



**Uniwersytet
Gdański**

Wydział Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego

Mgr inż. Joanna Nowicka

Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie
fuzyjnych form archealnej polimerazy
DNA

Production, characterization and application of fusion
forms of archeal DNA polymerase

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Marcin Olszewski, prof. PW
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków,
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Promotor pomocniczy: dr inż. Kasjan Szemiako
Laboratorium Genetyczne Zwierząt GeneVet Sp. z o. o.

GDAŃSK 2023

„Ścieżka, którą wytyczysz, może nie mieć sensu dla nikogo na świecie oprócz Ciebie. I nie musi. Jest wyłącznie Twoja.

Zacznij nią iść.”

Regina Brett

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Profesorowi Marcinowi Olszewskiemu za nieocenione wsparcie oraz cierpliwość na każdym etapie przygotowania rozprawy doktorskiej.

Dziękuję także mojemu Promotorowi Doktorowi Kasjanowi Szemiako za możliwość realizacji badań w laboratorium GeneVet oraz za wsparcie merytoryczne.

Dziękuję Pani Beacie Gromadzkiej za pomoc w odkryciu pasji oraz pokazanie mi, że w życiu nie ma rzeczy niemożliwych.

Dziękuję Mężowi, za nieustające dopingowanie mnie i wiarę tam, gdzie sama nie widziałam już wyjścia.

Kasiu, Natalio – za przyjaźń i wspólne przenoszenie gór.

Dziękuję Rodzicom i Teściom za to, że ani przez chwilę we mnie nie zwątpili, choć droga bywała kręta.

Dziękuję rodzinie, przyjaciołom oraz współpracownikom za życzliwość i dobre słowo. Za to, że każdego dnia dodawaliście mi sił do walki.

Cioci Helenie

Spis treści

1. Wykaz stosowanych oznaczeń i skrótów	17
2. Streszczenie.....	21
3. Abstract	23
4. Wstęp.....	25
4.1. Historia polimerazy DNA	25
4.2. Polimerazy DNA wykorzystywane w reakcji PCR	27
4.2.1. Ogólna charakterystyka polimeraz DNA	27
4.2.1.1. Rodzina A polimeraz DNA	30
4.2.1.2. Rodzina B polimeraz DNA.....	30
4.2.2. Polimeraza DNA <i>Thermus aquaticus</i>	31
4.2.3. Polimerazy DNA organizmów hipertermofilnych.....	33
4.3. Reakcja PCR.....	35
4.3.1. Podstawowe informacje o reakcji PCR	35
4.3.2. Mechanizm działania polimerazy DNA w reakcji PCR	36
4.3.3. Problemy w reakcji PCR	38
4.3.3.1. Niska wydajność amplifikacji.....	38
4.3.3.2. Powstawanie niespecyficznych produktów PCR.....	38
4.3.3.3. Tworzenie struktur dimerycznych	38
4.3.3.4. Fałszywie pozytywne wyniki	39
4.3.3.5. Amplifikacja fragmentów DNA bogatego w pary GC	39
4.3.3.6. Amplifikacja długich fragmentów DNA	40
4.3.3.7. Inhibitory reakcji PCR.....	40
4.3.3.7.1. Inhibitory obecne w badanych próbkach	40
4.3.3.7.2. Inhibitory chemiczne.....	41
4.3.4. Możliwe rozwiązania problemów występujących w reakcji PCR	42
4.3.4.1. Wzmacniacze reakcji PCR	42
4.3.4.2. Modyfikacje polimeraz DNA	44
4.3.4.2.1. Mutacje punktowe.....	45
4.3.4.2.1.1. Zmiany punktowe w polimerazie DNA Taq.....	45
4.3.4.2.2. Fuzyjne polimerazy DNA	46
4.3.4.2.2.1. Fuzyjne polimerazy DNA Taq	47
4.3.4.2.2.2. Fuzyjne polimerazy DNA Pfu	47
4.4. Przykłady białek wykorzystywanych do tworzenia fuzyjnych polimeraz DNA ..	49
4.4.1. Białka z rodziny Sul7d4	49
4.4.2. Białko NeqSSB.....	50
4.4.3. Białko RB69SSB	51
4.5. Wyzwania i perspektywy dotyczące modyfikacji polimeraz DNA	52
4.5.1. Ograniczenia w projektowaniu polimeraz DNA	53
4.5.2. Przykłady strategii pozyskiwania nowych polimeraz DNA.....	53
4.5.2.1. Polimerazy DNA pochodzenia roślinnego.....	53
4.5.2.2. Polimerazy DNA pochodzenia środowiskowego	54
4.5.2.3. Pojawiające się trendy i potencjalne innowacje dotyczące nowych wariantów fuzyjnych polimeraz DNA	54
5. Cel pracy	57
6. Materiały	58
6.1. Próbkki kliniczne	58
6.2. Szczepy bakteryjne	58

6.3. DNA bakteryjne i plazmidowe	58
6.4. Komercyjne zestawy do izolacji/oczyszczania DNA genomowego, plazmidowego	58
6.5. Zestaw do klonowania metodą Gibsona	59
6.6. Enzymy restrykcyjne.....	59
6.7. Podłoża mikrobiologiczne i pożywki.....	59
6.7.1. Pożywka płynna LB (Lurii-Bertaniego)	59
6.7.2. Pożywka stała LA	59
6.7.3. Roztwory antybiotyków i odczynników do pracy z bakteriami	60
6.8. Zestaw do oznaczania aktywności polimeraz DNA.....	60
6.9. Startery	60
6.9.1. Startery do amplifikacji fuzyjnych form polimerazy DNA	60
6.9.2. Startery do badania właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA.....	61
6.9.3. Startery wykorzystane do oznaczania procesywności otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA.....	62
6.10. Łącuchowa reakcja polimerazy	63
6.11. Odczynniki do analizy DNA w żelu agarozowym	65
6.12. Materiały do pracy z białkami.....	66
6.12.1. Odczynniki do analizy białek za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS -PAGE).....	66
6.12.2. Bufory i roztwory do oczyszczania białek	68
6.13. Materiały podstawowe	70
6.14. Aparatura	70
6.15. Pozostałe odczynniki.....	71
7. Metody.....	73
7.1. Metody wykorzystywane do pracy z DNA	73
7.1.1. Izolacja genomowego DNA	73
7.1.2. Izolacja plazmidowego DNA.....	73
7.1.3. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	73
7.1.4. Izolacja i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego.....	73
7.1.5. Amplifikacja genów kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA	74
7.1.6. Reakcje trawienia enzymami restrykcyjnymi	76
7.1.7. Konstrukcja fuzyjnych form polimerazy DNA przy użyciu reakcji Gibsona	76
7.2. Hodowle bakteryjne	77
7.2.1. Hodowle na podłożu stałym.....	77
7.2.2. Hodowle w pożywce płynnej	78
7.2.3. Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	78
7.2.4. Transformacja komórek <i>E. coli</i> rekombinowanym DNA	79
7.3. Sprawdzenie obecności DNA insertu	79
7.4. Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne	80
7.4.1. Warunki ekspresji genów kodujących białka fuzyjne	80
7.5. Metody do pracy z białkami.....	81
7.5.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego	81
7.5.2. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE	81
7.5.3. Barwienie i odbarwianie żeli poliakrylamidowych	82
7.6. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii metalopowinowactwa.....	82
7.7. Usuwanie DNA z preparatów białkowych, dializa oczyszczonych preparatów	

	białkowych, zagęszczanie oraz badanie w preparatach fuzyjnej polimerazy DNA pozostałości kwasów nukleinowych <i>E. coli</i> metodą elektroforetyczną.....	83
7.8.	Charakterystyka otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA ..	84
7.8.1.	Analiza pozostałości genomowego DNA <i>E. coli</i> w fuzyjnych formach polimerazy DNA	85
7.8.2.	Określenie optymalnych warunków amplifikacji DNA przez fuzyjne formy polimerazy DNA	86
7.8.3.	Określenie jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	87
7.9.	Testy fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	90
7.9.1.	Minimalna ilość jednostek fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w reakcji	90
7.9.2.	Określenie termostabilności i stabilności w temperaturze pokojowej fuzyjnych form polimerazy DNA	91
7.9.3.	Wyznaczenie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	92
7.9.3.1.	Wyznaczenie krzywej procesywności na podstawie produktów markerowych	92
7.9.3.2.	Oznaczenie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	95
7.9.4.	Określenie szybkości elongacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA	96
7.9.5.	Oznaczenie czułości fuzyjnych formy archealnej polimerazy DNA.....	97
7.9.6.	Badanie zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA	98
7.9.7.	Badanie odporności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na inhibitory	99
7.9.8.	Wpływ fuzyjnych polimeraz DNA na amplifikację DNA w zmiennych temperaturach hybrydyzacji wybranych oligonukleotydów	100
7.9.9.	Analiza oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA oraz dsDNA	101
7.10.	Usługi.....	101
7.11.	Programy oraz oprogramowania	101
7.11.1.	Analiza zaprojektowanych starterów:	102
7.11.2.	Analiza wyników rozdziału elektroforetycznego uzyskanych w żelach agarozowych oraz poliakrylamidowych:	102
8.	Wyniki	103
8.1.	Projektowanie i otrzymywanie konstruktów DNA kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA.....	103
8.1.1.	Klonowanie genów kodujących białka Pfu-Sso7d, Pfu-Sso7d-Sso7d, Sso7d-Pfu-Sso7d, NeqSSB-Pfu-Sso7d	106
8.1.1.1.	Izolacja plazmidowego i genomowego DNA	106
8.1.1.2.	Amplifikacja genów niezbędnych do otrzymania konstruktów DNA kodujących fuzyjne polimerazy DNA	106
8.1.1.3.	Klonowanie genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA do DNA wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC	108
8.2.	Produkcja i oczyszczanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	112
8.2.1.	Ekspresja genów kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA w komórkach bakteryjnych <i>E. coli</i> BL RIL	112
8.2.2.	Oczyszczanie rekombinowanych białek Pfu-Sso7d-Sso7d, Sso7d-Pfu-	

