraz po inkubacji w 55°C w różnym czasie, za pomocą rozdziłu elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.

Zakres temperatur, w jakich polimerazy powielają DNA w reakcji izotermicznej dla wszystkich badanych białek jest zbliżony (Rysunek 61). Mimo to, wyróżnić można cztery zakresy: 25-45°C, 30-50°C, 25-50°C i 30-45°C. W pierwszym z wymienionych zakresów aktywna jest zarówno polimeraza komercyjna jak i polimerazy HGLB, HN_{SSB}LB i BLN₁₅₀H. W wyższych temperaturach (30-50°C) powielane jest DNA z udziałem polimeraz N_{SSB}LBLGH, BLGH i HB_L. Natomiast polimeraza B_L amplifikuje DNA w zakresie 25-50°C, a B_LLN₁₅₀H w 30-45°C.

Wyniki testu stabilności w podwyższonej temperaturze (55°C) (Rysunek 62) charakteryzowały się większą różnorodnością. Polimeraza B_LLN₁₅₀H wykazała 6-krotny wzrost stabilności w podwyższonej temperaturze (55°C) w porównaniu do białka komercyjnego. Dla polimeraz HGLB i HB_L zaobserwowano 2-krotny wzrost stabilności (do 20 min), a dla białka B_L nie zaobserwowano różnicy względem polimerazy komercyjnej. Pozostałe białka były mniej stabilne w podwyższonej temperaturze (55°C).

Ze względu na wysoką stabilność polimerazy B_LLN₁₅₀H w 55°C sprawdzono jej stabilność dodatkowo w temperaturze 60°C, lecz polimeraza nie wykazała stabilności w tej temperaturze. Wynik tego testu przedstawiono na rysunku 63, a informacje o braku stabilności polimerazy w 60°C zamieszczono w tabeli 22.



Rysunek 63. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA z zastosowaniem polimerazy B_LLN₁₅₀H po inkubacji w 60°C w różnym czasie, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. M – marker SM0311.

Tabela 22. Zestawienie danych wpływu temperatury na badane polimerazy.

Wariant	Zakres temperatur* [°C]	Stabilność polimeraz w 55°C [min]	Stabilność polimeraz w 60°C [min]
B _L (NEB)	25-45	10	-
HGLB	25-45	20	-
N _{SSB} LBLGH	30-50	0	-
HN _{SSB} LB	25-45	5	-
BLGH	30-50	0	-
BLN ₁₅₀ H	25-45	-	-
B _L LN ₁₅₀ H	30-45	60	0
B _L	25-50	10	-
HB _L	30-50	20	-

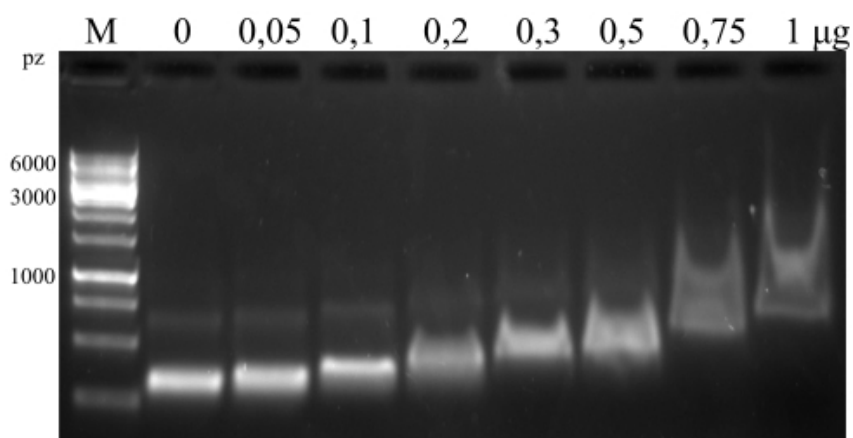
* – zakres temperatur w jakich prowadzono izotermiczną amplifikację DNA z wykorzystaniem różnych polimeraz DNA. B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag. Kolor zielony – poprawa właściwości względem polimerazy komercyjnej Bsu large; kolor czerwony – pogorszenie właściwości względem polimerazy komercyjnej Bsu large.

5.3.5. Tolerancja polimeraz DNA na obecność inhibitorów amplifikacji

Zbadano również tolerancję polimeraz DNA na obecność inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej. W tym celu przeprowadzono reakcje z czterema wybranymi inhibitorami: heparyną, laktoferyną, mocznikiem oraz kwasem humusowym. Reakcje przeprowadzono zgodnie z opisem w rozdziale Metody 4.10.3. Wyniki wpływu inhibitorów na polimerazy DNA przedstawiono na rysunkach 65 – 68, a ilości inhibitora, przy których nie widać specyficznego produktu DNA, zebrano w tabeli 23.

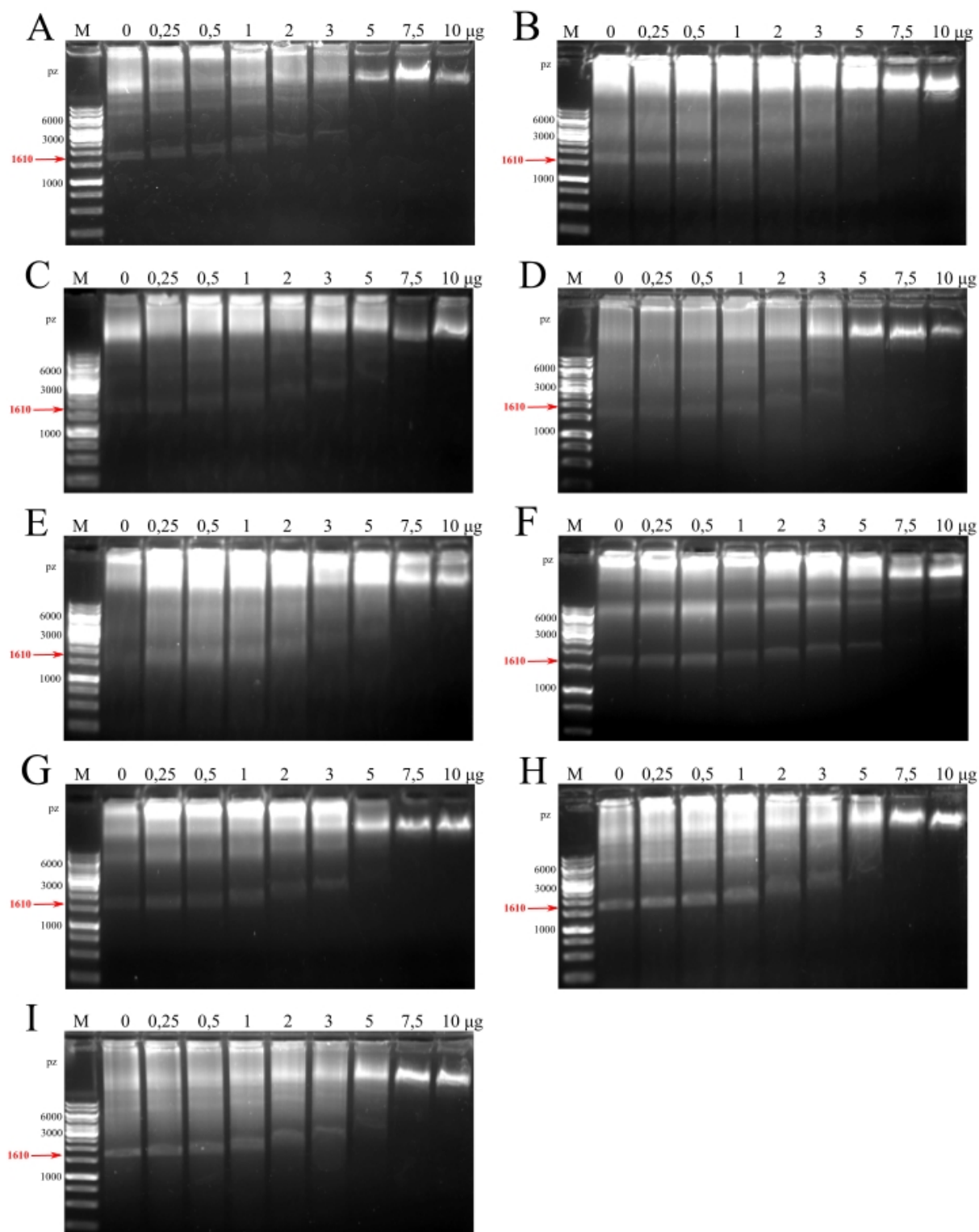
Wraz ze wzrostem stężenia laktoferyny zaobserwowano stopniowe opóźnienie migracji produktu PCR o długości 330 pz (rysunek 64), co pokrywa się z doniesieniami literaturowymi i zostało przedstawione w rozdziale Wstęp 4.10.3, opisującym mechanizm inhibicji poprzez wiązanie laktoferyny z DNA. Doświadczenie przeprowadzono przy użyciu analogicznej metody, jak w przypadku badania zdolności

wiązania kwasów nukleinowych (Metody 4.7.2), z tą różnicą, że zamiast polimerazy dodawano wzrastające ilości laktoferyny (0-1 μg).

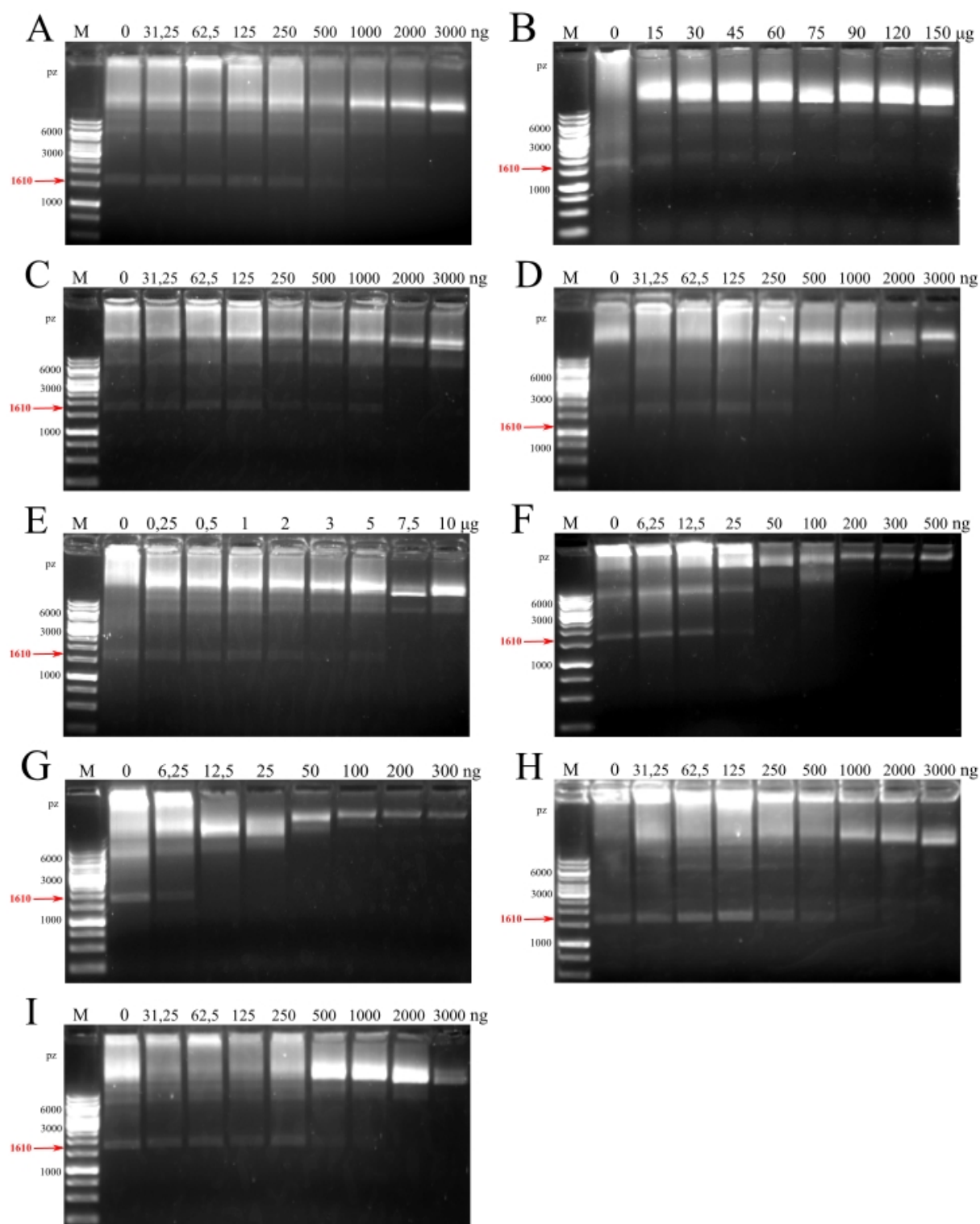


Rysunek 64. Analiza zdolności wiązania produktu PCR o długości 330 pz przez laktoferynę, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. M – marker SM0311.