Sso7d, NeqSSB-Pfu-Sso7d, Pfu-Sso7d z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa	114
8.2.3. Usuwanie pozostałości genomowego DNA <i>E. coli</i> z preparatów białkowych.....	116
8.2.4. Oczyszczanie fuzyjnych form polimerazy DNA z pozostałości saltonazy	118
8.3. Charakterystyka molekularna fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA..	119
8.3.1. Określenie optymalnych warunków amplifikacji DNA fuzyjnych form polimerazy DNA.....	120
8.3.1.1. Wstępny dobór optymalnego buforu reakcyjnego	120
8.3.1.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu, chlorku potasu i siarczanu (VI) amonu	121
8.3.1.3. Dobór optymalnego zakresu pH i ostatecznego składu buforu reakcyjnego	123
8.3.1.4. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych form polimerazy DNA	126
8.3.1.5. Wyznaczenie minimalnej ilość jednostek fuzyjnych form polimerazy DNA w reakcji PCR	129
8.3.1.6. Określenie termostabilności i stabilności w temperaturze pokojowej fuzyjnych form polimerazy DNA	131
8.3.1.7. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych form polimerazy DNA ..	134
8.3.1.8. Oznaczenie szybkości syntezy DNA przez fuzyjne formy polimerazy DNA	138
8.3.1.9. Badanie czułości fuzyjnych form polimerazy DNA	139
8.3.1.10. Badanie zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC przez fuzyjne formy polimerazy DNA.....	141
8.4. Porównanie odporności fuzyjnych form polimerazy DNA na popularne inhibitory stanowiące problem w różnych obszarach diagnostyki molekularnej .	142
8.4.1. Zdolność amplifikacji DNA w obecności inhibitora pochodzącego z krwi pełnej oraz krwi pełnej EDTA	142
8.4.2. Zdolność amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej EDTA jako czynnika pełniącego rolę matrycy oraz inhibitora przez fuzyjne formy polimerazy DNA.....	144
8.4.3. Zdolność amplifikacji DNA w obecności antybiotyku przez fuzyjne formy polimerazy DNA.....	145
8.4.4. Zdolność amplifikacji DNA w obecności izopropanolu oraz etanolu przez fuzyjne formy polimerazy DNA.....	147
8.4.5. Zdolność amplifikacji DNA w obecności kwasu humusowego przez fuzyjne polimerazy DNA.....	148
8.5. Oddziaływanie badanych fuzyjnych form polimerazy DNA z kwasami nukleinowymi.....	149
8.5.1. Wpływ fuzyjnych form polimerazy DNA na amplifikację DNA w zmiennych temperaturach hybrydyzacji starterów	149
8.5.2. Analiza oddziaływania fuzyjnych form polimerazy DNA z jedno- i dwuniciowym DNA.....	151
9. Wnioski i dyskusja	155
10. Podsumowanie	173
11. Wykaz literatury	175
12. Wykaz rysunków	189

13. Wykaz tabel	198
14. Dorobek naukowy.....	202

1. Wykaz stosowanych oznaczeń i skrótów

ang.	z angielskiego
APS	nadsiarczan amonu
BSA	albumina surowicy bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin)
cDNA	DNA uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA
CV	objętość złoza
Da	dalton
DBD	domena wiążąca DNA (ang. DNA Binding Domain)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DMSO	dimetylosulfotlenek
dNTPs	mieszanka deoksynukleotydów
dsDNA	dwuniciowa cząsteczka DNA
d(T) ₇₆	fluorescencyjnie znakowany oligonukleotyd
DTT	ditiotreitol
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EMSA	test opóźnienia migracji w żelu (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay)
Egzo	domena egzonukleolityczna pełniąca funkcję korektorską
h	godzina
HF	ang. High Fidelity
ΔF	różnica fluorescencji
ΔF_{max}	maksymalna różnica fluorescencji
IPTG	izopropylo- β -D-tiogalaktopiranozyd
KF	fragment Klenowa
min	minuta
MuLV	wirus mysiej białaczki (ang. murine leukemia virus)
NAAT	ang. Nucleic Acid Amplification Test
NeqSSB	białko SSB pochodzące z <i>Nanoarchaeum equitans</i>
Ni	nikiel
nt	nukleotydy
OB	domena wiążąca ssDNA (ang. Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Fold Domain)
Pca-Pol	polimeraza DNA <i>Pyrobaculum calidifontisp</i>

PCNA	antygen jądrowy komórek proliferujących
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
Pfu	polimeraza DNA <i>Pyrococcus furiosus</i>
Pol	domena polimeryzacyjna
PolA	polimerazy DNA z rodziny A
PolB	polimerazy DNA z rodziny B
PPi	pirofosforan
piPolB	polimerazy DNA z rodziny B niezależne od starterów
pPolB	polimerazy DNA z rodziny B połączone z białkiem
pZ	pary zasad
PZH	Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
rDNA	rybosomalne DNA
RNA	kwasy rybonukleinowe
rpm	obroty na minutę, jednostka miary częstotliwości obrotu
RT	odwrotne transkryptazy (ang. reverse transcriptase)
SDS	dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących
SSB	białko wiążące się z ssDNA (ang. Single Stranded DNA)
ssDNA	jednoniciowa cząsteczka DNA
Sso7d	białko pochodzące z hipertermofilnego archeona <i>Sulfolobus solfataricus</i>
Sto7dz	białko pochodzące z <i>Sulfolobus tokodaii</i>
S-Taq	fuzyjna polimeraza DNA Taq z białkiem Sso7d
S-Taq(Δ 289)	fuzyjna polimeraza DNA TaqStoffel z białkiem Sso7d
Taq	polimeraza DNA <i>Thermus aquaticus</i>
Tbr	polimeraza DNA <i>Thermus brockianus</i>
Tca	polimeraza DNA <i>Thermus caldophilus</i>
TEMED	N, N, N', N'- tetrametyloetylenodiamina
Tfi	polimeraza DNA <i>Thermus filiformis</i>
Tfl	polimeraza DNA <i>Thermus flavus</i>
TtePriB	białko PriB pochodzące z <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
TMAC	chlerek tetrametyloamoniowy
Tma	polimeraza DNA <i>Thermotoga maritima</i>

T _{ne}	polimeraza DNA <i>Thermotoga neapolitana</i>
T _{th}	polimeraza DNA <i>Thermus thermophilus</i>
T _m	temperatura topnienia
T _{pok}	temperatura pokojowa

2. Streszczenie

Ekspansywny rozwój technik biotechnologicznych, w tym metod opartych na reakcji PCR, wymusza poszukiwanie nowych ulepszonych enzymów do amplifikacji kwasów nukleinowych. Metoda ta stanowi podstawę diagnostyki molekularnej zarówno chorób zakaźnych, jak i genetycznych. Dodatkowo jest ona również szeroko stosowana w branży spożywczej, weterynaryjnej, a także w badaniach kryminalistycznych. W technikach amplifikacji DNA, w tym PCR, główny problem sprawiają inhibitory obecne w analizowanych próbkach oraz tzw. trudne matryce np. repetytywne lub bogate w pary GC. Pandemia koronawirusa ujawniła problemy technologiczne zarówno z wysokoprzepustową produkcją polimeraz DNA, jak również ich jakością, zwłaszcza związaną z obecnością pozostałości DNA genomowego gospodarza. Pomimo dużej liczby dostępnych enzymów, wciąż istnieje zapotrzebowanie na nowe, wysokiej klasy enzymy rozwiązujące powyższe problemy i pozwalające na dalszy szybki rozwój diagnostyki molekularnej.

W ciągu ostatnich 20 lat na rynku pojawiło się wiele nowych polimeraz DNA, jak również ich ulepszonych wariantów. Przełomem w projektowaniu wysokowydajnych polimeraz DNA było zastosowanie małych białek wiążących kwasy nukleinowe, jako białek stabilizujących nić DNA podczas jej amplifikacji. Przyszłością nowej generacji komercyjnych polimeraz DNA jest z pewnością zastosowanie inżynierii genetycznej do projektowania i otrzymywania fuzyjnych form polimerazy DNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie oraz charakterystyka trzech wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d). W toku pracy określono wpływ dwóch zupełnie różnych białek wiążących DNA na właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA, utworzonych z ich udziałem. Do badań wykorzystano modyfikacje polimerazy DNA Pfu, która wg dostępnych danych jest najpowszechniej stosowana i uznawana za enzym o wysokiej wierności, termostabilności i odporności na niektóre inhibitory reakcji PCR.

Każda termostabilna polimeraza DNA posiada jedną lub więcej z unikalnych cech, np. czułość, szybkość wydłużania DNA, procesywność, specyficzność, czy odporność na zanieczyszczenia. Charakterystyczne właściwości każdego białka można wykorzystać do stworzenia jedynych w swoim rodzaju wariantów polimeraz DNA. Wiele badań wskazuje na to, że nawet niewielkie różnice w sekwencji aminokwasów oraz

dodatek białka wiążącego DNA może skutkować ogromnymi pozytywnymi zmianami ich właściwości biochemicznych, co sugeruje, że możliwe jest otrzymanie nowych polimeraz DNA o ulepszonej funkcjonalności.

Wszystkie właściwości otrzymanych w niniejszej pracy doktorskiej wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA były porównywane do najbardziej znanej modyfikacji polimerazy Pfu, czyli Pfu-Sso7d, która została wyprodukowana równoległe z pozostałymi enzymami i stosowana jako referencja. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyłonienie spośród trzech wariantów jednego – V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, który wyróżniał się unikalnymi właściwościami, które nie zostały do tej pory udokumentowane w literaturze. Obecność dwóch jednakowych białek wiążących DNA takich jak Sso7d umieszczonych na obu końcach polimerazy DNA V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, pozwala na uzyskanie wariantu polimerazy DNA, umożliwiającej przeprowadzenie reakcji PCR w różnych warunkach reakcyjnych, o wysokiej tolerancji na stężenia soli oraz szerokim zakresie tolerancji na stosowane pH, o wyjątkowej aktywności, pozwalającej na wydajną amplifikację DNA w trudnych warunkach reakcyjnych, o dużej odporności na inhibitory występujące w próbkach klinicznych, takie jak krew pełna, heparyna, ampicylina czy kwas humusowy, o innej kinetyce oddziaływania z kwasami nukleinowymi oraz o zwiększonej czułości, przy zachowaniu pozostałych cennych właściwości referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, takich jak termostabilność, odporność na niektóre inhibitory, czy zdolność amplifikacji tzw. trudnych matryc bogatych w pary GC.

Dodatkowo scharakteryzowano fuzyjną formę archealnej polimerazy DNA zawierającą białko NeqSSB pochodzące z *Nanoarchaeum equitans*. Wykazano, że otrzymana polimeraza DNA wykazała się większą czułością, wyższą aktywnością oraz odpornością na inhibitory takie jak krew pełna w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA. Wszystkie zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki mogą przyczynić się do postępu w dziedzinie szeroko pojętej diagnostyki.

Niniejsza praca doktorska była częścią wydziałowego projektu Młodych Naukowców „Fuzyjna polimeraza DNA z białkami wiążącymi jedno- i dwuniciowe DNA – produkcja, charakterystyka i zastosowanie w trudnych reakcjach PCR”.

3. Abstract

The rapid advancement of biotechnological techniques, including PCR-based methods, requires a search for new and improved enzymes for nucleic acid amplification. This method serves as the foundation for molecular diagnostics of infectious and genetic diseases. It is also widely used in food and beverage, veterinary, and forensic industries. PCR inhibitors and matrices rich in G-C pairs pose numerous challenges to such a widely used technique. The coronavirus pandemic has revealed technological issues with the high-throughput enzyme production as well as the quality of some commercially available products. Despite the large number of available enzymes, the new molecules are still required to advance diagnostics.

In the last 20 years, many new DNA polymerases, as well as their improved versions, have appeared on the market. A breakthrough in the design of high-performance polymerases was the use of small nucleic acid binding proteins as DNA strand stabilizing proteins during amplification. The future of high-yield commercial polymerases lies in the application of genetic bioengineering to design fusion forms of archaeal DNA polymerases.

The aim of this doctoral thesis was to obtain and characterize three fusion variants of archaeal DNA polymerase (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d and V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d). In the course of the work, the influence of two DNA-binding proteins on the properties of DNA polymerases was determined. Modifications of Pfu polymerase were investigated due to its lowest percentage of errors and high thermal stability.

Each thermostable DNA polymerase has its own set of unique characteristics, including thermostability, DNA elongation rate, fidelity, processivity, specificity, resistance to contaminants and inhibitors. The distinctive properties of each DNA polymerase can be exploited to create unique variants of DNA polymerases. Many studies indicate that even small differences in the sequence of amino acids and the addition of a DNA binding protein can result in huge changes in their biochemical properties. Thus, it suggests that it is possible to obtain new DNA polymerases with improved functionality.

All properties of the obtained archaeal DNA polymerase fusion variants were compared to the popular Pfu polymerase modification, Ref1 Pfu-Sso7d, which was purified in parallel with the other variants and used as a reference. The obtained results allowed for the selection of the most promising variant - V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. It stood

out from the other three due to its unique properties, which have not been reported in the literature yet. The V2 Sso7d-Pfu-Sso7d polymerase obtained through modification enabled a development of an enzyme with a wide tolerance to changing reaction conditions and extreme resistance to inhibitors. The presence of two identical DNA-binding proteins such as Sso7d, placed at both ends of DNA polymerase V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, allows to carry out PCR under different reaction conditions, i.e. with a high tolerance to salt concentrations and a wide range of tolerance to the applied pH; with exceptional activity, allowing for efficient DNA amplification in extremely difficult reaction conditions; with high resistance to inhibitors found in clinical samples, such as blood, heparin, ampicillin or humic acid; preservation of other valuable properties of the reference DNA polymerase, such as thermostability, resistance to some inhibitors, the ability to amplify the so-called difficult matrices rich in GC pairs, with different kinetics of interaction with nucleic acids and with increased sensitivity in relation to the reference DNA polymerase.

In addition, an archaeal DNA polymerase fusion form containing the NeqSSB protein from *Nanoarchaeum equitans* was studied. In comparison to the reference polymerase Ref1 Pfu-Sso7d, the obtained polymerase demonstrated greater sensitivity, higher activity, and resistance to inhibitor such as whole blood. The obtained results may contribute to advancement of broadly understood diagnostics.

This doctoral thesis was part of the faculty project for Young Scientists "Fusion DNA polymerase with single and double-stranded DNA binding proteins - production, characterization and application in difficult PCR reactions.

4. Wstęp

4.1. Historia polimerazy DNA

Polimerazy są najważniejszymi białkami zaangażowanymi w procesy związane z metabolizmem kwasów nukleinowych, w tym replikację DNA zachodzącą w każdej żywej komórce. Odkrycie i scharakteryzowanie polimeraz DNA odegrało kluczową rolę w pogłębianiu wiedzy z zakresu genetyki i biologii molekularnej. W konsekwencji doprowadziło to do rozwoju wielu innowacyjnych metod z ich udziałem. Polimerazy DNA przyczyniły się do rozwoju badań podstawowych i aplikacyjnych, jak żadne inne białka. W tym rozdziale zostały omówione najistotniejsze fakty, które doprowadziły do powstania i rozwoju m. in. łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), bezpośrednio związanej z tymi enzymami (rysunek 1) [1].

Wydarzeniem, które umożliwiło poznanie roli i mechanizmu działania polimeraz DNA było ujawnienie struktury DNA przez Johna Watsona i Francisca Cricka. W 1953 r. na podstawie danych krystalograficznych uzyskanych przez Rosalind Franklin i Maurice'a Wilkina, wyjaśnili oni budowę podwójnej helisy, która składa się z dwóch komplementarnych względem siebie łańcuchów polinukleotydowych. Odkrycie to umożliwiło zrozumienie, w jaki sposób informacje genetyczne są przechowywane i powielane [2][3].

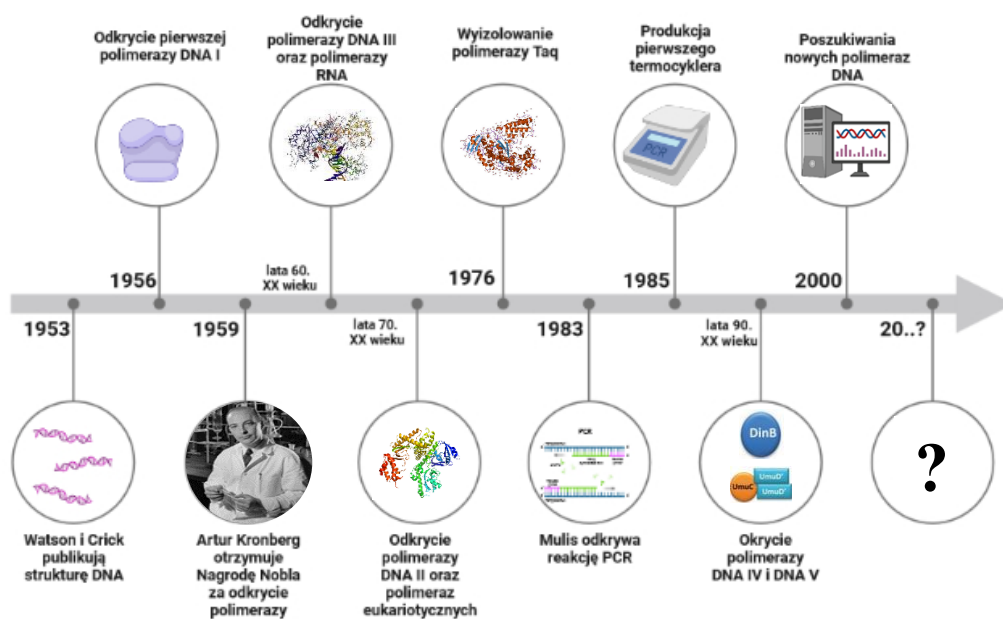
W 1956 roku Arthur Kornberg i jego współpracownicy z Uniwersytetu Stanforda zidentyfikowali pierwszą w historii polimerazę DNA pochodzącą z *Escherichia coli*, znaną jako polimeraza DNA I (Pol I). Wykazali, że Pol I odpowiada za replikację DNA w bakteriach, wykorzystując ją do syntezy komplementarnych nici DNA *in vitro*. Za pracę nad syntezą DNA Arthur Kornberg otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 1959 roku [4][5]. Dalsze badania prowadzone w latach sześćdziesiątych XX wieku przyczyniły się do odkrycia kolejnej polimerazy DNA III (Pol III), innego kluczowego enzymu biorącego udział w replikacji DNA, który odpowiada za syntezę większości DNA w tym procesie. Równocześnie badania nad syntezą RNA doprowadziły do identyfikacji polimerazy RNA, enzymu odpowiedzialnego za przepisanie informacji zawartej w DNA na RNA [6].

W latach siedemdziesiątych poprzedniego stulecia odkryto dodatkowe polimerazy DNA, takie jak polimeraza DNA II (Pol II), zaangażowana przede wszystkim w procesy naprawy uszkodzeń DNA [7].

Otrzymanie termostabilnej polimerazy DNA z termofilnej bakterii *Thermus*

aquaticus zwanej w skrócie polimerazą DNA Taq, doprowadziło do przełomu w dziedzinie biologii molekularnej w latach 80-tych. Polimeraza ta umożliwiła opracowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) przez Kary'ego Mullisa, co zrewolucjonizowało pozyskiwanie dużych ilości DNA w niezmiernie krótkim czasie i stało się podstawowym narzędziem w różnych dziedzinach nauki, w tym w diagnostyce medycznej, badaniach genetycznych i analizach kryminalistycznych [8]. Ponadto w latach 90-tych u bakterii odkryto dwie wyspecjalizowane polimerazy DNA tzn. polimerazę DNA IV (Pol IV) i polimerazę DNA V (Pol V). Stwierdzono, że polimerazy te biorą udział w procesach naprawy DNA. Ich odkrycie pozwoliło na poznanie tych mechanizmów oraz ustalenie znaczenia polimeraz DNA w utrzymaniu stabilności genomu [9].

W 2000 roku, wraz z postępem w technologiach sekwencjonowania, wzrosło zapotrzebowanie na polimerazy DNA o wysokiej wierności. Opracowano enzymy o zwiększonej dokładności powielania materiału genetycznego i możliwościach korekty błędów, umożliwiające dokładniejsze sekwencjonowanie DNA i redukujące mutacje powstałe podczas amplifikacji i klonowania DNA. Polimerazy DNA o wysokiej wierności odegrały kluczową rolę w rozwoju platform sekwencjonowania nowej generacji [10].



Rysunek 1. Najważniejsze wydarzenia prowadzące do odkrycia polimerazy DNA oraz rozwoju reakcji PCR innych metod amplifikacji DNA [Grafika stworzona z wykorzystaniem platformy BioRender Joanna Nowicka 2023] [11][12][6][9][13].

Od ponad 20 lat poznanie budowy, funkcji i regulacji polimeraz DNA przykuwa uwagę wielu badaczy. Postępy w dziedzinie projektowania nowych polimeraz DNA obejmują również odkrycia nowych polimeraz DNA o wyspecjalizowanych funkcjach oraz ich konstrukcję do określonych zastosowań. Postęp technologiczny w genetyce, biologii molekularnej, biotechnologii, medycynie i diagnostyce napędza badania nad opracowywaniem innowacyjnych polimeraz DNA [14][10][15].

4.2. Polimerazy DNA wykorzystywane w reakcji PCR

Polimerazy DNA są narzędziami (ang. biotools) biologii molekularnej umożliwiającymi wydajną i szybką amplifikację DNA [1]. Do tej pory wyizolowano wiele enzymów, z różnych mikroorganizmów i zbadano ich funkcje w celu określenia unikalnych właściwości [14]. Termostabilna polimeraza DNA Taq jest najlepiej poznanym przedstawicielem polimeraz DNA, dlatego stanowi referencję podczas charakterystyki nowych bakteryjnych enzymów syntetyzujących DNA. Oprócz termostabilności ważne są także inne cechy tj. wierność, procesywność i zdolność wbudowywania zmodyfikowanych nukleotydów [16]. Istotnymi cechami polimeraz DNA, które decydują o możliwości ich zastosowania w diagnostyce molekularnej są m. in. odporność na inhibitory, specyficzność czy szybkość elongacji [15]. W związku z szerokim zapotrzebowaniem na rynku biotechnologicznym powstają nowatorskie modyfikacje już istniejących polimeraz DNA, zwłaszcza polimerazy DNA Taq i polimerazy Pfu wyizolowanej z *Pyrococcus furiosus*. Modyfikowane polimerazy DNA często nazywane są różnymi nazwami handlowymi, mimo że duża część z nich dotyczy tej samej modyfikacji, ale jest sprzedawana przez innego producenta [10]. Charakterystyczne właściwości każdej nowo powstałej przy użyciu inżynierii genetycznej polimerazy DNA, mogą decydować o jej unikalnym zastosowaniu. Poszukiwanie nowych wariantów enzymów do amplifikacji kwasów nukleinowych o wyjątkowych właściwościach jest aktualnie jednym z głównych celów dynamicznie rozwijającej się diagnostyki molekularnej [14].

4.2.1. Ogólna charakterystyka polimeraz DNA

Badania nad polimerazami DNA umożliwiły poznanie ich budowy, a także wykazanie różnic i podobieństw między zmutowanymi wariantami. Struktura polimeraz DNA przypomina ludzką prawą dłoń zawierającą trzy subdomeny: palców, śródreza i kciuka [12][17]. Różne aspekty replikacji DNA, takie jak wiązanie substratu, transfer

nukleotydów, wierność i procesywność, zostały zaproponowane na podstawie trzeciorzędowych struktur polimeraz DNA w kompleksie z różnymi substratami DNA. Subdomeny palców i kciuka zmieniają położenie w zależności od tego, czy polimeraza jest związana z substratem czy nie. Niezwiązane polimerazy DNA tworzą otwarte konformacje subdomen palców i kciuka, natomiast gdy substrat jest związany, przesuwiają się one w kierunku subdomeny śródścza, aby mocniej przytrzymać nić matrycy lub startera [18]. Główną domeną każdej polimerazy DNA jest część polimeryzacyjna, która umożliwia syntezę nici DNA przez dołączanie nukleotydów do końca 3'OH startera. Inne domeny, które wchodzą w skład polimerazy DNA to m.in. dwie domeny egzonukleolityczne różniące się między sobą kierunkiem działania. Pierwsza z nich o kierunku działania 3'→5' nazywana jest domeną korektorską, ponieważ umożliwia sprawdzanie poprawności dobudowywanych nukleotydów. Druga domena egzonukleolityczna działa w kierunku 5'→3', co pozwala na eliminację starterów, jednocześnie uzupełniając luki powstałe w wyniku tego działania [19].