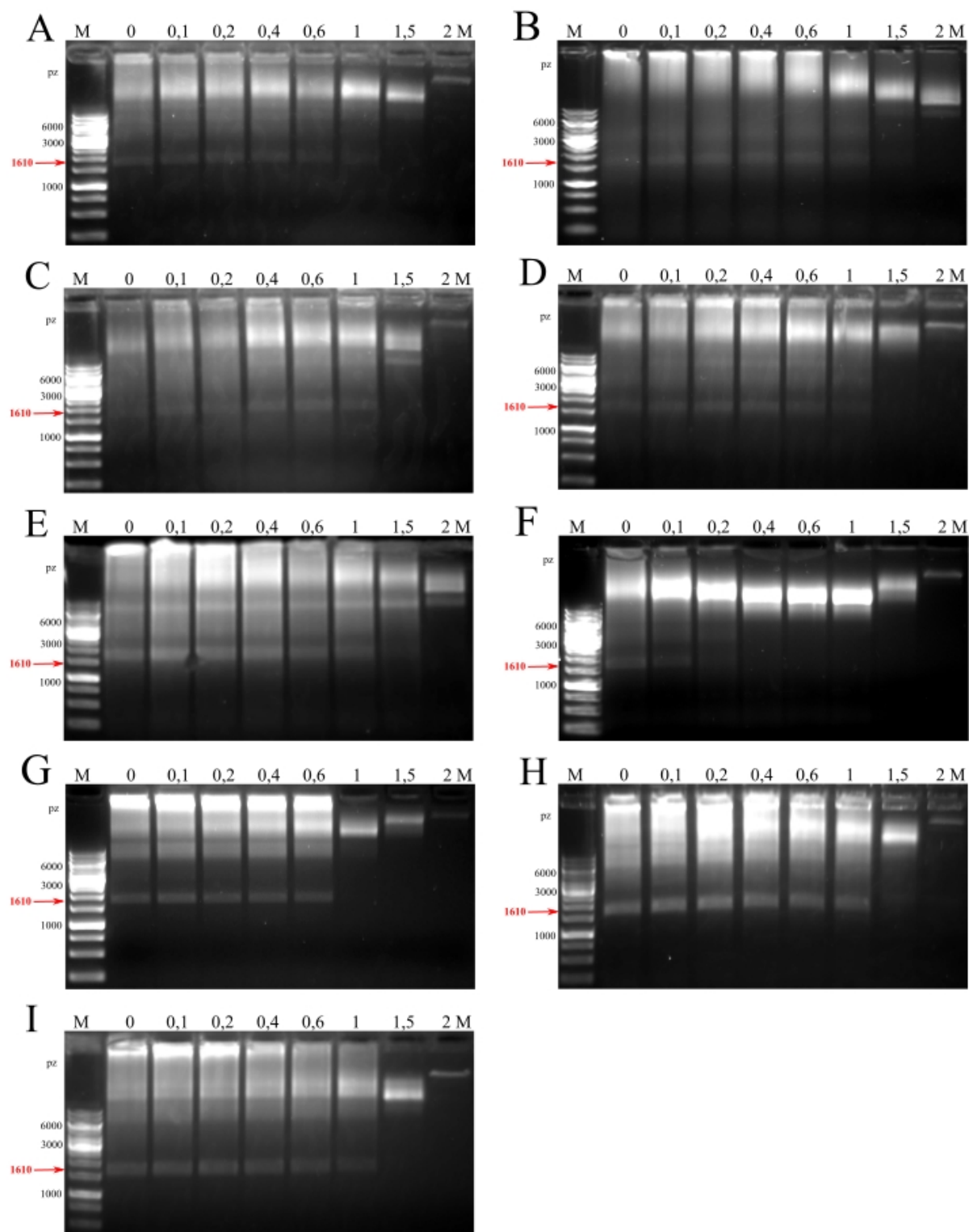
Pozostałe inhibitory nie wpływały na opóźnienie migracji w żelu produktu izotermicznej amplifikacji DNA, w związku z tym nie było konieczności prowadzenia dodatkowych testów.



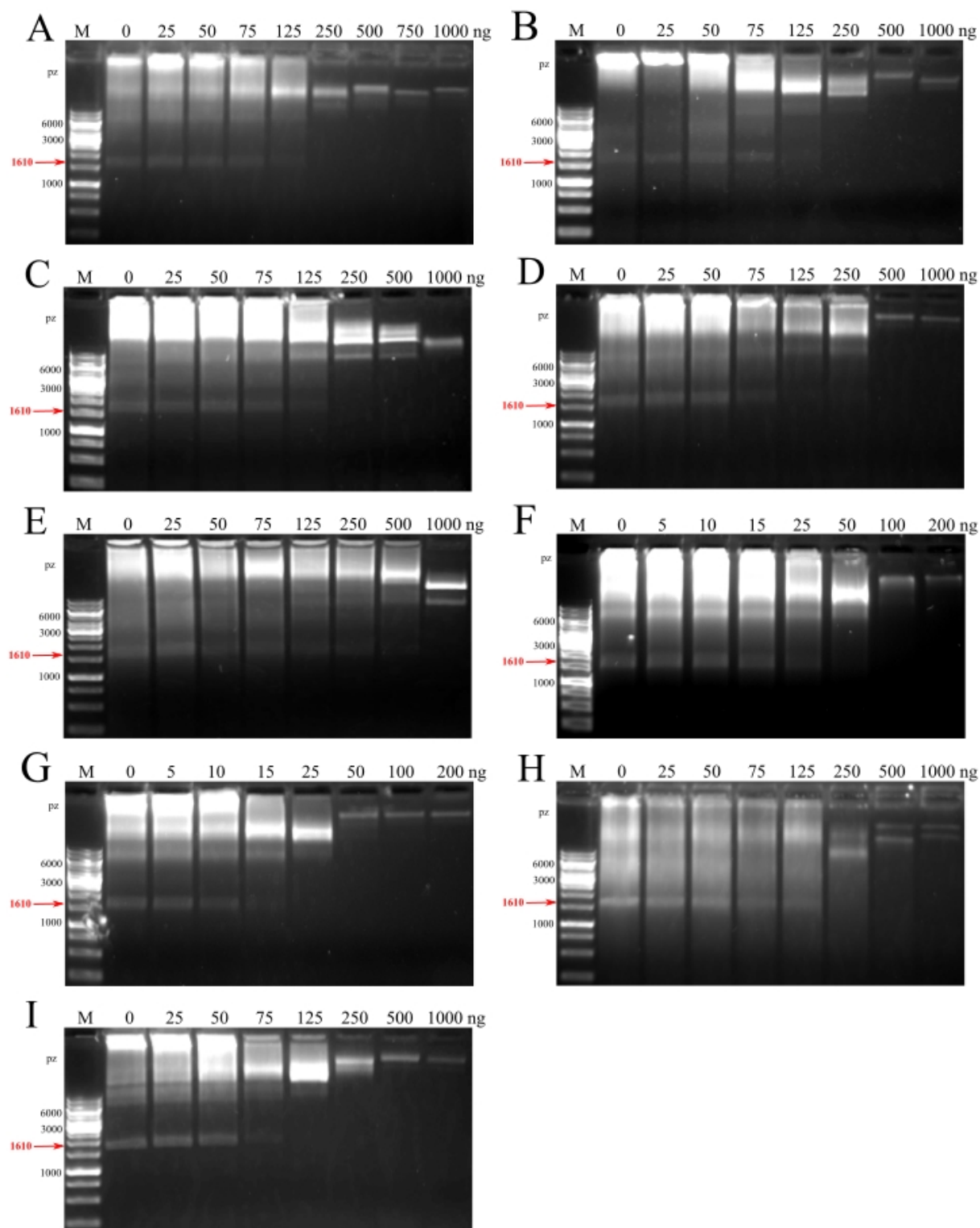
Rysunek 65. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości laktoferyny dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.



Rysunek 66. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości heparyny dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.



Rysunek 67. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącego stężenia mocznika dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.



Rysunek 68. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości kwasu humusowego dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdzału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – komercyjna Bsu large; B – HGLB; C – N_{SSB}LBLGH; D – HN_{SSB}LB; E – BLGH; F – BLN₁₅₀H; G – B_LLN₁₅₀H; H – B_L; I – HB_L. M – marker SM0311.

Wpływ laktoferyny (Rysunek 65) na proces amplifikacji był najmniej zróżnicowany względem badanej polimerazy DNA. Cztery warianty $N_{SSB}LBLGH$, $BLGH$, $BLN_{150}H$ i HB_L amplifikowały przy 1,5-krotnie wyższym stężeniu, a pozostałe przy takim samym jak polimeraza komercyjna. W przypadku heparyny (Rysunek 66) tylko polimerazy $HGLB$ i $BLGH$ amplifikowały DNA przy odpowiednio 25-krotnie (Rysunek 66 B) i 2,5-krotnie wyższym stężeniu (Rysunek 66E), białko referencyjne B_L przy takim samym stężeniu, natomiast wszystkie pozostałe przy niższych stężeniach niż polimeraza komercyjna. Dla mocznika (Rysunek 67) ok. 1,3-krotny wzrost tolerancji zaobserwowano dla wariantu $BLGH$ (Rysunek 67 E), dla $N_{SSB}LBLGH$, $HN_{SSB}LB$, B_L i HB_L brak zmian, a w przypadku pozostałych wariantów zaobserwowano spadek tolerancji. 4-krotnie zwiększoną odporność na inhibicję kwasem humusowym zaobserwowano dla białka $BLGH$ (Rysunek 68 E). Polimerazy $HGLB$, $N_{SSB}LBLGH$ i B_L nie wykazały zmian w tolerancji, a pogorszenie właściwości zaobserwowano dla pozostałych polimeraz (Rysunek 68). Porównując tolerancje na wszystkie cztery inhibitory, największą tolerancją na obecność inhibitorów wykazywała się polimeraza $BLGH$ (Rysunki 65 E, 66 E, 67 E i 68 E), a dla wariantu $HGLB$ zaobserwowano największą poprawę tolerancji na obecności heparyny (25-krotny wzrost – rysunek 66 B).

Tabela 23. Zestawienie danych dotyczących zakresów tolerancji na obecność wybranych inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej dla wszystkich badanych polimeraz.

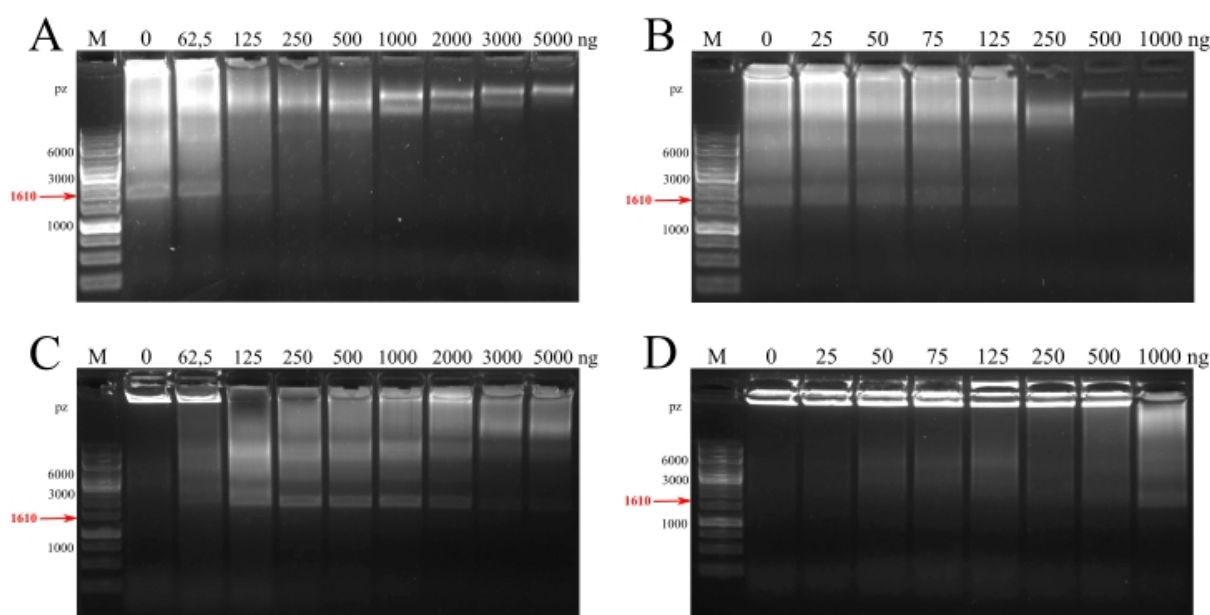
Wariant	Heparyna [µg]	Laktoferyna [µg]	Mocznik [M]	Kwas humusowy [µg]
B _L (NEB)	3	5	1,5	0,25
HGLB	75	5	1	0,25
N _{SSB} LBLGH	0,5	7,5	1,5	0,25
HN _{SSB} LB	0,5	5	1,5	0,125
BLGH	7,5	7,5	2	1
BLN ₁₅₀ H	0,05	7,5	0,2	0,05
B _L LN ₁₅₀ H	0,0125	5	1	0,025
B _L	3	5	1,5	0,25
HB _L	2	7,5	1,5	0,125

B – polimeraza Bsu; B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large); G – białko gp32; N_{SSB} – białko NeqSSB; N₁₅₀ – białko Neq150; L – łącznik; H – znacznik His-tag. Kolor zielony – poprawa parametru względem polimerazy komercyjnej Bsu large; kolor czerwony – pogorszenie parametru względem polimerazy komercyjnej Bsu large.

Polimerazę B_LLN₁₅₀H poddano dodatkowemu badaniu wpływu obecności heparyny i kwasu humusowego na przebieg izotermicznej amplifikacji DNA z zastosowaniem większej ilości polimerazy. W tym celu przeprowadzono reakcje z 0,1 i 1 U polimerazy, w obecności 0-5 µg heparyny oraz 0-1 µg kwasu humusowego. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 69.

Wyniki testu wskazują, że 10-krotne zwiększenie ilości polimerazy (do 0,1 U) zwiększa tolerancję na heparynę (Rysunek 69 A) i kwas humusowy (Rysunek 69 B) do 250 ng obu inhibitorów. Jest to 20-krotny wzrost tolerancji na heparynę i 10-krotny na kwas humusowy, względem zastosowania 0,01 U polimerazy. Rysunki 69 C i D wskazują, że dalsze zwiększanie ilości polimerazy (do 1 U) nie spowodowało liniowego wzrostu zakresu tolerancji. Przy większej ilości polimerazy obserwowano zależność powstawania produktu DNA od stosunku ilości polimerazy do ilości inhibitora. W przypadku reakcji kontrolnych (bez dodatku inhibitorów)

z zastosowaniem 1 U polimerazy DNA nie zaobserwowano produktu DNA. Dla heparyny (rysunek 69 C) produkt DNA obserwowano w zakresie stężeń 62,5-5000 ng inhibitora, a dla kwasu humusowego (rysunek 69 D) tylko w obecności 1 μ g inhibitora. Natomiast dla reakcji kontrolnych oraz przy stężeniu poniżej 1 μ g kwasu humusowego zaobserwowano silny sygnał w miejscu nałożenia próbki na żel agarozowy, tj. w studziencie. Wynika to najprawdopodobniej z silnego wiązania DNA, zarówno w postaci matrycy jak i produktu reakcji amplifikacji, przez fuzyjną polimerazę. Rezultat ten nie pozwala na jednoznaczną ocenę poprawności przebiegu reakcji izotermicznej amplifikacji DNA.



Rysunek 69. Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności heparyny i kwasu humusowego dla polimerazy B_LLN₁₅₀H, za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. A – wpływ heparyny na 0,1 U polimerazy; B – wpływ kwasu humusowego na 0,1 U polimerazy; C – wpływ heparyny na 1 U polimerazy; D – wpływ kwasu humusowego na 1 U polimerazy. M – marker SM0311.

Rozdział 6

Wnioski i dyskusja

Białko fuzyjne to produkt ekspresji genu powstałego poprzez połączenie co najmniej dwóch sekwencji nukleotydowych, którego celem jest uzyskanie jednego białka o zmodyfikowanych lub nowych właściwościach funkcjonalnych. W tworzeniu takich fuzji wykorzystuje się różnych partnerów fuzyjnych, którzy wpływają na zmianę właściwości wybranego białka. Ze względu na zastosowanie można wyróżnić kilka grup białek fuzyjnych. Pierwszą grupą są białka ze znacznikami ułatwiającymi rozpuszczalność, oczyszczanie lub immobilizację, m.in. His-tag (6xHis), biotyna czy MBP [147]. Kolejną grupą są białka ze znacznikami (np. fluorescencyjnymi, m.in. GFP) służącymi do monitorowania lokalizacji białka *in vitro* i *in vivo*, w tym badaniach interakcji międzycząsteczkowych [152, 153]. Wyróżnić można również białka stosowane w medycynie – w terapiach biologicznych oraz do celowanego dostarczania leków. Przykładem mogą być immunocytokiny, gdzie do przeciwciała dołączona jest interleukina-2 lub jej pochodna. Takie połączenie ze względu na specyficzne, miejscowe działanie interleukiny wykorzystuje się w leczeniu nowotworów [154]. Innymi białkami fuzyjnymi wykorzystywanymi w medycynie są fuzje z białkiem TRAIL, które odpowiada za indukcję apoptozy komórki. Tworzenie fuzyjnych wariantów tego białka zwiększa jego stabilność, akumulację w tkankach nowotworowych oraz czas działania terapeutycznego [155].

Ważną grupą białek fuzyjnych są enzymy fuzyjne, które pozwalają na uproszczenie szlaków syntezy, zwiększenie wydajności reakcji oraz poprawę stabilności enzymatycznej. Znajdują one zastosowanie w biokatalizie, jak również reakcjach wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym i chemicznym [156, 157, 158]. Przykładowymi fuzjami wykazującymi wysoką wydajność syntezy

nukleotydów monosacharydowych są połączenia galaktokinazy z pirofosforylazą cukru difosforanu urydyny (ang. *Uridine Diphosphate*, UDP) oraz urydylotransferazy N-acetyloglukozoamino-1-fosforanu z kinazą N-acetyloheksosaminy. Pierwszy z wymienionych enzymów fuzyjnych odpowiada za efektywną syntezę UDP-galaktozy, która jest donorem reszty galaktozy w syntezie glikolipidów, a drugi za syntezę UDP-N-acetyloglukozaminy, która jest donorem acetyloglukozaminy w syntezie glikozaminoglikanów. Oba białka pozwoliły na uproszczenie syntezy oraz łatwiejszą izolację jej produktów końcowych [156]. Innym przykładem fuzji jest enzym SpFDH-GDH-FR, składający się z: halogenazy tryptofanu (SpFDH), dehydrogenazy glukozowej (GDH) oraz reduktazy flawinowej (FR). Odpowiedzialne są one kolejno za syntezę 6-chlorotryptofanu, regenerację zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)*, NADH) oraz zredukowanego dinukleotydu flawinoadeninowego (ang. *Flavin Adenine Dinucleotide (reduced form)*, FADH₂). Takie połączenie zapewnia bardzo wydajną produkcję 6-chlorotryptofanu w reakcji ciągłej oraz zwiększa wydajność prawie 1,5-krotnie i eliminuje potrzebę dodawania kofaktorów w trakcie trwania reakcji [157]. Innym celem zastosowania białek fuzyjnych jest zwiększenia czystości enancjomerycznej otrzymywanych produktów. Fuzja transaminazy fenyloglicyny z aminotransferazą asparaginową, pozwoliła na wydajne przekształcanie D-fenyloglicyny w L-fenyloglicynę. Połączenie enzymów przyspieszyło przekazywanie grupy aminowej, co spowodowało bardzo wysoką selektywność reakcji i otrzymanie czystości enancjomerycznej na poziomie 99%. Zastosowanie fuzyjnego enzymu pozwoliło na uproszczenie reakcji oraz brak konieczności regeneracji koenzymu [159].

Enzymy fuzyjne wykorzystywane są również w diagnostyce molekularnej. Już od lat 90. XX wieku modyfikowano polimerazy DNA poprzez stosowanie mutacji punktowych. Natomiast przez ostatnie 25 lat otrzymano różne polimerazy fuzyjne charakteryzujące się znacznie poprawionymi właściwościami [129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 150]. Jedną z obecnie stosowanych polimeraz fuzyjnych jest polimeraza Phusion (Thermo Fisher Scientific, USA), która zbudowana jest z polimerazy Pfu z *Pyrococcus furiosus* oraz białka wiążącego podwójną nić DNA Sso7d z *Sulfolobus solfataricus*. Fuzja ta zwiększa procesywność, czułość, aktywność specyficzną oraz

tolerancję na obecność soli, co jest szczególnie ważne w analizach próbek klinicznych i środowiskowych [136].

W diagnostyce patogenów technika PCR, w szczególności qPCR lub RT-qPCR, pozostaje złotym standardem i techniką referencyjną, względem której ocenia się skuteczność innych metod detekcji molekularnej, takich jak LAMP, RCA czy RPA [92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 108]. Wynika to przede wszystkim z jej wysokiej czułości, swoistości oraz potwierdzonych metod identyfikacji wielu patogenów, zarówno bakteryjnych, jak i wirusowych [60, 61, 63, 64]. Pomimo tych zalet, współczesna diagnostyka oparta na amplifikacji kwasów nukleinowych napotyka istotne wyzwania dotyczące obecności inhibitorów reakcji, specyfiki matrycy biologicznych, potrzeby analizowania dużych serii próbek w krótkim czasie oraz dążenia do maksymalnego obniżenia kosztów analizy. Głównym problemem związanym z matrycami jest wysoka zawartość par GC oraz liczne powtórzenia sekwencji. Obecność dużej ilości par GC może powodować tworzenie struktur drugorzędowych, które uniemożliwiają przyłączenie się polimerazy i starterów [66, 67]. Natomiast liczne powtórzenia sekwencji powodują niespecyficzne przyłączanie starterów oraz wcześniejsze odłączanie się polimerazy od matrycy, co prowadzi do powstawania produktów różnej długości [68]. Kolejnym problemem jest obecność w próbkach klinicznych, archeologicznych czy środowiskowych, inhibitorów amplifikacji, które hamują proces powielania materiału genetycznego. Hamowanie amplifikacji może zachodzić w różny sposób, np. poprzez oddziaływanie z polimerazą, matrycą lub zmianę środowiska reakcji [69]. Rozwiązaniem tych problemów mogą być fuzyjne polimerazy. Przykładowo fuzja polimerazy Taq Stoffel z domeną wiążącą DNA z ligazy z *Pyrococcus furiosus*, która pozwoliła na zwiększenie czułości, tolerancji na obecność inhibitorów amplifikacji takich jak lakoferyna i heparyna oraz umożliwiła amplifikowanie fragmentów DNA z 78% zawartością par GC [133].

Jednym z głównych wyzwań w medycynie sądowej oraz badaniach archeologicznych jest analiza próbek o bardzo niskiej jakości i niskim stężeniu DNA. Próbki z miejsc zbrodni, archeologiczne szczątki kostne czy ślady biologiczne przechowywane przez długi czas charakteryzują się wysokim stopniem fragmentacji DNA wskutek działania czynników środowiskowych, co wymusza stosowanie technik o bardzo wysokiej czułości [160]. Przełomowe znaczenie w tym wypadku mają enzymy takie jak

polimeraza Phi29 – wysokoprocenywna i zdolna do izotermicznej amplifikacji całych genomów nawet z pojedynczych kopii DNA w reakcjach RCA i MDA [42]. Jej zastosowanie jest bardzo szerokie – od identyfikacji patogenów np. *Staphylococcus aureus*, poprzez tworzenie mikromacierzy do sekwencjonowania genomu, aż do wydajnego amplifikowania niewielkich ilości DNA [104, 105, 106, 107, 108].

Kolejnym problemem jest czas trwania analizy i potrzeba jak największej jego minimalizacji do momentu uzyskania wyniku. Wymusza to stosowanie rozwiązań eliminujących konieczność izolacji DNA i umożliwiających pracę w warunkach stałej temperatury. Rozwiązaniem tego problemu może stać się izotermiczna amplifikacja DNA, której łatwość przygotowania i przeprowadzenia reakcji są jej największymi zaletami oraz umożliwiają jej przebieg zarówno w laboratoriach diagnostycznych, jak i poza nimi. Dodatkowo reakcje te nie wymagają stosowania specjalistycznej aparatury, co redukuje koszty związane z jej posiadaniem [81]. Jedną z bardziej obiecujących reakcji jest RPA, której mechanizm działania opiera się na zastosowaniu dwóch enzymów – rekombinazy UvsX i polimerazy Bsu oraz białka wiążącego ssDNA – gp32 [92]. Jej ograniczeniem jest zdolność do efektywnego powielania wyłącznie krótkich sekwencji DNA (do 500 pz), co jednak nie stanowi problemu dla identyfikacji patogenów czy wykrywania obecności specyficznych genów, nawet w reakcjach typu multipleks [98, 99, 100].

Próba rozwiązania tych problematycznych kwestii jest otrzymanie nowych fuzyjnych polimeraz DNA zdolnych do prowadzenia reakcji izotermicznej amplifikacji DNA. Do fuzji wybrano dwie polimerazy – Bsu (pochodzenia bakteryjnego) i Phi29 (pochodzenia wirusowego). Polimeraza Bsu pozwala na szybkie amplifikowanie krótkich fragmentów DNA, ale do prowadzenia reakcji potrzebuje obecności białek pomocniczych [40, 92]. Natomiast polimeraza Phi29 potrafi amplifikować bardzo długie fragmenty DNA z dużą dokładnością, ale proces ten jest czasochłonny [54]. Jako partnerów fuzyjnych dla obu polimeraz wybrano trzy białka wiążące kwasy nukleinowe – gp32, NeqSSB oraz Neq150. Pierwsze dwa preferencyjnie wiążą pojedynczą nić DNA, natomiast Neq150 podwójną nić DNA [137, 143]. Fuzja z białkami DRBP ma na celu poprawę stabilności wiązania enzymu z DNA, co usprawnia proces inicjacji polimeryzacji oraz ogranicza zbyt wczesne oddysocjowanie enzymu od matrycy [65]. Polimeraza została połączona z partnerem białkowym za pomocą krótkiego łącznika

aminokwasowego (Gly-Ser-Gly-Gly-Val-Asp). Dodanie takiego łącznika ma na celu zmniejszenie zawady sterycznej między polimerazą a partnerem fuzyjnym, co jest istotne podczas fałdowania białka fuzyjnego. Obecność łącznika wpływa również pozytywnie na aktywność enzymu fuzyjnego, umożliwiając jednoczesną interakcję polimerazy i białka DRBP z DNA [65, 129, 133].

Zaprojektowano 11 wariantów fuzyjnych oraz 2 warianty referencyjne polimerazy Phi29, które skutecznie sklonowano i nadprodukowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Proces klonowania i nadprodukcji przebiegały bez trudności, natomiast w trakcie przygotowywania do oczyszczania konieczne było zastosowanie dodatkowego etapu inkubacji z detergentem w celu poprawy rozpuszczalności białek. Pomimo skutecznego uzyskania preparatów białkowych (z wyjątkiem białka P - Phi29), żaden z przebadanych wariantów nie wykazał aktywności enzymatycznej zarówno w próbach wyznaczania jednostek aktywności jak i w reakcji RCA. Wynik ten sugeruje, że zastosowane modyfikacje mogły negatywnie wpłynąć na strukturę centrum aktywnego polimerazy lub ogólną konformację białka, uniemożliwiając jego działanie w warunkach reakcji izotermicznej. Dla polimeraz z partnerem fuzyjnym na N-końcu wyjaśnienie to wydaje pokrywać się z hipotezą zespołu M. Salas [150], tzn. blokowana jest aktywność wypierania nici i polimeraza nie może przeprowadzić amplifikacji. W przypadku fuzji na C-końcu możliwym jest negatywny wpływ wybranych partnerów fuzyjnych. Ze względu na strukturę przestrzenną polimerazy lepszymi partnerami fuzyjnymi na C-końcu są białka wiążące dsDNA, gdyż wtedy mogą oddziaływać z tworzącym się produktem dwuniciowym, tak jak w przypadku znanej fuzji z domeną (HhH)₂ z *M. kandleri* [150]. Białko Neq150 jest takim partnerem, natomiast nie można wykluczyć, że wiązanie przez niego dsDNA jest tak silne, że nic nie może przesunąć się przez domenę kciuka polimerazy. Silne wiązanie białka Neq150 widoczne jest również w przypadku fuzyjnej polimerazy Bsu large, gdzie większe jej ilości hamują całkowicie reakcję, co szczegółowo omówiono w dalszej części. Białko NeqSSB mimo preferencyjnego wiązania ssDNA, również wiąże dsDNA jednak siła tego wiązania jest słabsza niż ta obserwowana dla Neq150 [143]. Mimo to wariant PLN_{SSB}H (Phi29-łącznik-NeqSSB-6xHis) również nie wykazuje aktywności. W przypadku obu białek wiążących ssDNA (gp32 i NeqSSB) wspólnym mechanizmem

hamującym aktywność polimerazy może być wiązanie matrycy i uniemożliwienie jej wejścia do kanału polimerazy, a przez to brak substratu do syntezy nowej nici DNA. Brak aktywności białka HP (6xHis-Phi29) jest trudny do wyjaśnienia. Nie można wykluczyć, że tak jak w przypadku fuzji na N-końcu polimerazy, dodanie w tym miejscu znacznika, nawet tak małego jak His-tag, powoduje blokowanie kanału wejścia ssDNA. Dodatkowym czynnikiem, który mógł wpłynąć na brak aktywności wszystkich wariantów polimeraz Phi29, był sposób ich nadprodukcji i oczyszczania. Stosowana w niniejszej rozprawie metoda znacząco odbiega od tych dotychczasowo opisanych dla Phi29. Miguel de Vega i José Lázaro do procesu oczyszczania zarówno fuzyjnej jak i natywnej Phi29 nie wykorzystywali znaczników. Dodatkowo, do dezintegracji stosowano mielenie z dodatkiem tlenku glinu, a nie przez sonikację. DNA usuwane było poprzez wytrącanie za pomocą polietylenoiminy, a nie przez zastosowanie enzymu nukleolitycznego. Charakterystyczna jest również obecność β -merkaptotanolu w buforach używanych do oczyszczania oraz brak jakiegokolwiek obecności detergentów. Uzyskane w ten sposób przez M. de Vega i J. Lázaro białko znajdowało się we frakcji rozpuszczalnej i następnie było wieloetapowo oczyszczane z zastosowaniem złoża fosfocelulozowego, złoża z dekstranem na agarozie oraz złoża heparynowo-sefarozowego [150, 161]. W zastosowanych w niniejszej rozprawie warunkach nadprodukcji polimeraza Phi29 znajdowała się zawsze we frakcji nierozpuszczalnej, co wymuszało zastosowanie na etapie oczyszczania silnych detergentów, aby uwolnić białko z ciałek inkluzyjnych. Proces ten mógł jednak negatywnie wpłynąć na uzyskany preparat białkowy, powodując nieprawidłowe fałdowanie białka, a tym samym brak aktywności enzymatycznej.