Poniżej w tabeli nr 1 zebrano funkcje każdej z subdomen oraz domen występujących w polimerazie DNA.

Tabela 1. Subdomeny oraz domeny wchodzące w skład polimerazy DNA oraz ich funkcje

Nazwa	Funkcja	Referencje
Subdomena śródścza	Wiązanie jonów Mg ²⁺	[17][18][12]
Subdomena palców	Przyłączanie dNTPs, wiązanie do ssDNA	[17][18][12]
Subdomena kciuka	Stabilizowanie dsDNA	[17][18][12]
Domena polimeryzacyjna	Synteza nici DNA przez przyłączanie nukleotydów na końcu 3'OH startera	[19][18][12]
Domena egzonukleolityczna 3' → 5'	Aktywność korektorska	[19][18][12]
Domena egzonukleolityczna 5' → 3'	Eliminacja starterów	[19][18][12]
Domena N-końcowa	Nie jest dokładnie poznana jej funkcja	[20]

Analizy podobieństwa sekwencji polimeraz DNA pozwoliły na klasyfikację enzymów w siedmiu ustalonych rodzinach. Rodziny B i X są powszechnie obecne u bakterii, archeonów, eukariontów i wirusów. Rodziny A i Y są wspólne dla bakterii, eukariontów i archeonów. Rodzina C jest unikalna dla komórek bakteryjnych, a rodzina D jest specyficzna dla archeonów. Organelle pochodzenia endosymbiotycznego (mitochondria, plastydy) posiadają własne polimerazy DNA, na ogół typu A lub C. Utworzono oddzielną rodzinę zwaną RT (ang. reverse transcriptase) do grupowania enzymów odwrotnej transkryptazy retrowirusów i retrotranspozonów. Nowy enzym obdarzony zarówno aktywnością prymazy DNA, jak i polimerazy DNA w tym samym polipeptydzie, został znaleziony w ludzkich komórkach i nazwany PrimPol. Enzym ten należy do odrębnej rodziny prymaz archeo-eukariotycznych, które mogą inicjować syntezę DNA *de novo* zarówno z rybo-, jak i dezoksyrybonukleotydami [4]. Z uwagi na temat niniejszej rozprawy doktorskiej, dokładniej zostaną omówione dwie rodziny polimeraz DNA: rodzina A oraz B, które dzięki swoim właściwościom, są najczęściej wykorzystywane w reakcji PCR.

W tabeli nr 2 przedstawiono wszystkie do tej pory poznane i scharakteryzowane rodziny polimeraz, zarówno DNA jak i RNA.

Tabela 2. Tabelaryczne zestawienie informacji dotyczących klasyfikacji polimeraz DNA i RNA

Rodzina polimeraz	Typ polimerazy	Takson	Przykłady polimeraz	Dodatkowe cechy polimeraz	Referencje
A	Polimerazy replikacyjne i o działaniu naprawczym	Eukariota Prokariota	Polimeraza T7 Pol I, Pol γ , θ , i ν	dwie domeny egzonukleolityczne (3' \rightarrow 5' i 5' \rightarrow 3')	[12][5]
B	Polimerazy replikacyjne i o działaniu naprawczym	Eukariota Prokariota	Pol II, Pol B, Pol ζ , Pol α , δ , i ϵ	3' \rightarrow 5' domena egzonukleolityczna (korektorska)	[12][21] [22][23][4]
C	Polimerazy replikacyjne	Prokariota	Pol III	3' \rightarrow 5' domena egzonukleolityczna (korektorska)	[12][6]
D	Polimerazy replikacyjne	Euryarchaeota	PolD	3' \rightarrow 5' domena egzonukleolityczna (korektorska)	[12][17] [24]
X	Polimerazy replikacyjne i o działaniu naprawczym	Eukariota	Pol β , Pol σ , Pol λ , Pol μ i terminalna transferaza deoksynukleotydylowa	5' fosfataza (tylko Pol β)	[12][25]
Y	Polimerazy replikacyjne	Eukariota Prokariota	Pol ι , Pol κ , Pol η , Pol IV, and Pol V	Synteza transkrypcyjna	[12][9]

	i o działaniu naprawczym				
RT	Polimerazy replikacyjne i o działaniu naprawczym	Wirusy, Retrowirusy, Eukariota,	Telomerazy	RNA-zależne	[26][12]

4.2.1.1. Rodzina A polimeraz DNA

Pierwszą odkrytą i scharakteryzowaną biochemicznie polimerazą DNA była polimeraza z rodziny A (PolA). Enzymy należące do tej grupy składają się z łańcucha polipeptydowego złożonego z domeny polimeryzacyjnej (Pol) i domeny egzonukleolitycznej (Egzo) pełniącej funkcję korektorską $3' \rightarrow 5'$, dodatkowa domena egzonukleolityczna $5' \rightarrow 3'$ jest zbędna, a jej brak nie zakłóca funkcji i wierności polimerazy [12]. W organizmach komórkowych białka PolA pełnią funkcje związane z replikacją, rekombinacją lub naprawą całego genomu. Wydajnie powielają DNA organelli eukariotycznych (mitochondria i plastydy), plazmidów bakteryjnych i bakteriofagów (np. T3/T7, SPO1 i SPO2). Są rutynowo stosowane w różnych technikach amplifikacji DNA, na przykład w diagnostyce opartej na reakcji PCR, wykrywającej ciężki ostry zespół oddechowy SARS (ang. Severe Acute Respiratory Syndrome). Archetypowym członkiem rodziny PolA jest polimeraza DNA Pol I *E. coli* i jej pochodna, tak zwany fragment Klenowa (KF), który nie posiada domeny egzonukleolitycznej $5' \rightarrow 3'$ [5].

4.2.1.2. Rodzina B polimeraz DNA

Drugą rodziną polimeraz DNA jest rodzina B (PolB). W jej skład wchodzi polimerazy replikacyjne [7], które można podzielić na 3 różne grupy. Pierwsza z nich to PolB połączone z białkiem pPolB, które replikują małe liniowe genomy wirusów i ruchomych elementów genetycznych [23]. Druga grupa to PolB, która wymaga przyłączonego do matrycykomplementarnego oligonukleotydu (RNA lub DNA). Enzymy należące do tej grupy uczestniczą w replikacji i naprawie genomu we wszystkich żywych organizmach i ich wirusach [7]. Ostatnia grupa obejmuje niedawno zidentyfikowaną grupę PolB niezależnych od starterów (piPolB), kodowanych przez ruchome elementy genetyczne bakterii i mitochondriów. Są one zdolne do zależnej od matrycy syntezy DNA *de novo* [21].

PolB mają trzy wspólne domeny: N-końcową, egzonukleolityczną (Egzo) i polimeryzacyjną DNA (Pol). Rola domeny N-końcowej nie jest jeszcze do końca

poznana. Prawdopodobnie jest powiązana z rozpoznawaniem uracylu w archeonach, ale nie jest istotna w enzymach eukariotycznych [20]. Domena egzonukleolityczna wykorzystuje swoją aktywność 3' → 5' do korekty, podczas gdy domena Pol o charakterystycznym kształcie przypominającym prawą dłoń, przeprowadza syntezę DNA zależną od matrycy [23].

4.2.2. Polimeraza DNA *Thermus aquaticus*

W 1985 roku technologia PCR była przeprowadzana z wykorzystaniem fragmentu Klenowa polimerazy DNA I *E. coli* [27]. Wyizolowanie pierwszej polimerazy DNA oraz odkrycie reakcji PCR było ogromnym osiągnięciem w dziedzinie biotechnologii molekularnej, jednak nie eliminowało problemów związanych z niską termostabilnością stosowanego enzymu. Ograniczenia Pol I wymuszały dodawanie polimerazy w każdym cyklu reakcji PCR, co uniemożliwiało przeprowadzenie procesu bez ingerencji oraz wydajne uzyskanie produktu PCR [8].

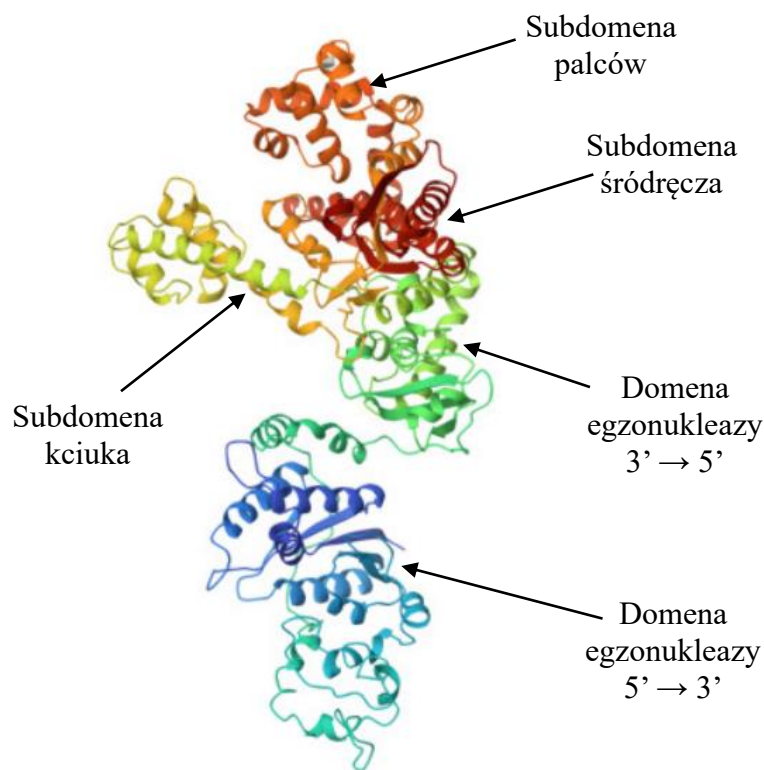
Rozwiązaniem była polimeraza DNA, która nie jest inaktywowana w czasie etapu denaturacji termicznej z dwuniciowego do jednociowego DNA. W związku z tym otrzymanie termostabilnej polimerazy DNA Taq i jej zastosowanie w reakcji PCR, zrewolucjonizowało wiele dziedzin nauki [27]. Jej stabilność termiczna, umożliwiała pozostawienie próbki reakcyjnej w termocyklerze przez cały czas trwania reakcji PCR bez konieczności uzupełniania polimerazy DNA [14].

Polimeraza DNA Taq została wyizolowana z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus* odkrytej w Parku Narodowym Yellowstone w Stanie Montana (USA). Jest najczęściej stosowaną polimerazą DNA w reakcji PCR oraz najbardziej znanym reprezentantem termostabilnych enzymów [10]. Pierwsze uzyskane wyniki z wykorzystaniem polimerazy DNA Taq zostały opublikowane przez Chien i in w 1976 w ramach pracy magisterskiej. Ujawnione rezultaty stały się popularne na skalę światową, a otrzymana polimeraza DNA Taq stała się obiektem dalszych badań [14].