W przypadku polimerazy Bsu zaprojektowano 10 wariantów fuzyjnych oraz 4 referencyjne. Nie napotkano problemów na etapie klonowania czy nadprodukcji tych wariantów z wyjątkiem tych, dla których zaplanowano fuzję białka Neq150 na N-końcu polimerazy. Zarówno dla polimerazy HN₁₅₀LB (6xHis-Neq150-łącznik-Bsu) jak i HN₁₅₀LB_L (6xHis-Neq150-łącznik-Bsu large), nie udało się uzyskać nadprodukcji w zastosowanym bakteryjnym systemie ekspresyjnym z wykorzystaniem *E. coli*. Sugeruje to, iż zastosowana fuzja mogła negatywnie wpłynąć na białko, np. powodując nieprawidłowe fałdowanie i natychmiastową degradację w komórkach bakteryjnych [162]. Zweryfikowanie tej hipotezy wymagałoby wykorzystania do nadprodukcji innego

gospodarza, np. *Bacillus subtilis*, który charakteryzuje się wysoką wydajnością nadprodukcji, lepszą tolerancją na obecność toksycznych białek oraz możliwością efektywnego wydzielania nadprodukowanych białek do podłoża hodowlanego [163].

Otrzymane polimerazy referencyjne Bsu (B – Bsu, HB – 6xHis-Bsu, B_L – Bsu large, HB_L – 6xHis-Bsu large) porównano względem komercyjnie dostępnej polimerazy Bsu large (New England Biolabs, USA) i zaobserwowano pewne różnice w badanych właściwościach. Polimeraza Bsu large była zdolna do wiązania dsDNA, plazmidowego DNA oraz RNA. Polimerazy B_L oraz HB_L również wiązały dsDNA i plazmidowe DNA, natomiast nie oddziaływały z RNA, a dodatkowo polimeraza B_L wiązała genomowe DNA. Z kolei polimerazy B i HB wykazywały powinowactwo do dsDNA oraz DNA genomowego, ale nie wiązały plazmidowego DNA, natomiast polimeraza HB oddziaływała również z RNA. Optymalizacja reakcji izotermicznej amplifikacji DNA wykazała brak aktywności enzymatycznej białek B i HB, w przeciwieństwie do wariantów uzyskanych dla dużej podjednostki. Co istotne, analizując warianty ze znacznikiem His-tag oraz bez niego, nie zauważono wpływu tego znacznika na aktywność badanych białek.

Fuzyjne polimerazy Bsu z białkiem NeqSSB (HN_{SSB}LB – 6xHis-NeqSSB-łącznik-Bsu oraz BLN_{SSB}H – Bsu-łącznik-NeqSSB-6xHis) nie wiązały ssDNA. Ze względu na fakt, iż białko NeqSSB zdolne jest do wiązania tej formy DNA, wydaje się, że fuzja negatywnie wpłynęła na tą właściwość partnera fuzyjnego [143]. Polimeraza BLN_{SSB}H charakteryzuje się aktywnością wyższą aż 170-krotnie w porównaniu do polimerazy HN_{SSB}LB i umożliwia przeprowadzenie reakcji amplifikacji izotermicznej opartej o białko gp32, co nie jest możliwe w przypadku enzymu HN_{SSB}LB. Stąd najprawdopodobniej preferowanym miejscem fuzji białka NeqSSB dla polimerazy Bsu jest C-koniec enzymu. Zaskakująco, wyniki uzyskane dla fuzji Bsu z białkiem NeqSSB są odmienne od tych uzyskanych dla fuzyjnej polimerazy Taq, gdzie NeqSSB poprawił efektywność i tolerancję na obecność inhibitorów [130]. Prowadzi to do wniosku, że NeqSSB nie jest odpowiednim partnerem fuzyjnym dla polimerazy Bsu.

Fuzje Bsu z białkiem gp32 (HGLB – 6xHis-gp32-łącznik-Bsu oraz BLGH – Bsu-łącznik-gp32-6xHis) wykazały wyższą aktywność niż warianty z NeqSSB oraz dodatkowo zwiększyły tolerancję na obecność inhibitorów amplifikacji

w mieszaniu reakcyjnej. W przypadku tych dwóch białek zaobserwowano zależność zachodzenia reakcji amplifikacji DNA od stosunku ilości fuzyjnej polimerazy do dodanego białka gp32. Prawdopodobna jest podwójna rola polimerazy w reakcji, tj. synteza DNA i wiązanie ssDNA (przejęcie funkcji białka SSB) [40, 92]. Jednak obecność wolnego białka gp32 jest kluczowa dla zajścia reakcji amplifikacji katalizowanej przez te warianty. Dodatkowo zauważono, że HGLB oraz BLGH prowadzą reakcję amplifikacji wolniej niż pozostałe badane warianty polimerazy Bsu – 30 minutowa amplifikacja to minimalny czas potrzebny do zaobserwowania produktu reakcji na żelu, a optymalny czas to aż 90 minut. Nie bez znaczenia jest koniec polimerazy, do którego dołączono białko gp32. Fuzja na N-końcu pozwoliła na 25-krotny wzrost odporności na heparynę, podczas gdy fuzja na C-końcu skutkowała 2,5-krotnym wzrostem odporności na ten inhibitor oraz dodatkowo 4-krotnym wzrostem odporności na obecność kwasu humusowego. Wzrost tolerancji na obecność inhibitorów amplifikacji dzięki zastosowaniu fuzji został wcześniej opisany dla polimerazy Taq Stoffel z NeqSSB oraz Taq Stoffel z domeną DBD z *Pyrococcus furiosus* [130, 133].

Połączeniem przedyskutowanych wcześniej fuzji z gp32 i NeqSSB są polimerazy GLBLN_{SSB}H (gp32-łącznik-Bsu-łącznik-NeqSSB-6xHis) i N_{SSB}LBLGH (NeqSSB-łącznik-Bsu-łącznik-gp32-6xHis) posiadające dwóch partnerów fuzyjnych. Właściwości obu polimeraz nie są zaskakujące, analizując wyniki widać wpływ obu podstawników – N_{SSB}LBLGH miała ponad 2,5-krotnie niższą aktywność niż GLBLN_{SSB}H, na co wpływ miała prawdopodobnie fuzja białka NeqSSB na N-końcu polimerazy. Obie polimerazy zyskały zdolność wiązania ssDNA, tak jak w przypadku wariantów fuzji z białkiem gp32. Białko GLBLN_{SSB}H w testach optymalizacji reakcji izotermicznej nie przeprowadzało amplifikacji, co pokrywa się z wynikami dla białka BLN_{SSB}H. W związku z tym uzasadnionym wydaje się wnioskowanie, że białko NeqSSB w fuzji z C-końcem polimerazy Bsu powoduje zahamowanie amplifikacji DNA. Natomiast białko N_{SSB}LBLGH, tak jak pozostałe warianty z białkiem gp32, potrzebuje optymalnie aż 90 min na przeprowadzenie reakcji. Zakresy tolerancji na obecność inhibitorów amplifikacji również potwierdzają wpływ obu podstawników. Polimeraza N_{SSB}LBLGH wykazuje obniżoną tolerancję na obecność heparyny (tak jak polimeraza HN_{SSB}LB) i nieznacznie podniesioną na obecność laktoferyny (tak jak polimeraza BLGH). Dodatkowo tolerancja na kwas humusowy została podwyższona

względem N_{SSB}LB, ale obniżona względem BLGH. Zastosowanie dwóch różnych podstawników jasno wykazało, że miejsce fuzji oraz rodzaj podstawnika mają kluczowe znaczenie na finalne właściwości polimerazy.

Ostatnie uzyskane enzymy fuzyjne to polimerazy z białkiem Neq150 – BLN₁₅₀H (Bsu-łącznik-Neq150-6xHis) i B_LLN₁₅₀H (Bsu large-łącznik-Neq150-6xHis). Obydwa warianty mają zbliżoną aktywność i zwiększoną efektywność amplifikacji, czyli obniżoną niezbędną ilość polimerazy jaką trzeba użyć, aby reakcja zaszła. Dla polimerazy BLN₁₅₀H ten parametr został poprawiony 2-krotnie, natomiast dla B_LLN₁₅₀H aż 125-krotnie. Wzrost efektywności amplifikacji, dzięki zastosowaniu fuzji został wcześniej opisany dla polimeraz Taq Stoffel z NeqSSB i Pwo z NeqSSB [130, 131]. Dodatkowo wariant B_LLN₁₅₀H aż 3-krotnie zwiększył odporność na wpływ podwyższonej temperatury (55°C). Badania polimerazy BLN₁₅₀H wykazały utratę jej aktywności w czasie przechowywania. Wyjaśnienie tego faktu wymaga przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów polegających na sprawdzeniu aktywności białka w reakcji kontrolnej w wybranych punktach czasowych i jednoczesnym sprawdzaniu, za pomocą elektroforezy w warunkach denaturujących degradacji białka. Badanie wpływu obecności inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej dla obu białek wykazało znaczny spadek tolerancji na obecność heparyny, mocznika i kwasu humusowego. Ze względu na znaczące różnice zaobserwowane dla polimerazy B_LLN₁₅₀H w optymalnych warunkach, przeprowadzono dodatkowe testy zwiększając ilość polimerazy. Założono, że im większe stężenie polimerazy zostanie zastosowane, tym mniejsza będzie obserwowana inhibicja reakcji amplifikacji. Wyniki okazały się zaskakujące, ponieważ przy 10-krotnym wzroście ilości polimerazy (0,1 U) zaobserwowano wzrost tolerancji. Natomiast zastosowanie 1 U polimerazy (100-krotny wzrost względem warunków optymalnych) spowodowało powstanie zależności zachodzenia reakcji od stosunku ilości polimerazy do ilości inhibitora. W przypadku heparyny reakcja zachodziła w zakresie 62,5-5000 ng inhibitora, a dla kwasu humusowego reakcja zaszła tylko w obecności 1 µg tego inhibitora (Rysunek 69). Prawdopodobnie jest to spowodowane silnym wiązaniem matrycy lub powstających produktów przez partnera fuzyjnego polimerazy, dlatego zamiast specyficznego produktu na określonej wysokości widać silny sygnał w miejscu nakładania próbek na żel.

Analiza wpływu partnerów fuzyjnych na polimerazę Bsu wykazuje, że białka gp32 i Neq150 poprawiają znacząco już posiadane lub nadają zupełnie nowe właściwości takiej fuzyjnej polimerazie, natomiast białko NeqSSB powoduje pogorszenie właściwości lub kompletną utratę aktywności enzymatycznej fuzyjnej polimerazy. W przypadku partnera gp32 widać znaczną poprawę tolerancji na obecność inhibitorów, a dla Neq150 poprawę efektywności amplifikacji. Porównanie fuzji polimerazy Bsu i Bsu large pozwala również wnioskować, że fuzje białka gp32 z polimerazą Bsu large mogą charakteryzować się lepszymi właściwościami, analogicznie jak dla fuzji z Neq150. Obiecujące wyniki fuzji białka Neq150 pozwalają sądzić, że jest to białko, które w przyszłości może znaleźć zastosowanie jako partner fuzyjny innych polimeraz. Dodatkowo jednoczesne zastosowanie białek gp32 i Neq150 w fuzji z Bsu może zwiększyć tolerancję polimerazy na inhibitory amplifikacji DNA oraz jej efektywność, z czego najbardziej interesującym wydaje się zaprojektowanie i otrzymanie wariantu z fuzją gp32 na N-końcu i Neq150 na C-końcu zarówno dla polimerazy Bsu jak i Bsu large.

Kolejnymi etapami zbliżającymi do praktycznego zastosowania otrzymanych polimeraz jest ich zastosowanie w reakcji RPA, a następnie próba przeprowadzenia amplifikacji izotermicznej wybranego fragmentu DNA bezpośrednio z zastosowaniem próbek klinicznych lub środowiskowych. Ze względu na zaobserwowaną wysoką tolerancję na obecność inhibitorów oraz efektywność prowadzonej reakcji otrzymane polimerazy są obiecującymi kandydatami do opracowania testów diagnostycznych z reakcją RPA, tak jak zrobiła to firma HOLOGIC dla reakcji TMA [101]. Podwyższona tolerancja na obecność inhibitorów sugeruje, iż takie polimerazy nadawałyby się do identyfikacji patogenów bezpośrednio w próbkach klinicznych, z pominięciem etapu izolacji DNA [98, 99, 100].

Podsumowując, wyniki niniejszej rozprawy dostarczają nowych informacji na temat tworzenia fuzyjnych polimeraz DNA do izotermicznej amplifikacji DNA. Zaproponowany sposób otrzymywania wariantów polimeraz Phi29 okazał się nieskuteczny, doprowadzając do powstania białek niewykazujących aktywności enzymatycznej. Natomiast sprawdził się on w kontekście uzyskania funkcjonalnych wariantów polimerazy Bsu. Fuzje obejmujące pełną sekwencję polimerazy Bsu umożliwiły prowadzenie reakcji izotermicznej amplifikacji z wykorzystaniem białka

gp32, co nie było możliwe w przypadku wariantów referencyjnych obejmujących jedynie pełną sekwencję enzymu. Jednocześnie wykazano, że wpływ partnerów fuzyjnych różni się w zależności od zastosowanego białka oraz miejsca fuzji. Białko NeqSSB nie sprawdziło się jako partner fuzyjny, ponieważ znacząco pogarszało właściwości polimerazy. Z kolei białka gp32 i Neq150 okazały się bardzo obiecujące poprawiając określone parametry enzymu. Białko gp32 pozytywnie wpłynęło na poszerzenie zakresu tolerancji polimeraz na obecność wybranych inhibitorów reakcji, natomiast białko Neq150 zwiększyło efektywność polimeraz, a w fuzji z dużą podjednostką polimerazy zwiększyło również jej stabilność w podwyższonej temperaturze. Wykorzystanie istniejących oraz tworzenie nowych wariantów fuzyjnych polimerazy Bsu o poprawionych właściwościach może stać się podstawą do tworzenia nowych testów diagnostycznych, opartych o reakcję amplifikacji izotermicznej RPA. Wyniki uzyskane dla polimeraz fuzyjnych Bsu z białkami gp32 oraz Neq150 stanowiły podstawę do złożonych dwóch wniosków patentowych [164, 165].

Rozdział 7

Podsumowanie

Przeprowadzone badania pozwoliły na otrzymanie 28 konstruktyw genetycznych, które umożliwiły nadproduktowanie w bakteryjnym systemie ekspresyjnym 26 białek, przy czym 25 z nich oczyszczono, 12 wykazało aktywność enzymatyczną. Jednak tylko 8 z nich amplifikowało DNA w reakcji amplifikacji izotermicznej DNA opartej o białko gp32. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że:

- 1) przyjęty sposób otrzymywania białek Phi29 jest nieskuteczny i należy go zmodyfikować,
- 2) dołączenie partnera fuzyjnego do polimerazy Bsu umożliwia przeprowadzenie reakcji amplifikacji izotermicznej DNA opartej o białko gp32, której nie przeprowadza enzym niezmodyfikowany,
- 3) białko NeqSSB jako partner fuzyjny nie wpływa lub wpływa negatywnie na właściwości i aktywność polimerazy Bsu,
- 4) białko gp32 jako partner fuzyjny zwiększa tolerancję polimerazy Bsu na obecność inhibitorów,
- 5) białko Neq150 jako partner fuzyjny zwiększa efektywność polimerazy Bsu i Bsu large,
- 6) białko Neq150 jako partner fuzyjny zwiększa stabilność w 55°C polimerazy Bsu large,
- 7) fuzja polimerazy Bsu z białkiem Neq150 spowodowała utratę aktywności podczas przechowywania.

Wykaz skrótów

- 3SR (ang. *Self-Sustained Sequence Replication*) – samopodtrzymująca się replikacja sekwencji
- APS (ang. *Amonium Persulfate*) – nadsiarczan amonu
- B – polimeraza Bsu
- B_L – duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large)
- B_L NEB – duża podjednostka polimerazy Bsu firmy New England Biolabs
- Bst – polimeraza DNA z *Bacillus stearothermophilus*
- Bsu – polimeraza I DNA z *Bacillus subtilis*
- C2CA (ang. *Circle-to-Circle Amplification*) reakcja RCA cyklicznie powielająca koliste matryce
- CRISDA (ang. *CRISPR–Cas9-Triggered Strand Displacement Amplification*) – Amplifikacja z przemieszczeniem nici wyzwalana przez CRISPR–Cas9
- cDNA (ang. *complementary DNA*) – komplementarne DNA
- dATP (ang. *Deoxyadenosine triphosphate*) – deoksytrifosforan adenozyne
- dCTP (ang. *Deoxycytidine triphosphate*) – deoksytrifosforan cytozyny
- DEPC (ang. *Diethyl Pyrocarbonate*) – pirowęglan dietylu
- dGTP (ang. *Deoxyguanosine triphosphate*) – deoksytrifosforan guanidyny
- DBD – domena ligazy z *Pyrococcus furiosus* wiążąca dsDNA
- Dbh – polimeraza DNA z *Sulfolobus acidocaldarius*
- DBP (ang. *DNA Binding Protein*) – białka wiążące DNA
- ddPCR (ang. *Droplet Digital PCR*) – cyfrowy PCR w kropli
- DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- DNA (ang. *Deoxyribonucleic Acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

- dNTP (ang. *Deoxynucleotides*) – deoksynukleotydy
- DRBP (ang. *DNA and RNA Binding Protein*) – białka wiążące DNA i RNA
- DSB (ang. *Double-Stranded DNA binding protein*) – białka wiążące dsDNA
- dsDNA (ang. *double stranded Deoxyribonucleic Acid*) – podwójna nić kwasu deoksyrybonukleinowego
- dT76 – oligonukleotyd znakowany fluorescencyjnie składający się z 76 deoksytrifosforanów tymidyny
- DTT (ang. *Dithiothreitol*) – ditiotreitól
- dTTP (ang. *Thymidine triphosphate*) – deoksytrifosforan tymidyny
- EDTA (ang. *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, Sodium Salt*) – sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
- EMSA (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) – badanie przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej
- EtBr (ang. *Etidium Bromide*) – bromek etydyny
- EXPAR (ang. *Exponential Amplification Reaction*) – wykładnicza reakcja amplifikacji
- FADH₂ (ang. *Flavin Adenine Dinucleotide (reduced form)*) – zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy
- FR – reduktaza flawinowa
- G – białko gp32
- GDH – dehydrogenaza glukozowa
- H – znacznik His-tag
- HDA (ang. *Helicase-Dependent Amplification*) – helikazo-zależna amplifikacja
- HIP (ang. *Helix Initiated Primer Amplification*) – amplifikacja inicjowana starterem helikalnym
- IPTG (ang. *Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside*) – izopropyl β-d-1-tiogalaktopiranozyd
- kDa – kilo dalton
- KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)
- L – łącznik
- LA – pożywka luria broth agar

- LAMP (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) – pętlowo-zależna izotermiczna amplifikacja
- LB – pożywka luria broth
- MBP (ang. *Maltose Binding Protein*) – białko wiążące maltozę
- MDA (ang. *Multiple Displacement Amplification*) – wielokrotna amplifikacja z przemieszczeniem nici
- MCE – mieszanina estrów celulozy
- mRNA (ang. *messenger RNA*) – informacyjny RNA
- N_{SSB} – białko NeqSSB
- N₁₅₀ – białko Neq150
- NADH (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)*) – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- NASBA (ang. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) – sekwencyjna amplifikacja kwasów nukleinowych oparta na sekwencji
- NBP (ang. *Nucleic acid Binding Protein*) – białka wiążące kwasy nukleinowe
- NeqSSB – białko SSB z *Nanoarchaeum equitans*
- nt – ilość nukleotydów
- P – polimeraza Phi29
- PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy
- Pfu – polimeraza DNA z *Pyrococcus furiosus*
- PG-RCA (ang. *Primer Generation-Rolling Circle Amplification*) – reakcja RCA z generowaniem starterów
- Phi29 – polimeraza z faga Φ29
- PPi (ang. *Pyrophosphate*) – pirofosforan
- PSR (ang. *Polymerase Spiral Reaction*) – spiralna reakcja polimerazy
- PVDF – poli(fluorek winylidenu)
- Pwo – polimeraza DNA z *Pyrococcus woesei*
- pz – ilość par zasad
- qPCR (ang. *quantitative PCR*) – ilościowy PCR
- qRT-PCR (ang. *quantitative Reverse Transcription PCR*) – ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją
- RBP (ang. *RNA Binding Protein*) – białka wiążące RNA

- RCA (ang. *Rolling Circle Amplification*) – amplifikacja toczącego się koła
- RNA (ang. *Ribonucleic Acid*) – kwas rybonukleinowy
- RPA (ang. *Recombinase Polymerase Amplification*)
- RPM (ang. *Revolutions Per Minute*) – obroty na minutę
- rRNA (ang. *ribosomal RNA*) – rybosomalny RNA
- RTA (ang. *Rolling Circle Transcription*) – transkrypcja toczącego się koła
- RT-PCR (ang. *Reverse Transcription PCR*) – PCR z odwrotną transkrypcją
- Sarkozyl – N-Laurylosarkozynian sodu
- SB – pożywka Superbroth
- SDA (ang. *Strand Displacement Amplification*) – amplifikacja z przemieszczeniem nici
- SDS (ang. *Dodecyl Sodium Sulfate*) – siarczan dodecyłu sodu
- SpFDH – halogenaza tryptofanu
- SSB (ang. *Single-Stranded DNA binding protein*) – białko wiążące dsDNA
- SIBA (ang. *Strand Invasion-Based Amplification*) – amplifikacja oparta na inwazji nici
- SOC – pożywka super optimal catabolite repression
- ssDNA (ang. *single stranded deoxyribonucleic acid*) – pojedyncza nić kwasu deoksyrybonukleinowego
- Sso7d – białko DSB z *Sulfolobus solfataricus*
- SsoSSB – białko SSB z *Sulfolobus solfataricus*
- Taq – polimeraza DNA z *Thermus aquaticus*
- Taq Stoffel – polimeraza DNA z *Thermus aquaticus* bez domeny egzonukleolitycznej 5'→3'
- TE – bufor Tris-EDTA
- TEMED (ang. *N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine*) – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
- TMA (ang. *Transcription-Mediated Amplification*) – transkrypcyjnie wspomagana amplifikacja
- Tris – trihydroksymetyloaminometan
- tRNA (ang. *transfer RNA*) – transportujący RNA
- Tzi – polimeraza DNA z *Thermococcus zillgi*
- UDP (ang. *Uridine Diphosphate*) – Difosforan urydyny

Spis rysunków

1	Trójwymiarowa struktura polimerazy I DNA z <i>Thermus aquaticus</i> (PDB: 1KTQ)	17
2	Mechanizm tworzenia wiązania fosfodiesterowego z udziałem jonów metali dwudodatnich.	19
3	Predykcja struktury przestrzennej polimerazy Bsu.	21
4	Struktura przestrzenna polimerazy Phi29 (PDB: 1XHX).	23
5	Mechanizm reakcji izotermicznej RPA [92].	32
6	Mechanizmy różnych form reakcji izotermicznej RCA i RTA [116].	33
7	Mechanizmy różnych form reakcji izotermicznej RCA [116].	34
8	Mechanizm reakcji izotermicznej amplifikacji DNA opartej na białku gp32 [120].	36
9	Budowa białka gp32. a) struktura przestrzenna, b) schemat budowy [138].	39
10	Predykcja struktury przestrzennej białek wiążących DNA z <i>Nanoarchaeum equitans</i> . A – białko NeqSSB (NEQ199), z zaznaczonymi domenami, B – białko Neq150 (NEQ150) [146].	41
11	Schematyczne przedstawienie polimerazy fuzyjnej z białkiem DSB związanej z DNA.	42
12	Schematyczne przedstawienie procesu oczyszczania metodą metalopowinowactwa, uwzględniające zawartość procentową buforu HisB (%B) w poszczególnych etapach.	69
13	Schematyczne przedstawienie procesu oczyszczania metodą jonowymienną, uwzględniające zawartość procentową buforu JonB (%B) w poszczególnych etapach.	70
14	Schemat blokowy zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Bsu.	81
15	Schemat blokowy zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Phi29 i białka gp32.	84
16	Analiza wielkości wstawek DNA wykorzystywanych do klonowania, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	88

17	Analiza wielkości plazmidowego DNA wykorzystywanego do klonowania, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	89
18	Analiza wielkości plazmidowego DNA wyizolowanego z wybranych koloni bakteryjnych po klonowaniu, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	90
19	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie optymalizacji nadprodukcji białka HGLB oraz jego uwalniania.	92
20	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie optymalizacji nadprodukcji białka PLGH oraz jego uwalniania.	95
21	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie nadprodukcji w zwiększonej skali dla wariantów z polimerazą Bsu.	97
22	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym dla próbek białkowych pobranych w trakcie nadprodukcji w zwiększonej skali dla wariantów z polimerazą Phi29 i białka gp32.	98
23	Wyniki oczyszczania białka HGLB metodą chromatografii metalopowinowactwa. . .	100
24	Wyniki odsalania białka HGLB.	101
25	Wyniki oczyszczania białka PLGH metodą chromatografii metalopowinowactwa. . .	103
26	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji po odsalania białka PLGH poprzez dializę.	104
27	Wyniki oczyszczania polimerazy Bsu (wariant B) metodą chromatografii jonowymiennej.	105
28	Wyniki odsalania polimerazy Bsu (wariant B).	106
29	Wyniki oczyszczania białka GH metodą chromatografii metalopowinowactwa. . . .	108
30	Wyniki odsalania białka GH.	109
31	Analiza produktów rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym wybranych frakcji po oczyszczaniu białka GH na złożu ssDNA-celuloza.	110
32	Wyniki ponownego odsalania białka GH.	111