Początkowo polimeraza DNA Taq była bezpośrednio oczyszczana z mikroorganizmu *T. aquaticus*. Ze względu na niską wydajność, gen kodujący ten enzym został sklonowany przez Davida Gelfand'a pracownika firmy Cetus [27][28][8]. Następnie poddano go ekspresji w komórkach *E. coli*. Natywna polimeraza DNA Taq została stopniowo zastąpiona przez rekombinowaną polimerazę DNA Taq [29][30][31], znaną pod nazwą handlową AmpliTaq. Ilość rekombinowanej polimerazy Taq wytwarzanej w komórkach *E. coli* wciąż była bardzo niewielka. Przyczyną była niska

ekspresja genu kodującego polimerazę DNA *T. aquaticus* w komórkach *E. coli*, ze względu na wysoką zawartość par GC w genie wykorzystywanego mikroorganizmu. Po wielu próbach udało się skonstruować wydajny system nadprodukcji polimerazy DNA Taq. Dokonano tego poprzez zmianę kodonu wokół regionu N-końcowego polimerazy DNA na kodony optymalne dla *E. coli* [14]. Wprowadzone zmiany pozwoliły na 10-krotnie wydajniejszą produkcję polimerazy DNA Taq w porównaniu z jej pierwszym komercyjnym produktem AmpliTaq. Od tej pory była ona używana jako podstawowy enzym w reakcji PCR. Polimeraza DNA Taq stała się białkiem wyjściowym do badań wielu modyfikacji w celu poprawy wydajności reakcji PCR [14].

Polimeraza DNA Taq składa się z trzech domen: egzonukleolitycznej 5' → 3', nieaktywnej egzonukleolitycznej 3' → 5' oraz polimeryzacyjnej 5' → 3'. Usunięcie domeny egzonukleolitycznej 5' → 3', umożliwia uzyskanie białka o pełnej funkcjonalności, ale o innych cechach w odniesieniu do białka natywnego. Polimeraza DNA Taq Δ 289, która nie posiada aktywności 5' → 3' egzonukleazy, wyróżnia się wyższą termostabilnością, do jej wydajnego działania potrzebny jest dodatek jonów Mg²⁺ [29][32][31][12]. Poniżej na rysunku nr 2 została przedstawiona struktura polimerazy DNA Taq.



Rysunek 2. Struktura krystalograficzna polimerazy DNA Taq [opracowanie na podstawie: [11].

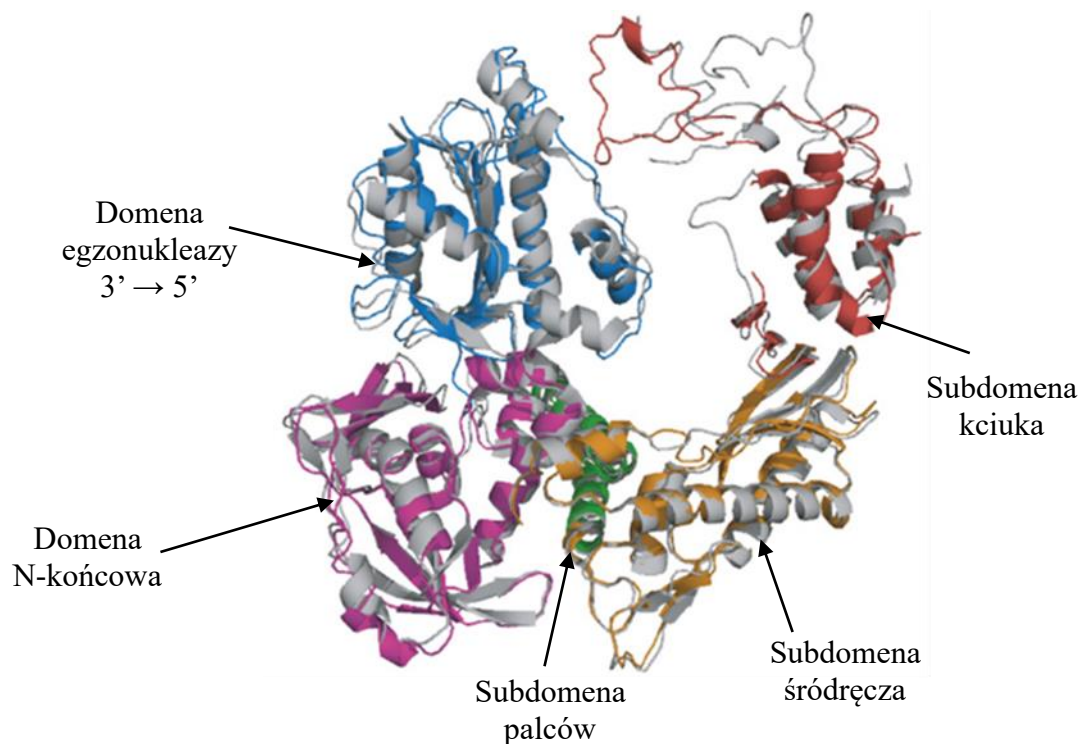
4.2.3. Polimerazy DNA organizmów hipertermofilnych

Odkrycie polimerazy DNA Taq zainicjowało poszukiwania enzymów, o lepszych właściwościach. Od nowych polimeraz DNA oczekiwano wyższej stabilności termicznej oraz wierności. Poszukiwań nowych enzymów dokonywano przede wszystkim wśród organizmów termofilnych. Można wyróżnić różne grupy termofili: ekstremalne termofile, które rosną w temperaturach powyżej 75°C i umiarkowane termofile, które rosną w temperaturze 55–75°C. Temperatura wzrostu organizmów zazwyczaj przekłada się na termostabilność polimeraz DNA. Szczególnie ekstremalne termofile, które rosną w temperaturach powyżej 80°C nazwano hipertermofilami, które należą do grupy archeonów [14].

Przełomem w badaniach biologii molekularnej było odkrycie w 1991 roku polimerazy DNA Pfu, którą wyizolowano z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus furiosus* znalezionej w kominie hydrotermalnym na Oceanie Spokojnym [10]. Polimeraza DNA Pfu w odróżnieniu od polimerazy DNA Taq posiada aktywność korektorską egzonukleazy od 3' → 5', która pozwala korygować błędy podczas włączania nukleotydów, co zwiększa specyficzność [33].

Archealne polimerazy DNA, m.in. polimeraza DNA Pfu, składają się z pięciu domen: palców, śródreżca, kciuka, egzonukleolitycznej 3' → 5' oraz domeny N-końcowej [12]. Domena egzonukleolityczna 3' → 5' zmienia swoją konformację w zależności od stanu replikacji lub edycji DNA. W chwili pojawienia się niedopasowanego nukleotydu, który jest włączany do nowo zsyntetyzowanej nici DNA, nie matrycy oraz startera słabiej wiążą się z polimerazą DNA, co prowadzi do ich nieprawidłowego ustawienia względem miejsca aktywnego polimerazy DNA. Podwójna helisa rozwija się, a niedopasowany nukleotyd jest przenoszony do miejsca aktywnego domeny egzonukleolitycznej 3' → 5' i wycinany [18].

W zamkniętej konformacji domeny kciuka związanej z DNA, koniec 3' nici startera nie może wiązać się z domeną egzonukleazy z powodu zawady sterycznej. Otwarte konformacje domeny kciuka umożliwiają wiązanie jednoniciowego startera DNA (ssDNA) z miejscem aktywnym egzonukleazy. Przeprowadzenie procesu replikacji DNA wymaga koordynacji konformacji każdej z domen [18]. Rysunek nr 3 przedstawia strukturę krystalograficzną polimerazy DNA Pfu.



Rysunek 3. Struktura krystalograficzna polimerazy DNA Pfu [18] [14].

Odkrycie obu polimeraz DNA Taq oraz Pfu było dużym osiągnięciem w dziedzinie biologii molekularnej, które umożliwiło rozwój biotechnologii, diagnostyki oraz kryminalistyki. Wymienione polimerazy DNA posiadają różne unikalne właściwości. Polimeraza DNA Taq wykazuje aktywność korektorską egzonukleazy $5' \rightarrow 3'$, podczas gdy polimeraza DNA Pfu wykazuje aktywność korektorską egzonukleazy $3' \rightarrow 5'$. Polimeraza DNA Taq należy do grupy polimeraz DNA z rodziny A, podczas gdy polimeraza DNA Pfu należy do grupy polimeraz DNA z rodziny B [18] [14] [34] [10].

Tabela nr 3 przedstawia najważniejsze różnice pomiędzy polimerazami DNA Taq i Pfu, które w ostatnich latach stały się podstawowymi modelowymi białkami do tworzenia modyfikacji polimeraz DNA.

Tabela 3. Porównanie polimerazy DNA Taq oraz Pfu

Nazwa polimerazy DNA	Polimeraza DNA Taq	Polimeraza DNA Pfu	Referencje
Rodzina	Domena Bakterii – Rodzina A	Domena Archea – Rodzina B	[18][10][14]
Aktywność korektorska	egzonukleazy $5' \rightarrow 3'$	egzonukleazy $3' \rightarrow 5'$	[12][18][10][14]

Mikroorganizm, z którego została wyizolowana	Termofilna Bakteria <i>Thermus aquaticus</i>	Hipertermofilny archeon <i>Pyrococcus furiosus</i>	[18][10][14]
Zalety w reakcji PCR	Jako pierwsza umożliwiła przeprowadzenie reakcji PCR bez dodatkowej ingerencji w trakcie jej trwania, najpopularniejsza polimeraza DNA	Reakcje wymagające dużej wierności, z uwagi na wysoką jakość syntetyzowanego DNA oraz niski odsetek błędów	[18][10][14]

4.3. Reakcja PCR

Okrycie polimerazy DNA Taq doprowadziło do rozwoju techniki PCR. Prekursorem reakcji PCR był Kary Mullis, który zwrócił uwagę na problem występujący podczas sekwencjonowania DNA metodą Sangera. Sekwencjonowanie pojedynczej kopii genu dawało słabe sygnały z powodu niewystarczającego stężenia DNA. Dodanie etapu denaturacji w celu podzielenia każdej dwuniciowej cząsteczki DNA (dsDNA) na dwie jednoniciowe (ssDNA) i odwrotnego startera do określenia całkowitej długości amplikonu, pozwoliło na jednoczesne otrzymanie dwóch zamplifikowanych kopii DNA [8].

4.3.1. Podstawowe informacje o reakcji PCR

Wykorzystywana w diagnostyce reakcja PCR składa się z kilku następujących po sobie etapów: wstępnej denaturacji, denaturacji, przyłączania starterów, elongacji (tj. wydłużania starterów na matrycy ssDNA) oraz wydłużania końcowego. Denaturacja, przyłączanie starterów oraz elongacja są etapami, które powtarza się w określonej liczbie cykli [35]. W zależności od stosowanej polimerazy DNA oraz specyfiki reakcji, dobrany zostaje odpowiedni profil temperaturowo-czasowy prowadzonej reakcji PCR. Poniżej w tabeli nr 4 przykładowe czasy i temperatury wykorzystywane w reakcjach PCR, dla komercyjnie dostępnych polimeraz DNA [35].