33	Analiza czystości otrzymanych preparatów białkowych, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym.	113
34	Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla komercyjnych polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7).	115
35	Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). A – GLBLN _{SSB} H; B – BLN _{SSB} H; C – HGLB; D – N _{SSB} LBLGH; E – HN _{SSB} LB; F – BLGH.	116
36	Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla polimeraz DNA, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7). A – BLN ₁₅₀ H; B – B _L LN ₁₅₀ H; C – B; D – HB; E – B _L ; F – HB _L	117
37	Wykresy zależności intensywności sygnału fluorescencji od czasu dla wybranych wariantów polimerazy Phi29, mierzone za pomocą zestawu EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit (Biotium, USA) (Materiały 3.7).	119
38	Analiza produktów reakcji RCA, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym dla wybranych wariantów polimerazy Phi29.	120
39	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę komercyjną Bsu large, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	121
40	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę GLBLN _{SSB} H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	122
41	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLN _{SSB} H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	123
42	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HGLB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	124
43	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę N _{SSB} LBLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	125

44	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HN _{SSB} LB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	126
45	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	127
46	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę BLN ₁₅₀ H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	128
47	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę B _L LN ₁₅₀ H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	129
48	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę Bsu (wariant B), za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	130
49	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	131
50	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę B _L , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	132
51	Analiza zdolności wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazę HB _L , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% (C i D), 1,5% (A i B) i 2% (E) żelu agarozowym.	133
52	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy komercyjnej Bsu large, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	136
53	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy HGLB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	137
54	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy N _{SSB} LBLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	137

55	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy HN _{SSB} LB, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	138
56	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy BLGH, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	138
57	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy BLN ₁₅₀ H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	139
58	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy B _L LN ₁₅₀ H, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	139
59	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy B _L , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	140
60	Analiza produktów reakcji optymalizacji izotermicznej amplifikacji DNA dla polimerazy HB _L , za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	140
61	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w zakresie temperatur 20-60°C dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	143
62	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA z zastosowaniem polimeraz po inkubacji w 55°C w różnym czasie, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	144
63	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA z zastosowaniem polimerazy B _L LN ₁₅₀ H po inkubacji w 60°C w różnym czasie, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	145
64	Analiza zdolności wiązania produktu PCR o długości 330 pz przez laktoferynę, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	147
65	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości laktoferyny dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	148
66	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości heparyny dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	149

67	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącego stężenia mocznika dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdzału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	150
68	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności rosnącej ilości kwasu humusowego dla wszystkich badanych polimeraz, za pomocą rozdzału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	151
69	Analiza produktów reakcji izotermicznej amplifikacji DNA w obecności heparyny i kwasu humusowego dla polimerazy B _L LN ₁₅₀ H, za pomocą rozdzału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym.	154

Spis tabel

1	Podsumowanie mechanizmów inicjacji amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych. Na podstawie [81].	27
2	Warunki amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych dla wybranych reakcji. Na podstawie [54, 55, 81].	30
3	Zestawienie przykładowych polimeraz fuzyjnych.	43
4	Tabelaryczne zestawienie starterów używanych w metodzie klonowania Gibsona. .	56
5	Tabelaryczne zestawienie starterów używanych do wyznaczania właściwości polimeraz.	57
6	Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia enzymatycznego plazmidów.	62
7	Skład mieszaniny reakcyjnej do otrzymywania wstawek metodą PCR.	63
8	Profil czasowo-temperaturowy otrzymywania wstawek do klonowania metodą PCR.	64
9	Skład mieszaniny reakcyjnej do klonowania metodą Gibsona.	66
10	Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji amplifikacji toczącego się koła (RCA). .	74
11	Skład mieszaniny reakcyjnej do izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32.	75
12	Podstawowe parametry zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Bsu.	82
13	Podstawowe parametry zaprojektowanych konstruktów z polimerazą Phi29 i białka gp32.	85
14	Tabelaryczne zestawienie par starterów wykorzystywanych do uzyskania odpowiednich wstawek do klonowania metodą Gibsona oraz wielkości tych wstawek.	86
15	Zestawienie optymalnych warunków nadprodukcji białek rekombinowanych z polimerazą Bsu.	93

16	Zestawienie optymalnych warunków nadprodukcji białek rekombinowanych z polimerazą Phi29 i białka gp32.	96
17	Zestawienie stężeń oczyszczonych preparatów białkowych.	112
18	Podsumowanie wyników wyznaczania jednostek aktywności z wyliczeniem jednostkowości specyficznej dla wariantów z polimerazą Bsu.	118
19	Zestawienie ilość użytych jednostek aktywności polimeraz DNA do zaobserwowania opóźnienia migracji w żelu dla różnych form kwasów nukleinowych.	134
20	Zestawienie optymalnych warunków izotermicznej amplifikacji DNA dla wszystkich badanych polimeraz.	141
21	Zestawienie minimalnych ilości polimerazy i matrycy oraz najkrótszego czasu izotermicznej amplifikacji DNA dla wszystkich badanych polimeraz.	142
22	Zestawienie danych wpływu temperatury na badane polimerazy.	146
23	Zestawienie danych dotyczących zakresów tolerancji na obecność wybranych inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej dla wszystkich badanych polimeraz.	153

Załączniki

A. Sekwencje aminokwasowe

A.1. Polimeraza Bsu

GTERKKLVLDGNSLAYRAFFALPLLSNDKGVHTNAVYGFAMILMKMLEDEKPTHMLVAFDAGKTTFRHGTFK
EYKGGRQKTPPELSEQMPFIRELLDAYQISRYELEQYEADDIIGTLAKSAEKDGFVVKVFS GDKDLTQLATDK
TTVAITRKGITDVEFYTPPEHVKEKYGLTPEQIIDMKGLMGDSSDNIPGVPVGEKTAIKLLKQFDSVEKLLES
IDEVSGKKLKEKLEEFKDQALMSKELATIMTDAPIEVS SVSGLEYQG FNREQVIAIFKDLGFNTLLERLGEDSA
EAEQDQSLEDINVKT VTDVTSDILVSPSAFVVEQIGDNYHEEPILGFSIVNETGAYFIPKDIAVESEVFKEWV
ENDEQKKWVFDSKRAVVALRWQGIELKGAEFDTLLAAYIINPGNSYDDVASVAKDYGLHIVSSDES VYGKGAK
RAVPSEDV LSEHLGRKALAIQSLREKLVQELNNDQLELFEELEMP LALILGEMESTGVKVDVDRLKRMGEEL
GAKLKEYEEKIHEIAGEPFNINSPKQLGVILFEKIGLPVVKTKTKGYSTSADVLEKLADKHDIVDYILQYRQI
GKLQSTYIEGLLKVTRPDSHKVHTRFNQALTQTGRLSSTDPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSEKDWLIFAAD
YSQIELRVLAHISKDENLIEAFTNDMDIHTKTAMDVFHVAKDEVTSAMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLSQNLG
ITRKEAGAFIDRYLESFQGVKAYMEDSVQEAKQKGYVTTLMHRRRYIPELTSRNFNIRSFAERTAMNTPIQGS
AADIKKAMIDMAAKLKEKQLKARLLLQVHDELIFEAPKEEIEILEKLVPEVMEHALALDVPLKVDFASGPSW
YDAK

A.2. Duża podjednostka polimerazy Bsu (Bsu large)

QSLEDINVKTVDVTSDILVSPSAFVVEQIGDNYHEEPILGFSIVNETGAYFIPKDIAVESEVFKEWVENDEQ
KKWVFDSKRAVVALRWQGIELKGAEFDTLLAAYIINPGNSYDDVASVAKDYGLHIVSSDESVMGKAKRAVPS
EDVLSEHLGRKALAIQSLREKLVQELNNDQLELFELEEMPLALILGEMESTGVKVDVDRDKRMGEELGAKLK
EYEEKIHEIAGEPFNINSPKQLGVILFEKIGLPVVKKTKTGYSTSADVLEKLADKHDIVDYILQYRQIGKLQS
TYIEGLLKVTRPDSHKVHTRFNQALTQTGRLSSTDPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSEKDWLIFAADYSQIE
LRVLAHISKDENLIEAFTNDMDIHTKTAMDVFHVAKDEVTSAMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLSQNLGITRKE
AGAFIDRYLESFQGVKAYMEDSVQEAQKQGYVTTLMHRRRYIPELTSRNFNIRSFAERTAMNTPIQGSAADII
KKAMIDMAAKLKEKQLKARLLLQVHDELIFEAPKEEIEILEKLVPVMEHALALDVPLKVDFASGPSWYDAK

A.3. Polimeraza Phi29

KHMPRKMYSCDFETTTKVEDCRVWAYGYMNIEDHSEYKIGNSLDEFMAWVLKVQADLYFHNLFKDFGAFIINWL
ERNFGKWSADGLPNTYNTIISRMGQWYMIDICLGYKGKRKIHTVIYDSLKKLPFPVKKIAKDFKLTVLKGDID
YHKERPVGKITPEEYAYIKNDIQIIAERLLIQFKQLDRMTAGSDSLKGFKDIITTKFKKVFP TLSLGLDK
EVRYAYRGGFTWLNDRFKEKEIGEGMVFVDVNSLYPAQMYSRLLPYGEPVFEFGKYVWDEDYPLHIQHIRCEFE
LKEGYIPTIPIKRSRFYKGYEYLKSSGGEIADLWLSNVDLELMKEHYDLYNVEYISGLKFKATTGLFKDFIDK
WTYIKTTSEGAIKQLAKLMLNSLYGKFASNPDVTGKVPYKENGALGFRLGEEETKDPVYTPMGVFITAWARY
TTITAAQACYDRIIYCDTDSIHLTGTEIPDVIKDIVDPKKLGYWAHESTFKRVKYLRQKTYIQDIYMKEVDGK
LVEGSPDDYTDIKFSVKCAGMTDKIKKEVTFENFKVGF SRKMKPKPVQVPGGVVLVDDTFTIK

A.4. Białko gp32

FKRKSTAELAAQMAKLNGNKGFSSEDKGEWKLKLDNAGNGQAVIRFLPSKNDEQAPFAILVNHGFKKNGKWYI
ETCSSTHG DYDSCPVCQYISKNDLYNTDNKEYSLVKRKT SYWANILVVKDPAAPENEGKVFKYRFGKKIWDKI
NAMIAVDVEMGETPVDVTCPWEGANFVLKVKQVSGFSNYDESKFLNQSAIPNIDDES FQKELFEQMVDLSEMT
SKDKFKSFEELNTKFGQVMGTAVMGAAATAAKKADKVADDLDAFNVD DFNTKTEDDFMSSSSGSSSSADDTD
LDDLLNDL

A.5. Białko NeqSSB

DEEELIQLII EKTGKSREEIEKMVEEKIKAFNNLISRRGALLLVAKKLGVLKNTPKKIGELESWEYVKVK
GKILKSFG LISYSKGKFQPIILGDETGTIKAIIWNTDKELPENTVIEAIGKTKINKKTGNLELHIDSYKILES
DLEIKPQKQEFVGICIVKYPKKQTQKGTIVSKAILTSLDRELPPVVFND FDFWEIGHIYKVYGLKKNIKTGKI
EFFADKVEEATLKD LKAFKGEAD

A.6. Białko Neq150

DLEEIRKKKLEELKKEEAKRKLLEQLESNVMQYLTSEAKQRLYNIKMAHPEKYELALQILYRVIQQTPTIIDD
TTLKKLLAKLFQKREPKIRFIRK

A.7. Łącznik

GSGGVD

A.8. Znacznik His-tag

HHHHHH

Bibliografia

- [1] M. Kanehisa, S. Goto. Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1):27–30, 2000.
- [2] M. Kanehisa. Protein Function Prediction: Methods and Protocols. Rozdział Enzyme Annotation and Metabolic Reconstruction Using KEGG, 135–145, New York, Springer New York, 2017.
- [3] H.-M. Eun. Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology. Rozdział 7 - RNA Polymerases, 491-565, San Diego, Academic Press, 1996.
- [4] M. M. Lai. Cellular Factors in the Transcription and Replication of Viral RNA Genomes: A Parallel to DNA-Dependent RNA Transcription. *Virology*, 244(1):1–12, 1998.
- [5] C. Lipardi, Q. Wei, B. M. Paterson. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107(3):297–307, 2001.
- [6] G. Maga. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Rozdział Reverse Transcriptase, 222-223, San Diego, Academic Press, 2013.
- [7] H.-M. Eun. Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology. Rozdział 6 - DNA Polymerases, 345-489, San Diego, Academic Press, 1996.
- [8] I. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid: I. PREPARATION OF SUBSTRATES AND PARTIAL PURIFICATION OF AN ENZYME FROM *ESCHERICHIA COLI*. *Journal of Biological Chemistry*, 233(1):163–170, 1958.
- [9] P. Argos. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16(21):9909–9916, 1988.
- [10] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*,

- 313(6005):762–766, 1985.
- [11] L. S. Beese, V. Derbyshire, T. A. Steitz. Structure of DNA Polymerase I Klenow Fragment Bound to Duplex DNA. *Science*, 260(5106):352–355, 1993.
 - [12] T. A. Steitz. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25):17395–17398, 1999.
 - [13] M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering, Design and Selection*, 3(6):461–467, 1990.
 - [14] A. A. Kuznetsova, O. S. Fedorova, N. A. Kuznetsov. Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 2022.
 - [15] A. J. Berdis. Mechanisms of DNA Polymerases. *Chemical Reviews*, 109(7):2862–2879, 2009.
 - [16] J. D. Watson, F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
 - [17] W. A. Beard, S. H. Wilson. Structural Insights into the Origins of DNA Polymerase Fidelity. *Structure*, 11(5):489–496, 2003.
 - [18] A. T. Raper, A. J. Reed, Z. Suo. Kinetic Mechanism of DNA Polymerases: Contributions of Conformational Dynamics and a Third Divalent Metal Ion. *Chemical Reviews*, 118(12):6000–6025, 2018.
 - [19] J. Ito, D. K. Braithwaite. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Research*, 19(15):4045–4057, 1991.
 - [20] D. K. Braithwaite, J. Ito. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 21(4):787–802, 1993.
 - [21] I. K. O. Cann, K. Komori, H. Toh, S. Kanai, Y. Ishino. A heterodimeric DNA polymerase: Evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24):14250–14255, 1998.
 - [22] Y. Ishino, K. Komori, I. K. O. Cann, Y. Koga. A novel DNA polymerase family found in *Archaea*. *Journal of Bacteriology*, 180(8):2232–2236, 1998.
 - [23] H. Ohmori, E. C. Friedberg, R. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, Z. Wang, R. Woodgate. The Y-Family of DNA Polymerases. *Molecular Cell*, 8(1):7–8, 2001.