Tabela 4. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy dla reakcji PCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94-98	30-600	1
Denaturacja	94-98	10-120	25-40
Przyłączenie starterów	40-70	20-60	
Elongacja	70-75	X	
Wydłużanie końcowe	70-75	120-600	1
Chłodzenie	4	∞	1

X – czas zależny od wielkości uzyskiwanego produktu PCR (pz) i szybkości syntezy DNA przez daną polimerazę DNA; dla komercyjnych polimeraz DNA Phusion oraz Q5 szybkość syntezy DNA wynosi 30 s/ 1000 pz

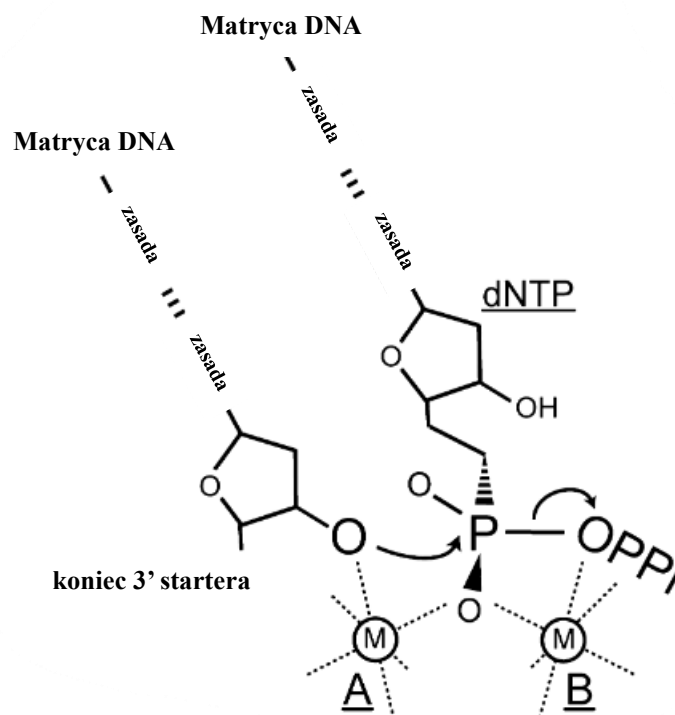
Podczas ustalania profilu temperaturowo-czasowego reakcji PCR istotnym elementem jest temperatura przyłączania starterów (T_m). Temperaturę ustala się poprzez wykorzystanie gradientu temperaturowego dla etapu annealingu [28]. Ważny jest na tym etapie typ matrycy, z którą mamy do czynienia oraz potencjalne czynniki inhibujące, jeśli są to próbki pochodzenia klinicznego czy środowiskowego. Skład mieszaniny reakcyjnej dla PCR dobierany jest zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta polimerazy DNA [36].

4.3.2. Mechanizm działania polimerazy DNA w reakcji PCR

Najistotniejszym czynnikiem dodawanym do reakcji PCR jest polimeraza DNA. Ustalone struktury krystalograficzne polimeraz DNA wskazują na podobną budowę miejsca aktywnego dla każdej z nich. Znajomość tych struktur umożliwiła określenie mechanizmu, jaki zachodzi podczas trwania reakcji PCR [37][38].

W pierwszym etapie komplementarny dNTP zostaje dobudowany do zasady matrycowej, a grupa fosforanowa dNTP wiąże się z konserwowanymi strukturalnie dwoma grupami karboksylowymi w domenie palców, poprzez dwa dwuwartościowe kationy (Mg^{2+} lub Ca^{2+}) i starter na końcu 3' (dNTP i dwa dwuwartościowe kationy są dopasowane do reakcji). Odkrycie struktury i charakterystyka biochemiczna przyczyniły się natomiast do zrozumienia mechanizmu reakcji przeniesienia nukleotydu, na ataku α -fosforanową grupę nadchodzącego dNTP przez koniec 3'-OH startera [39][40][38].

Tworzy się nowe wiązanie fosfodiesterowe między 3'-OH a grupą α -fosforanową, a wiązanie fosfodiesterowe między α - i β -fosforanami dNTP zostaje zerwane. W reakcji biorą udział dwa jony Mg^{2+} (miejsca wiązania nazywane są odpowiednio miejscem A i B, rysunek 4) i jest to reakcja typu SN2, obejmująca pięciokowalencyjny fosforan będący związkami pośrednim. Podobny mechanizm można zaobserwować w przypadku innych kationów dwuwartościowych, takich jak Mn^{2+} , który dostosowuje geometrię oktaedryczną podobną do Mg^{2+} i również aktywuje reakcję. Kationy Ca^{2+} , mimo tego, że są dwuwartościowe, hamują reakcję. Preferowanym układem dla działania polimerazy DNA jest obecność większej liczby ligandów (więcej niż 6) o znacznych odległościach koordynacyjnych. Mechanizm dwóch jonów metali został zaproponowany na podstawie struktur przedreakcyjnych kompleksów polimeraza DNA - substrat przy użyciu analogów substratów (dNTP na końcu startera lub nieulegający hydrolizie dNTP) lub dwuwartościowego kationu, takiego jak Ca^{2+} (analogi czasami zaburzają geometrię miejsca aktywnego odpowiedzialnego za reakcję). Dostępne źródła wskazują, że dodanie dNTP w strukturze krystalograficznej polimerazy DNA I indukuje wydłużenie startera, ale nie udało się jednak zwizualizować, rzeczywistego procesu reakcji przeniesienia nukleotydu [40][37][38].



Rysunek 4. Mechanizm aktywacji polimerazy DNA przez jony magnezu Mg^{2+} podczas reakcji PCR [38].

4.3.3. Problemy w reakcji PCR

Reakcja PCR jest powszechną techniką laboratoryjną stosowaną w diagnostyce molekularnej. Intensyfikacja badań w ciągu ostatnich lat w zakresie projektowania testów opartych na reakcji PCR umożliwiła optymalizację trudnych warunków amplifikacji DNA [41][35]. Wiele z tych problemów wciąż pozostaje nierozwiązanych. Poniżej opisano najczęściej występujące utrudnienia, z którymi borykają się m.in. laboratoria diagnostyczne i naukowe.

4.3.3.1. Niska wydajność amplifikacji

Głównym problemem podczas reakcji PCR jest brak amplifikacji lub niska wydajność reakcji. Kluczowe jest potwierdzenie obecności DNA przez pomiar jego stężenia i czystości z wykorzystaniem spektrofotometrii lub fluorometrii. Zbyt niskie stężenie matrycy i jego niezadowalająca czystość wymaga odpowiedniego zatężania oraz dodatkowego oczyszczania. Niska czułość polimerazy DNA, może być przyczyną niskiej wydajności amplifikacji DNA, co może wpłynąć na fałszywie negatywny wynik [42].

4.3.3.2. Powstawanie niespecyficzných produktów PCR

Często występującym problemem jest powstawanie niespecyficzných produktów po reakcji PCR. Powodem może być wiązanie się starterów do innych niż zamierzone miejsc w badanym DNA, co skutkuje ich amplifikacją. Przyczyną jest wysoka aktywność polimerazy DNA w temperaturze pokojowej, co może doprowadzić do inicjacji reakcji już podczas dodawania składników mieszaniny reakcyjnej. W następstwie, startery przyłączają się nieswoiście do obecnych w próbówce kwasów nukleinowych, co prowadzi do ich wydłużenia przez enzym i wytworzenia puli nieswoistých produktów. Aby zapobiec powstawaniu tych niespecyficzných produktów, można zastosować polimerazy DNA typu hot-start, których aktywacja zachodzi dopiero w wysokich temperaturach [43].

4.3.3.3. Tworzenie struktur dimerycznych

Tworzenie struktur starter-dimer może wystąpić, gdy startery łączą się ze sobą z powodu komplementarności między ich sekwencjami starterowymi i może prowadzić to do tworzenia dimerów, co skutkuje zdarzeniem samoprimerowania [44]. Powodem może być wysokie stężenie starterów, wysokie temperatury topnienia i długie czasy

przyłączania starterów. Struktury dimeryczne mogą prowadzić do fałszywie ujemnych wyników [45]. Istotna jest optymalizacja warunków PCR, takich jak temperatura hybrydyzacji, stężenie starterów i czas hybrydyzacji. Zwiększenie temperatury hybrydyzacji może zmniejszyć prawdopodobieństwo tworzenia niepożądanych struktur, ale może również zmniejszyć wydajność hybrydyzacji startera z docelowym DNA [46].

Zasadne jest zaprojektowanie starterów, które nie są ze sobą komplementarne oraz nie tworzą struktur drugorzędowych [45]. Dostępnych jest wiele programów komputerowych, które określają prawdopodobieństwo tworzenia się struktur drugorzędowych [46][41].

4.3.3.4. Fałszywie pozytywne wyniki

W diagnostyce molekularnej szczególnym problemem jest występowanie wyników fałszywie pozytywnych. Powodem jest zbyt niska specyficzność starterów oraz homologia z amplifikowaną sekwencją niespecyficzną [47]. Warunki reakcji PCR powinny być zoptymalizowane, aby wyeliminować możliwość powstania wyników fałszywie pozytywnych [48]. W takich okolicznościach materiały eksploatacyjne, takie jak próbki reakcyjne do PCR, próbki wirówkowe i końcówki do pipet powinny być jałowe, a po nastawieniu reakcji pipety oraz komora powinny zostać dokładnie wyczyszczone. Przed rozpoczęciem pracy komora powinna być odpowiednio przygotowana poprzez min. kilkunastominutową ekspozycję z wykorzystaniem promienia światła ultrafioletowego [35].

4.3.3.5. Amplifikacja fragmentów DNA bogatego w pary GC

Problemem, który wpływa na wydajność prowadzonej reakcji PCR jest amplifikacja matryc bogatych w pary GC. DNA, które zawiera sekwencje bogate w guaninę oraz cytozynę są problematyczne ze względu na ich niepełną denaturację podczas amplifikacji. Taki materiał genetyczny wymaga zastosowania dodatkowych wzmacniaczy do reakcji PCR, takich jak DMSO, które umożliwiają obniżenie temperatury topnienia matrycy lub/ oraz zwiększonej temperatury denaturacji [49][50]. Do tego typu układów wykorzystuje się polimerazy DNA, które są wyjątkowo termostabilne [51].

4.3.3.6. Amplifikacja długich fragmentów DNA

Amplifikacji długich produktów DNA wymaga obecności domeny korektorskiej (3'→5' egzonukleazy), która odpowiada za wierność syntezy. Tego typu domenę posiada m.in. polimeraza DNA Pfu [10]. W celu uzyskania dużych produktów PCR przy jednoczesnym zachowaniu wydajności reakcji najczęściej stosuje się mieszanki dwóch polimeraz DNA. Reakcja w omawianym przypadku jest katalizowana przez polimerazę DNA Taq, natomiast polimeraza DNA Pfu pełni funkcję korektorską [52][53].

4.3.3.7. Inhibitory reakcji PCR

Inhibitory reakcji PCR są najczęstszą przyczyną niepowodzenia amplifikacji DNA. Mogą one pochodzić z próbki, która jest źródłem matrycy, powstać podczas przygotowania próbki do reakcji lub z obu tych źródeł [54][55].

4.3.3.7.1. Inhibitory obecne w badanych próbkach

Inhibitory PCR można znaleźć w różnych materiałach biologicznych analizowanych w badaniach klinicznych, spożywczych i środowiskowych. Próbki kliniczne, takie jak krew, surowica lub osocze, mocz i kał, zawierają substancje, które mogą wpływać na amplifikację PCR [56][57][58]. Natywna immunoglobulina (IgG) obecna we krwi jest jednym z najsilniejszych inhibitorów PCR, ponieważ ma wyjątkowe powinowactwo do jednoniciowego DNA [59]. Można częściowo zniwelować ten efekt hamujący, inkubując próbkę z niespecyficznym DNA w celu zneutralizowania IgG. Próbki żywności także zawierają składniki, które mogą zakłócić powstanie produktów PCR [60]. W mleku zawarty jest enzym plazmina, który rozkłada polimerazę DNA Taq, natomiast wysokie stężenie wapnia może hamować reakcję PCR. Podczas pracy z roślinami, można zetknąć się z takimi inhibitorami jak polisacharydy, ksylan czy siarczan dekstranu. Co więcej, fenole obecne w jagodach i pomidorach wydają się szczególnie hamować reakcję PCR. Z drugiej strony martwa biomasa i gleba mogą zawierać różnego rodzaju kwasy np. humusowe [58], które hamują PCR nawet w niskich stężeniach [60]. W osadach ściekowych i ściekach możemy znaleźć tłuszcze, białka, polifenole i metale ciężkie, polisacharydy i jony metali – wszystkie są powszechnymi inhibitorami PCR próbek środowiskowych. Inne inhibitory obejmują składniki komórek bakteryjnych oraz przedmioty laboratoryjne, takie jak pyłki, proszek z rękawiczek, plastikowe naczynia laboratoryjne i celuloza [61][62][57][63].

4.3.3.7.2. Inhibitory chemiczne

Drugą grupę inhibitorów stanowią głównie odczynniki chemiczne oraz substancje wykorzystywane podczas izolacji DNA. Do skutecznej lizy komórek lub przygotowania czystego genomowego DNA potrzebne są substancje, które w pewnych stężeniach mogą powodować inhibicję PCR. Należą do nich różne sole (chlorek sodu lub potasu), detergenty jonowe, detergenty niejonowe lub cząsteczki organiczne (EDTA, etanol, alkohol izopropylowy lub fenol) [64]. Detergenty jonowe (np. dezoksycholan sodu, sarkozyl i SDS) silnie hamują reakcję PCR, podczas gdy detergenty niejonowe (np. Nonidet P-40, Tween 20, Triton X-100 i N-oktyloglukozyd) hamują reakcję PCR tylko przy stosunkowo wysokich stężeniach [65]. EDTA także znajduje się w kilku buforach elucyjnych zestawów do oczyszczania DNA, ale w pewnych stężeniach może chelatować jony magnezu, a tym samym hamować aktywność polimerazy DNA [57]. Podczas gdy etanol jest ważną częścią etapów płukania podczas izolacji DNA, jest również silnym inhibitorem reakcji PCR [66]. Bardzo ważne jest, aby pozbyć się nawet resztek etanolu przed elucją DNA. Niektóre protokoły zalecają chlorek litu do odsalania RNA, ponieważ jest on lepiej rozpuszczalny w etanolu niż octan sodu. Należy jednak zachować ostrożność, ponieważ może hamować syntezę białek i polimerazę DNA. Dodatki do mieszaniny PCR, takie jak ditiotreitol, sulfotlenek dimetylu lub merkaptoetanol, w pewnych stężeniach mogą również działać hamująco [67][68][69][70]. Zdarza się, że na wydajność reakcji PCR może mieć wpływ materiał wymazówek lub skład podłoża [61].

W tabeli nr 5 zaprezentowano kilka inhibitorów, wraz z potencjalnym mechanizmem ich działania [56][71][62][57].

Tabela 5. Tabela z zestawieniem inhibitorów wraz z potencjalnym mechanizmem inhibicji

Nazwa inhibitora	Mechanizm działania	Referencje
Fenol	Hamuje enzymy poprzez denaturację białek	[60]
Polifenole	Wytrącają się razem z kwasami nukleinowymi, uniemożliwiają ponowne rozpuszczenie RNA po precypitacji, chelatują jony metali oraz zmieniają właściwości chemiczne kwasów nukleinowych	[60] [61]
Komórki bakteryjne	Odpowiadają za degradację/sekwestrację kwasów nukleinowych	[60] [61]

Kwas humusowy	Wiąże się do kwasów nukleinowych i enzymów	[60][61][72][73]
Hematyna	Odpowiada za niepełne stopienie DNA	[60][61][59][73]
Jony metali	Redukują specyficzność starterów	[60][74][61]
Detergenty	Degradują polimerazy DNA	[60][74][61]
Jony wapnia	Inhibują działanie polimerazy DNA, a także działanie odwrotnej transkryptazy, tworzą konkurencję dla innych dwuwartościowych jonów metali w reakcji	[60] [61]
EDTA	Chelatuje jony metali	[60] [61]
Substancje antywirusowe	Hamują elongację DNA	[60] [61]

4.3.4. Możliwe rozwiązania problemów występujących w reakcji PCR

4.3.4.1. Wzmacniacze reakcji PCR

W celu poprawy ogólnej wydajności, ale także wydajności trudnych reakcji PCR, stosuje się różnorodne wzmacniacze do PCR. Każdy ze wzmacniaczy ma unikalne właściwości i inny sposób działania. Stosuje się je w celu poprawy czułości, wydajności i specyficzności PCR, albo w celu złagodzenia skutków działania inhibitorów w reakcji. Stosowane wzmacniacze można podzielić na cztery główne grupy. Pierwsze trzy z nich obejmują dodatki do reakcji PCR o dobrze zdefiniowanych mechanizmach, a mianowicie takie, które ułatwiają amplifikację sekwencji bogatych w pary GC, przeciwdziałają szkodliwemu działaniu inhibitorów PCR lub zmieniają kinetykę samej reakcji (nanomateriały) [75]. Czwarta grupa to mieszanka stosowanych wzmacniaczy o niejasnym mechanizmie działania [76][54].

W tabeli nr 6 zostały zebrane najczęściej stosowane wzmacniacze w reakcji PCR.

Tabela 6. Lista popularnych wzmacniaczy wraz z pełnionymi funkcjami w reakcji PCR

Nazwa związku	Działanie wzmacniające	Działanie hamujące	Funkcje związku	Referencje
Tween20	0,1 – 2,5 %	>5 %	Stabilizuje matrycę DNA i polimerazę DNA	[77][78]
Triton X-100	<5 %	>5 %	Stabilizuje matrycę DNA i polimerazę DNA	[46]

Glicerol	10 – 15 %	>20 %	Zwiększa specyficzność starterów i ogranicza powstawanie struktur drugorzędowych powodowanych przez regiony bogate w pary GC, obniża temperaturę rozdzielania nici DNA	[79]
PEG 6000	5 – 15 %	>20 %	Umożliwia amplifikację DNA w niskich temperaturach hybrydyzacji, zmniejsza niespecyficzne przyłączanie jednoniciowego DNA (ssDNA)	[80]
DMSO	2 – 10 %	>10 %	Zmniejsza oddziaływania międzycząsteczkowe, co ma istotne znaczenie przy hybrydyzacji nici DNA, dzięki temu możliwe jest powstanie luźniejszej struktury II-rzędowej, co ułatwia dostęp polimerazie DNA w przypadku występowania sekwencji bogatej w pary GC	[81][69][70]
Betaina	0,5 – 2 M	>5 M	Funkcja podobna do DMSO, ale z uwagi na to, że betaina jest związkiem organicznym, o charakterze jonu obojnaczego, może obniżać temperaturę topnienia (T _m) dsDNA, jest często stosowana w celu ułatwienia amplifikacji matryc bogatych w pary GC oraz zwiększenia specyficzności reakcji amplifikacji izotermicznej. Oprócz obniżania T _m , betaina jest również stosowana jako bariera molekularna utrudniająca hybrydyzację między starterem a matrycą, zwiększając w ten sposób specyficzność amplifikacji izotermicznej, stabilizuje także kompleks DNA-polimeraza DNA	[69][82][83]
BSA	0,1 – 0,8 mg/ml	>1 mg/ml	Zmniejsza niespecyficzne wiązania starterów w sekwencjach bogatych w pary GC	[70][84]

TMAC	15-100 mM	> 100 mM	Zwiększa specyficzność hybrydyzacji i T _m , stosowanie TMAC jest zalecane w warunkach PCR z wykorzystaniem zdegenerowanych starterów	[85]
DTT	5 – 40 mM	> 40 mM	Stabilizuje polimerazę DNA w reakcji PCR	[67]
Albumina	100 ng/ 50 µl	> 100 ng/ 50 µl	Utrzymuje DNA w formie zdenaturowanej, dobrze sprawdza się w przypadku próbek klinicznych, środowiskowych, lizatów komórkowych oraz trudnotopliwych matryc	[86]
Formamid	do 2,5%	> 2,5%	Wspomaga proces denaturacji DNA, jeśli zostanie zastosowany w niskim stężeniu hamuje powstanie struktur II-rzędowych	[87][70]
Glikol etylenowy	0,2 – 2 M	> 2 M	Wykazuje działanie analogiczne do wcześniej wspomnianej betainy, literatura wskazuje jednak na większą skuteczność w przypadku stosowania glikolu etylenowego w porównaniu do betainy	[77][78]

Wszystkie z wymienionych wzmacniaczy reakcji PCR mają na celu poprawę wydajności prowadzonych reakcji PCR przy jednoczesnym zachowaniu pełnej aktywności stosowanej polimerazy DNA. Opisanie dokładnych mechanizmów działania wzmacniaczy reakcji PCR jest dość skomplikowane, ponieważ wpływ na efekt ostateczny ma kilka czynników, m.in. stężenie stosowanych wzmacniaczy. Po przekroczeniu pewnej granicy dodatek wymienionych w tabeli nr 6 substancji zaczyna mieć właściwości inhibujące [75][76].

4.3.4.2. Modyfikacje polimeraz DNA

Pomimo dostępności wielu wariantów polimeraz DNA nadal poszukiwane są konkurencyjne enzymy do amplifikacji kwasów nukleinowych odporne na inhibitory. Rozwój inżynierii genetycznej oraz bioinformatyki umożliwił wydajne otrzymywanie polimeraz DNA o unikalnych właściwościach [1].

4.3.4.2.1. Mutacje punktowe

Jedną z możliwości w tworzeniu nowych polimeraz DNA są modyfikacje już istniejących wariantów poprzez wprowadzanie mutacji punktowych m.in. zamianę pojedynczych nukleotydów albo zamianę reszt aminokwasowyc (np. dodatnio naładowane reszty aminokwasowe w domenie polimerazy DNA są ważne dla interakcji z DNA). Przykładem jest polimeraza DNA wyizolowana z *Pyrobaculum calidifontis* (Pca-Pol), w której zidentyfikowano dwie reszty w domenie śródścza polimerazy DNA oraz zamieniono je na argininę w celu poprawy właściwości tego enzymu. Zmutowane białko wyprodukowano heterologicznie w *E. coli*. Charakterystyka biochemiczna zmutowanego oraz dzikiego typu polimerazy DNA nie wykazała znaczących różnic w przypadku optymalnego zakresu pH, tolerancji stężeń jonów metali, preferencji buforów reakcyjnych oraz aktywności korektorskiej 3'→5' egzonukleazy. Zmieniła się specyficzna aktywność, procesywność i szybkość syntezy DNA w porównaniu do polimerazy DNA typu dzikiego. Specyficzna aktywność jednego z mutantów (G522R-E555R) była prawie 9-krotnie wyższa niż enzymu typu dzikiego [88].