- [24] J. Filée, P. Forterre, T. Sen-Lin, J. Laurent. Evolution of DNA Polymerase Families: Evidences for Multiple Gene Exchange Between Cellular and Viral Proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 54(6):763–773, 2002.
- [25] T. Okazaki, A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid: XV. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A POLYMERASE FROM BACILLUS SUBTILIS. *Journal of Biological Chemistry*, 239(1):259–268, 1964.
- [26] K. B. Gass, T. C. Hill, M. Goulian, B. S. Strauss, N. R. Cozzarelli. Altered Deoxyribonucleic Acid Polymerase Activity in a Methyl Methanesulfonate-Sensitive Mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 108(1):364–374, 1971.
- [27] P. J. Laipis, A. Ganesan. A Deoxyribonucleic Acid Polymerase I-deficient Mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 247(18):5867–5871, 1972.
- [28] K. B. Gass, N. R. Cozzarelli. Further Genetic and Enzymological Characterization of the Three *Bacillus subtilis* Deoxyribonucleic Acid Polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 248(22):7688–7700, 1973.
- [29] H. Klenow, K. Overgaard-Hansen. Proteolytic cleavage of DNA polymerase from *escherichia coli* B into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS Letters*, 6(1):25–27, 1970.
- [30] H. Klenow, K. Overgaard-Hansen, S. A. Patkar. Proteolytic Cleavage of Native DNA Polymerase into Two Different Catalytic Fragments. *European Journal of Biochemistry*, 22(3):371–381, 1971.
- [31] C. M. Joyce, T. A. Steitz. DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics. *Trends in Biochemical Sciences*, 12:288–292, 1987.
- [32] A. M. Lau, N. Bordin, S. M. Kandathil, I. Sillitoe, V. P. Waman, J. Wells, C. A. Orengo, D. T. Jones. Exploring structural diversity across the protein universe with The Encyclopedia of Domains. *Science*, 386(6721):eadq4946, 2024.
- [33] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873):583–589, 2021.
- [34] M. Varadi, D. Bertoni, P. Magana, U. Paramval, I. Pidruchna, M. Radhakrishnan, M. Tsenkov, S. Nair, M. Mirdita, J. Yeo, O. Kovalevskiy, K. Tunyasuvunakool,

- A. Laydon, A. Žídek, H. Tomlinson, D. Hariharan, J. Abrahamson, T. Green, J. Jumper, E. Birney, M. Steinegger, D. Hassabis, S. Velankar. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1):D368–D375, 2023.
- [35] AlphaFold Protein Structure Database - DNA polymerase I, alphafold.ebi.ac.uk. Dostęp: 02.04.2025.
- [36] UniProt - O34996 · DPO1_BACSU, www.uniprot.org. Dostęp: 02.04.2025.
- [37] New England Biolabs - Bsu DNA Polymerase, Large Fragment, www.neb.com. Dostęp: 02.04.2025.
- [38] EURx - Bsu DNA Polymerase, eurx.com.pl. Dostęp: 02.04.2025.
- [39] Intact Genomics - Bsu DNA Polymerase Large Fragment, intactgenomics.com. Dostęp: 02.04.2025.
- [40] O. Pipenburg, N. A. Armes, D. L. Stemple. Recombinase polymerase amplification. Patent US20050112631A1, USA, 2002.
- [41] L. Blanco, M. Salas. Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(17):5325–5329, 1984.
- [42] L. Blanco, A. Bernad, J. M. Lázaro, G. Martín, C. Garmendia, M. Salas. Highly Efficient DNA Synthesis by the Phage Φ 29 DNA Polymerase: Symmetrical Mode of DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15):8935–8940, 1989.
- [43] S. Kamtekar, A. J. Berman, J. Wang, J. M. Lázaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas, T. A. Steitz. The Φ 29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *The EMBO Journal*, 25(6):1335–1343, 2006.
- [44] L. Blanco, M. Salas. Relating Structure to Function in Φ 29 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(15):8509–8512, 1996.
- [45] R. Eisenbrandt, J. M. Lázaro, M. Salas, M. d. Vega. Φ 29 DNA polymerase residues Tyr59, His61 and Phe69 of the highly conserved ExoII motif are essential for interaction with the terminal protein. *Nucleic Acids Research*, 30(6):1379–1386, 2002.
- [46] I. Rodríguez, J. M. Lázaro, M. Salas, M. de Vega. Φ 29 DNA Polymerase Residue Phe128 of the Highly Conserved (S/T)Lx2h Motif is Required for a Stable and Functional Interaction with the Terminal Protein. *Journal of Molecular Biology*, 325(1):85–97, 2003.
- [47] P. Pérez-Arnaiz, J. M. Lázaro, M. Salas, M. de Vega. Φ 29 DNA Polymerase Active

- Site: Role of Residue Val250 as Metal-dNTP Complex Ligand and in Protein-Primed Initiation. *Journal of Molecular Biology*, 395(2):223–233, 2010.
- [48] V. Truniger, J. M. Lázaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas. Φ 29 DNA Polymerase Residue Leu384, Highly Conserved in Motif B of Eukaryotic Type DNA Replicases, Is Involved in Nucleotide Insertion Fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35):33482–33491, 2003.
- [49] S. Kamtekar, A. J. Berman, J. Wang, J. M. Lázaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas, T. A. Steitz. Insights into Strand Displacement and Processivity from the Crystal Structure of the Protein-Primed DNA Polymerase of Bacteriophage Φ 29. *Molecular Cell*, 16(4):609–618, 2004.
- [50] UniProt - P03680 · DPOL_BPPH2, www.uniprot.org. Dostęp: 03.04.2025.
- [51] New England Biolabs - phi29 DNA Polymerase, www.neb.com. Dostęp: 03.04.2025.
- [52] EURx - phi29 DNA Polymerase, eurx.com.pl. Dostęp: 03.04.2025.
- [53] Thermo Fisher Scientific - phi29 DNA Polymerase (10 U/ μ L), www.thermofisher.com. Dostęp: 03.04.2025.
- [54] P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics*, 19(3):225–232, 1998.
- [55] F. B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm, R. S. Lasken. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8):5261–5266, 2002. Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [56] Encyklopedia PWN - Amplifikacja DNA, encyklopedia.pwn.pl. Dostęp: 05.04.2025.
- [57] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, 1985.
- [58] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, 1988.
- [59] K. B. Mullis, F. A. Faloona. Recombinant DNA Part F. Rozdział [21] Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, 335-350, Academic Press, 1987.

- [60] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10):986–994, 1996.
- [61] U. E. Gibson, C. A. Heid, P. M. Williams. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10):995–1001, 1996.
- [62] B. Vogelstein, K. W. Kinzler. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16):9236–9241, 1999.
- [63] J. S. Chamberlain, R. A. Gibbs, J. E. Rainer, P. N. Nguyen, C. Thomas. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23):11141–11156, 1988.
- [64] O. Henegariu, N. Heerema, S. Dlouhy, G. Vance, P. V. and. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3):504–511, 1997. PMID: 9298224.
- [65] M. Śpibida, B. Krawczyk, M. Olszewski, J. Kur. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics*, 58(1):133–142, 2017.
- [66] J. Obradovic, V. Jurisic, N. Tasic, J. Mrdjanovic, B. Perin, S. Pavlovic, N. Djordjevic. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(6):487–493, 2013.
- [67] N. Assal, M. Lin. PCR procedures to amplify GC-rich DNA sequences of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods*, 181:106121, 2021.
- [68] C. M. Hommelsheim, L. Frantzeskakis, M. Huang, B. Ülker. PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications. *Scientific Reports*, 4(1):5052, 2014.
- [69] C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5):1014–1026, 2012.
- [70] W. A. Al-Soud, P. Rådström. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2):485–493, 2001.
- [71] M. Sidstedt, J. Hedman, E. L. Romsos, L. Waitara, L. Wadsö, C. R. Steffen, P. M. Vallone, P. Rådström. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(10):2569–2583, 2018.
- [72] M. Yokota, N. Tatsumi, O. Nathalang, T. Yamada, I. Tsuda. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13(3):133–140, 1999.
- [73] G. Khan, H. O. Kangro, P. J. Coates, R. B. Heath. Inhibitory effects of urine

- on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, 44(5):360–365, 1991.
- [74] P.-G. Lantz, M. Matsson, T. Wadström, P. Rådström. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 28(3):159–167, 1997.
- [75] R. M. Bennett, J. Davis. Lactoferrin interacts with deoxyribonucleic acid: a preferential reactivity with double-stranded DNA and dissociation of DNA-anti-DNA complexes. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 99(1):127–138, 1982.
- [76] W. A. Al-Soud, L. J. Jönsson, P. Rådström. Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1):345–350, 2000.
- [77] M. Abbaszadegan, M. S. Huber, C. P. Gerba, I. L. Pepper. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5):1318–1324, 1993.
- [78] K. L. Opel, D. Chung, B. R. McCord. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1):25–33, 2010.
- [79] L. Monteiro, D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, F. Mégraud. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4):995–998, 1997.
- [80] C. Baar, M. d’Abbadie, A. Vaisman, M. E. Arana, M. Hofreiter, R. Woodgate, T. A. Kunkel, P. Holliger. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 39(8):e51–e51, 2011.
- [81] J. Glökler, T. S. Lim, J. Ida, M. F. and. Isothermal amplifications – a comprehensive review on current methods. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56(6):543–586, 2021. PMID: 34263688.
- [82] J. C. Guatelli, K. M. Whitfield, D. Y. Kwoh, K. J. Barringer, D. D. Richman, T. R. Gingeras. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5):1874–1878, 1990.
- [83] J. Compton. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350(6313):91–92, 1991.
- [84] D. O. Bastos, R. M. Perez, I. S. Silva, L. B. Lemos, J. P. Simonetti, J. O. Medina-Pestana, A. E. B. Silva, M. L. Ferraz. Transcription-mediated amplification (TMA) for the assessment of viremia in hemodialysis patients with hepatitis c.

- Journal of Medical Virology*, 84(4):596–600, 2012.
- [85] G. T. Walker, M. C. Little, J. G. Nadeau, D. D. Shank. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(1):392–396, 1992.
 - [86] G. T. Walker, M. S. Fraiser, J. L. Schram, M. C. Little, J. G. Nadeau, D. P. Malinowski. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 20(7):1691–1696, 1992.
 - [87] J. V. Ness, L. K. V. Ness, D. J. Galas. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8):4504–4509, 2003.
 - [88] W. Zhou, L. Hu, L. Ying, Z. Zhao, P. K. Chu, X.-F. Yu. A CRISPR–Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nature Communications*, 9(1):5012, 2018.
 - [89] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12):e63–e63, 2000.
 - [90] J. Fischbach, M. Frohme, J. Glöckler. Hinge-initiated Primer-dependent Amplification of Nucleic Acids (HIP) – A New Versatile Isothermal Amplification Method. *Scientific Reports*, 7(1):7683, 2017.
 - [91] M. Vincent, Y. Xu, H. Kong. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports*, 5(8):795–800, 2004.
 - [92] O. Piepenburg, C. H. Williams, D. L. Stemple, N. A. Armes. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLOS Biology*, 4(7), 2006.
 - [93] M. J. Hoser, H. K. Mansukoski, S. W. Morrical, K. E. Eboigbodin. Strand Invasion Based Amplification (SIBA®): A Novel Isothermal DNA Amplification Technology Demonstrating High Specificity and Sensitivity for a Single Molecule of Target Analyte. *PLOS ONE*, 9(11):1–20, 2014.
 - [94] C. O. Nzelu, H. Kato, N. C. Peters. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *leishmania* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(11):1–21, 2019.
 - [95] H. Zhu, S. Zhao, J. Luo, M. K. Obaid, S. Zhang, P. Liu, J. Luo, H. Yin, J. Liu, G. Guan. Differential detection of ovine *Theileria* species using loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor. *Veterinary Parasitology*, 336:110443, 2025.

- [96] M. Kamel, J. L. Davidson, J. M. Schober, G. S. Fraley, M. S. Verma. A paper-based loop-mediated isothermal amplification assay for highly pathogenic avian influenza. *Scientific Reports*, 15(1):12110, 2025.
- [97] M. A. Koryukov, I. P. Oscorbin, M. A. Gordukova, I. E. Turina, A. I. Aminova, M. L. Filipenko. Novel multitarget LAMP and PCR assays for the detection of *bordetella* species. *Methods*, 2025.
- [98] L. Lumkong, R. Alatrash, S. Sridhar, P. B. Tonto, B. B. Herrera. Development of an RT-RPA assay for La Crosse virus detection provides insights into age-dependent neuroinvasion in mice. *Virology Journal*, 22(1):95, 2025.
- [99] V. Hallur, M. Sable, P. Parida, S. Sahu, M. Tudu, S. Bahinipati, M. Sahoo, A. Lenka, R. Dey, P. Gahlot, S. Sarkar. Development and evaluation of real-time recombinase polymerase amplification assay for fast identification of *Rhizopus arrhizus*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 55:100845, 2025.
- [100] C. Lu, J. Wang, L. Pan, X. Gu, W. Lu, D. Chen, C. Zhang, Q. Ye, C. Xiao, P. Liu, Y. Tang, B. Tang, G. Huang, J. Fang, H. Jiang. Rapid detection of multiple resistance genes to last-resort antibiotics in *Enterobacteriaceae* pathogens by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022, 2023.
- [101] Hologic Inc., www.hologic.org. Dostęp: 12.04.2025.
- [102] S. Barreda-García, R. Miranda-Castro, N. de-los Santos-Álvarez, A. J. Miranda-Ordieres, M. J. Lobo-Castañón. Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by an electrochemical genomagnetic assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(30):8603–8610, 2016.
- [103] R. K. Shanmugakani, W. Bonam, D. Erickson, S. Mehta. An isothermal amplification-based point-of-care diagnostic platform for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*: A proof-of-concept study. *Current Research in Biotechnology*, 3:154–159, 2021.
- [104] T. Murakami, J. Sumaoka, M. Komiyama. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation–rolling circle amplification. *Nucleic Acids Research*, 37(3):e19–e19, 2008.
- [105] G. Nallur, C. Luo, L. Fang, S. Cooley, V. Dave, J. Lambert, K. Kukanskis, S. Kingsmore, R. Lasken, B. Schweitzer. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 29(23):e118–e118, 2001.
- [106] D. A. Smirnov, J. T. Burdick, M. Morley, V. G. Cheung. Method for manufacturing

- whole-genome microarrays by rolling circle amplification. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 40(1):72–77, 2004.
- [107] X. Yu, H. Yang, J. Liu, Y. Qi, L. Sun, X. Tian. A strategy for a high enrichment of insect mitochondrial DNA for mitogenomic analysis. *Gene*, 808:145986, 2022.
- [108] Y. Wang, Z. Wang, Z. Zhan, J. Liu, T. Deng, H. Xu. Fluorescence detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin functionalized magnetic beads combined with rolling circle amplification in fruit juice. *Analytica Chimica Acta*, 1189:339213, 2022.
- [109] T. Shibata, R. P. Cunningham, C. DasGupta, C. M. Radding. Homologous pairing in genetic recombination: complexes of recA protein and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5100–5104, 1979.
- [110] T. Yonesaki, Y. Ryo, T. Minagawa, H. Takahashi. Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, *UvsX* and *UvsY*. *European Journal of Biochemistry*, 148(1):127–134, 1985.
- [111] T. Formosa, B. M. Alberts. Purification and characterization of the T4 bacteriophage *UvsX* protein. *Journal of Biological Chemistry*, 261(13):6107–6118, 1986.
- [112] L. D. Harris, J. D. Griffith. Formation of D-loops by the *UvsX* protein of T4 bacteriophage: a comparison of the reaction catalyzed in the presence or absence of gene 32 protein. *Biochemistry*, 27(18):6954–6959, 1988.
- [113] S. Morrical, B. Alberts. The *UvsY* protein of bacteriophage T4 modulates recombination-dependent DNA synthesis *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25):15096–15103, 1990.
- [114] TwistDX Inc., www.twistdx.co.uk. Dostęp: 13.04.2025.
- [115] A. Fire, S. Q. Xu. Rolling replication of short DNA circles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10):4641–4645, 1995.
- [116] M. M. Ali, F. Li, Z. Zhang, K. Zhang, D.-K. Kang, J. A. Ankrum, X. C. Le, W. Zhao. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43:3324–3341, 2014.
- [117] A. M. Diegelman, E. T. Kool. Generation of circular RNAs and trans -cleaving catalytic RNAs by rolling transcription of circular DNA oligonucleotides encoding hairpin ribozymes. *Nucleic Acids Research*, 26(13):3235–3241, 1998.
- [118] F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Research*, 11(6):1095–1099, 2001.
- [119] F. Dahl, J. Banér, M. Gullberg, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, M. Nilsson.

- Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13):4548–4553, 2004.
- [120] Y. Zhang, N. A. Tanner. Isothermal Amplification of Long, Discrete DNA Fragments Facilitated by Single-Stranded Binding Protein. *Scientific Reports*, 7(1):8497, 2017.
- [121] W. H. Hudson, E. A. Ortlund. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(11):749–760, 2014.
- [122] B. M. Lunde, C. Moore, G. Varani. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6):479–490, 2007.
- [123] S. C. Harrison. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, 353(6346):715–719, 1991.
- [124] A. Murzin. Ob(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *The EMBO Journal*, 12(3):861–867, 1993.
- [125] N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Berman, J. M. Thornton. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology*, 1(1):reviews001.1, 2000.
- [126] D. L. Theobald, R. M. Mitton-Fry, D. S. Wuttke. Nucleic Acid Recognition by OB-Fold Proteins. *Annual Review of Biophysics*, 32:115–133, 2003.
- [127] J. Wang, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. Lu, G. Marchler, J. Song, N. Thanki, R. Yamashita, M. Yang, D. Zhang, C. Zheng, C. Lanczycki, A. Marchler-Bauer. The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1):D384–D388, 2022.
- [128] J. Kur, M. Olszewski, P. Filipkowski. Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) - sources and applications in molecular biology. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3):569–574, 2005.
- [129] M. Śpibida, K. Szemiako, M. Olszewski, D. Nidzworski. Fusion single-stranded DNA polymerase Bst, nucleic acid molecule encoding fusion DNA polymerase NeqSSB-Bst, method of preparation and utilisation thereof. Patent WO2020005084A1, WO, 2020.
- [130] M. Olszewski, M. Śpibida, M. Bilek, B. Krawczyk. Fusion of Taq DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of *Nanoarchaeum equitans* — Expression and characterization. *PLoS ONE*, 12(9):e0184162, 2017.
- [131] M. Skwarecka, K. Szemiako, M. Olszewski, S. Żołędowska, D. Nidzworski. Polimeraza Pwo-NeqSSB, sposób jej otrzymywania, plazmid rekombinantowy, startery oraz zastosowanie polimerazy. Patent PL241698B1, PL, 2021.

- [132] J. E. Lee, R. J. Potter, D. Mandelman. Ssb-polymerase-fusionsproteine. Patent EP1934372B1, EP, 2006.
- [133] M. Śpibida, B. Krawczyk, B. Zalewska-Piątek, R. Piątek, M. Wysocka, M. Olszewski. Fusion of DNA-binding domain of *Pyrococcus furiosus* ligase with TaqStoffel DNA polymerase as a useful tool in PCR with difficult targets. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2):713–721, 2018.
- [134] J. Wu, A. de Paz, B. M. Zamft, A. H. Marblestone, E. S. Boyden, K. P. Kording, K. E. J. Tyo. DNA binding strength increases the processivity and activity of a Y-Family DNA polymerase. *Scientific Reports*, 7(1):4756, 2017.
- [135] Y. Wang. Nucleic acid modifying enzymes. Patent US6627424B1, USA, 2003.
- [136] Y. Wang. Improved nucleic acid modifying enzymes. Patent WO2001092501A1, WO, 2001.
- [137] B. M. Alberts, L. Frey. T4 Bacteriophage Gene 32: A Structural Protein in the Replication and Recombination of DNA. *Nature*, 227(5265):1313–1318, 1970.
- [138] Y. Shamoo, A. M. Friedman, M. R. Parsons, W. H. Konigsberg, T. A. Steitz. Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. *Nature*, 376(6538):362–366, 1995.
- [139] B. A. Cashen, M. Morse, I. Rouzina, R. L. Karpel, M. C. Williams. C-terminal Domain of T4 gene 32 Protein Enables Rapid Filament Reorganization and Dissociation. *Journal of Molecular Biology*, 436(9):168544, 2024.
- [140] I. Schiopu, I. Dragomir, A. Asandei. Single molecule technique unveils the role of electrostatic interactions in ssDNA–gp32 molecular complex stability. *RSC Advances*, 14:5449–5460, 2024.
- [141] E. Waters, M. J. Hohn, I. Ahel, D. E. Graham, M. D. Adams, M. Barnstead, K. Y. Beeson, L. Bibbs, R. Bolanos, M. Keller, K. Kretz, X. Lin, E. Mathur, J. Ni, M. Podar, T. Richardson, G. G. Sutton, M. Simon, D. Söll, K. O. Stetter, J. M. Short, M. Noordewier. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22):12984–12988, 2003.
- [142] National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information. NCBI - *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M chromosome, complete genome; GenBank: AE017199.1, www.ncbi.nlm.nih.gov. Dostęp: 22.04.2025.
- [143] M. Olszewski, J. Balsewicz, M. Nowak, N. Maciejewska, A. Cyranka-Czaja, B. Zalewska-Piątek, R. Piątek, J. Kur. Characterization of a single-stranded

- DNA-binding-like protein from *Nanoarchaeum equitans* — a nucleic acid binding protein with broad substrate specificity. *PLOS ONE*, 10(5):1–21, 2015.
- [144] K. Marlicka, K. M. Serafin, J. A. Sobieska, J. M. Szeptycka, J. E. Szumska, K. Dobrzyńska-Kobylec, M. Olszewski, K. P. Szymańska. A new small and resilient nucleic acid binding protein from *Nanoarchaeum equitans*. *Molecular Biotechnology*, zaakceptowano: 06.06.2025.
- [145] G. Zieliński. Otrzymywanie i charakterystyka molekularna domen białka wiążącego kwasy nukleinowe *Nanoarchaeum equitans*. Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 2019.
- [146] AlphaFold Protein Structure Database - NEQ199 i NEQ150, alphafold.ebi.ac.uk. Dostęp: 22.04.2025.
- [147] J. Nilsson, S. Ståhl, J. Lundeberg, M. Uhlén, P. Åke Nygren. Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification, and Immobilization of Recombinant Proteins. *Protein Expression and Purification*, 11(1):1–16, 1997.
- [148] J.-H. Bae, B. H. Sung, J.-W. Seo, C. H. Kim, J.-H. Sohn. A novel fusion partner for enhanced secretion of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24):10453–10461, 2016.
- [149] G. Yadav. So, How Can the Sso7d Fusion Polymerase Technology Help Your PCR?, 2015. www.bioradiations.com. Dostęp: 11.03.2025.
- [150] M. de Vega, J. M. Lázaro, M. Mencía, L. Blanco, M. Salas. Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38):16506–16511, 2010.
- [151] M. S. Falgueras, M. D. V. Jose, J. M. L. Bolos, L. B. Davila, M. M. Caballero. Phage ϕ 29 DNA polymerase chimera. Patent US8404808B2, USA, 2013.
- [152] J. Wahlfors, S. Loimas, T. Pasanen, T. Hakkarainen. Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochemistry and Cell Biology*, 115(1):59–65, 2001.
- [153] M. Islam, T. Negishi, N. Kitamoto, Y. Hatoyama, K. Gamo, K.-i. Hayashi, M. T. Kanemaki. A single-chain antibody-based AID2 system for conditional degradation of GFP-tagged and untagged proteins. *bioRxiv*, 2025.
- [154] S. Balkhi, G. Bilato, A. De Lerma Barbaro, P. Orecchia, A. Poggi, L. Mortara. Efficacy of Anti-Cancer Immune Responses Elicited Using Tumor-Targeted IL-2 Cytokine and Its Derivatives in Combined Preclinical Therapies. *Vaccines*, 13(1), 2025.

- [155] Y. Wang, X. Qian, Y. Wang, C. Yu, L. Feng, X. Zheng, Y. Wang, Q. Gong. Turn TRAIL Into Better Anticancer Therapeutic Through TRAIL Fusion Proteins. *Cancer Medicine*, 14(1):e70517, 2025. e70517 CAM4-2024-08-4751.R1.
- [156] X. Wu, J. Liu, X. Yin, D. Ma, S. Zhang, X. Liu. Protein Fusion of Biosynthetic Enzymes and a Thermo-Responsive Polypeptide Expedites Facile Access to Biocatalysts for Nucleotide Sugars. *ChemBioChem*, 26(8):e202401005, 2025.
- [157] H.-Y. Liu, F. Qian, H.-M. Zhang, Q. Gui, Y.-W. Wang, P. Wang. Tri-enzyme fusion of tryptophan halogenase achieves a concise strategy for coenzyme self-sufficiency and the continuous halogenation of L-tryptophan. *Biotechnology Journal*, 19(4):2300557, 2024.
- [158] F. Michailidou. Engineering of Therapeutic and Detoxifying Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition*, 62(46):e202308814, 2023.
- [159] J. Liu, X. Zhang, Z. Shao, J. Yang, H. Zhang. Leucine zipper as a bridge for transaminase self-assembly: A fusion enzyme for efficient chiral conversion of D-phenylglycine. *Bioorganic Chemistry*, 147:107382, 2024.
- [160] A. Bonfigli, P. Cesare, A. R. Volpe, S. Colafarina, A. Forgione, M. Aloisi, O. Zarivi, A. M. G. Poma. Estimation of DNA Degradation in Archaeological Human Remains. *Genes*, 14(6), 2023.
- [161] J. Lázaro, L. Blanco, M. Salas. DNA Replication. Rozdział [5] Purification of bacteriophage Φ 29 DNA polymerase, 42-49, Academic Press, 1995.
- [162] S. M. Gheibihayat, N. Farahani, B. Golichenari, A. Sahebkar. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 2018.
- [163] U. Brockmeier, M. Wendorff, T. Eggert. Versatile Expression and Secretion Vectors for *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 52(2):143–148, 2006.
- [164] K. Marlicka, K. P. Szymańska, M. Olszewski. Sposób otrzymywania fuzyjnych polimeraz izotermicznych Bsu z *Bacillus subtilis* z białkiem gp32 z faga T4, konstrukt 6xHis-gp32-L-Bsu, konstrukt Bsu-L-gp32-6xHis, fuzyjna polimeraza izotermiczna Bsu z białkiem gp32 na N-końcu, fuzyjna polimeraza izotermiczna Bsu z białkiem gp32 na C-końcu, zestaw do przeprowadzenia amplifikacji izotermicznej oraz zastosowanie fuzyjnych izotermicznych polimeraz Bsu. Zgłoszenie wynalazku nr P.452372, PL, 2025.
- [165] K. Marlicka, K. P. Szymańska, M. Olszewski, J. E. Szumska. Sposób otrzymywania fuzyjnych polimeraz izotermicznych Bsu z *Bacillus subtilis* z białkiem Neq150 z *Nanoarchaeum equitans*, konstrukt Bsu-L-Neq150-6xHis, konstrukt Bsu

large-L-Neq150-6xHis, fuzyjna polimeraza izotermiczna Bsu z białkiem Neq150 na C-końcu, fuzyjna polimeraza izotermiczna Bsu large z białkiem Neq150 na C-końcu, zestaw do przeprowadzenia amplifikacji izotermicznej oraz zastosowanie fuzyjnych izotermicznych polimeraz Bsu. Zgłoszenie wynalazku nr P.452373, PL, 2025.