Na ekspresję lub funkcję genu polimerazy DNA mogą mieć wpływ także nabyte mutacje punktowe, zmienność strukturalna oraz zmienność epigenetyczna. Pomimo ich potencjalnego znaczenia biologicznego i medycznego, te obszary nauki wciąż są jeszcze słabo zbadane, a zatem mogą być istotnymi obszarami badań. Mutacje (SNP) zidentyfikowano w każdym z kanonicznych genów polimerazy DNA oraz w kilku wyspecjalizowanych polimerazach DNA. Potencjalny wpływ tych zmian na katalizę *in vitro* można wykorzystać do identyfikacji wariantów o największym potencjale zmiany funkcji *in vivo* [89].

4.3.4.2.1.1. Zmiany punktowe w polimerazie DNA Taq

Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR), katalizowana przez polimerazę DNA Taq, może być wykorzystana m.in. do testów bezpieczeństwa żywności w celu wykrycia obecności szkodliwych bakterii w żywności lub w paszy. Niektóre związki występujące w żywności, takie jak czekolada lub czarny pieprz, są inhibitorami polimerazy DNA i wymagają dużego rozcieńczenia lub intensywnego oczyszczania, aby umożliwić skuteczną reakcję qPCR [90][91]. Przeprowadzono w tym celu poszukiwania wariantów polimerazy DNA Taq o zwiększonej tolerancji na inhibitory w żywności, stosując wodny ekstrakt pieprzu

czarnego na poziomie znacznie obniżającym efektywność qPCR. Aby wyszukać odpowiednio zmodyfikowaną polimerazę DNA tworzy się biblioteki klonów, a następnie szacuje potencjalne możliwości wybranych modyfikacji. Zmiana kwasu asparaginowego na asparaginę w pozycji 732, około 30 Å od miejsca aktywnego polimerazy DNA spowodowała zwiększenie tolerancji na obecność inhibitorów w reakcji PCR [92].

4.3.4.2.2. Fuzyjne polimerazy DNA

Polimerazy to enzymy, które odgrywają istotną rolę w syntezie DNA lub/i RNA, działając jako maszyny molekularne odpowiedzialne za dokładną replikację i transkrypcję informacji genetycznej. Dotychczas poznane polimerazy DNA zostały dokładnie zbadane i dobrze scharakteryzowane, jednak w ostatnich latach pojawiła się nowa klasa enzymów zwana polimerazami fuzyjnymi [93][94].

W biotechnologii molekularnej fuzyjne polimerazy DNA wykorzystywane są w technikach amplifikacji DNA, takich jak łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), w celu poprawy wierności, wydajności, a także amplifikacji DNA w obecności inhibitorów. Wprowadzenie nowych właściwości w fuzyjnych polimerazach DNA ułatwiło również rozwój zaawansowanych technologii sekwencjonowania, narzędzi biologii syntetycznej i metod manipulacji DNA [93][94].

Fuzja polimerazy DNA z dodatkową domeną białkową jest coraz popularniejszą i jednocześnie obiecującą techniką konstruowania enzymów o ulepszonych właściwościach. Już wcześniej podejście to było opisane w przypadku polimerazy DNA Pfu-, Taq- i Φ 29 [95][96][97][98]. Na przykład białko Sso7d wiążące DNA z termofilnego archeonu *Sulfolobus solfataricus* zostało przyłączone do polimerazy DNA Pfu; domena wiążąca DNA TopoV z *Methanopyrus kandleri* została przyłączona do polimerazy Φ 29. Scharakteryzowana została także ulepszona polimeraza DNA Gss podobna do Bst z białkiem Sso7d na C-końcu, gdzie enzym wykazywał zwiększoną procesywność i tolerancję na inhibitory podczas amplifikacji DNA [96].

W związku z obecnością licznych czynników inhibujących reakcję PCR wciąż poszukiwane są nowe modyfikacje dobrze poznanej polimerazy DNA Taq, która pozwoli na wydajne przeprowadzenie reakcji PCR, pomimo występujących podczas reakcji utrudnień. Modyfikacje głównie opierają się o zmianę reszt aminokwasowych lub dokonywanie fuzji z monomerycznymi białkami stabilizującymi DNA (m.in. Sso7d, NeqSSB, RB69SSB, TtePriB czy PfuDBDlig) [94].

4.3.4.2.2.1. Fuzyjne polimerazy DNA Taq

Literatura donosi o kilku przykładach otrzymania fuzyjnych polimeraz DNA z wykorzystaniem polimerazy DNA Taq, które w porównaniu do polimerazy DNA dzikiego typu wykazywały znacznie lepsze właściwości [93][94].

Otrzymanie fuzyjnej polimerazy DNA NeqSSB-TaqS z domeny Taq Stoffel oraz białka NeqSSB wyizolowanego z *Nanoarchaeum equitans*, miało na celu znaczną poprawę właściwości polimerazy DNA TaqS. Rekombinowana polimeraza NeqSSB-TaqS wykazywała znacznie wyższą szybkość syntezy DNA, procesywność, termostabilność i wyższą tolerancję na inhibitory obecne w reakcji PCR niż polimeraza DNA Taq Stoffel. Badania wykazały, że polimeraza DNA NeqSSB-TaqS wykazuje dużą elastyczność w stosunku do stosowanych stężeń soli [93].

Poprawę właściwości polimerazy DNA TaqS uzyskano także w przypadku fuzji z domeną PfuDBDlig (PfuDBDlig-TaqS). Polimeraza ta miała zwiększoną procesywność w odniesieniu do polimerazy TaqS, co więcej rekombinowane białko fuzyjne było bardziej termostabilne w porównaniu do TaqS. Otrzymane białko fuzyjne wykazywało również znacznie wyższą odporność na inhibitory w reakcji PCR, takie jak heparyna lub laktoferyna, a matryce bogate w GC były znacznie wydajniej amplifikowane [94].

Kolejnymi otrzymanymi fuzyjnymi polimerazami były RB69SSB-TaqS oraz TtePriB-TaqS. Każdy z uzyskanych wariantów pozwolił na polepszenie minimum dwóch cech w odniesieniu do niemodyfikowanej referencyjnej polimerazy DNA. Wariant RB69SSB-TaqS pozwolił na poprawę termostabilności, czułości, wydajności amplifikacji matryc bogatych w GC oraz odporności na inhibitory w reakcji PCR. W przypadku ostatniego wariantu TtePriB-TaqS poprawa nastąpiła w odniesieniu do termostabilności oraz wydajności amplifikacji matryc bogatych w GC [99].

Stabilizowana białkiem Sso7d polimeraza DNA Taq, które zapobiega dysocjacji polimerazy DNA podczas procesu amplifikacji DNA, zwiększa jej procesywność, a tym samym wzrasta wydajność reakcji PCR czy qPCR [100].

4.3.4.2.2.2. Fuzyjne polimerazy DNA Pfu

Jedną z najpopularniejszych fuzyjnych polimeraz DNA, jest polimeraza Pfu-Sso7d, która składa się z białka Sso7d i polimerazy DNA Pfu. Fuzyjna polimeraza DNA Pfu-Sso7d jest znana z wysokiej procesywności, wydajności i wierności [10]. W odróżnieniu od polimerazy DNA Taq jest bardziej termostabilna, wyróżnia się

mniejszym odsetkiem błędów w zamplifikowanym DNA, ale jednocześnie dłuższy jest czas otrzymywania dużych produktów PCR [14].

Fuzja polimerazy DNA Pfu z białkiem Sso7d pozwoliła na znaczną poprawę jej procesywności, w odróżnieniu od natywnej polimerazy DNA Pfu [95][98].

Modyfikacje wprowadzone do polimerazy DNA Pfu miały na celu zwiększenie wydajności. Modyfikacje te obejmują zmiany w sekwencji aminokwasowej polimerazy DNA Pfu lub fuzję z małym białkiem wiążącym DNA, ale nie fuzję dwóch oddzielnych białek. Jest niewiele źródeł dostępnych w literaturze opisujące te modyfikacje. Większość modyfikacji tego enzymu jest chroniona patentami. Dalsze analizy obejmujące badania nad modyfikacją polimerazy DNA Pfu wciąż są znaczącym wyzwaniem dla biologii molekularnej. W tabeli nr 7 zebrano znane modyfikacje polimerazy DNA Taq oraz Pfu.

Tabela 7. Tabelaryczne zestawienie najpopularniejszych modyfikacji polimeraz DNA Taq oraz Pfu stosowanych w reakcjach PCR

Skrócona nazwa modyfikowanej polimerazy DNA	Nazwa zmodyfikowanej polimeraza DNA	Uzyskane właściwości	Referencje
Taq	PfuDBDlig-TaqS	Zwiększona procesywność, wyższą odporność na inhibitory w reakcji PCR (heparyna lub laktoferyna), wydajniejsza amplifikacja matryc bogatych w pary GC	[94]
	NeqSSB-TaqS	Wyższa szybkość syntezy DNA, procesywność, termostabilność oraz wyższa odporność na inhibitory obecne w reakcji PCR	[94] [93]
	TtePriB-TaqS	Zwiększona termostabilność oraz wydajność amplifikacji matryc bogatych w pary GC	[94]
	RB69SSB-TaqS	Poprawa termostabilności, czułości oraz wydajności amplifikacji matryc bogatych w parzy GC, wyższa odporność na inhibitory w reakcji PCR	[94]
	Sso7d-Taq	Zwiększona procesywność	[100]
Taq(Δ289)	Sso7d-Taq(Δ289)	Zwiększona procesywność	[99]
Pfu	Pfu-Sso7d	Zwiększona procesywność	[95] [98]

4.4. Przykłady białek wykorzystywanych do tworzenia fuzyjnych polimeraz DNA

Interakcje białek opiekuńczych w widełkach replikacyjnych polimeraz DNA zwiększają procesywności polimerazy DNA. Białko wiążące jednoniciowy DNA (SSB) jest niezbędnym białkiem, które ściśle i kooperatywnie wiąże się z jednoniciowym DNA podczas replikacji. Umożliwia to usunięcie przypadkowych struktur drugorzędowych i ochronę odsłoniętego DNA przed endogennymi nukleazami [101]. Badania wykazały, że zmiana właściwości wiązania DNA przez polimerazy DNA poprzez dodanie domen wiążących DNA i wprowadzenie mutacji może wpływać na ich procesywność i aktywność katalityczną. Domena wiążąca dsDNA białka Sso7d (7 kDa), wiąże się z DNA w sposób niezależny od sekwencji. Wykazano, że procesywność polimeraz DNA zarówno rodziny A, jak i rodziny B jest zwiększona przez fuzję z Sso7d [102].

4.4.1. Białka z rodziny Sul7d4

Najpopularniejszymi białkami wykorzystywanymi w fuzjach z polimerazami DNA są białka z rodziny Sul7d4. Są to hipertermofilne i kwasofilne archeony z rzędu Sulfolobales z królestwa Crenarchaeota. Białka te tworzą rodzinę zwaną „7 kDa wiążącą DNA” lub w skrócie Sul7d4. Zostały po raz pierwszy wyizolowane z *Sulfolobus acidocaldarius*, który wytwarza pięć z nich, nazwanych Sac7a, Sac7b, Sac7c, Sac7d i Sac7e. Sac7d i Sac7e, są kodowane przez różne geny, podczas gdy Sac7a i Sac7b są skróconymi wersjami Sac7d5, Sac7d6, Sac7d7. Wysoce podobne homologi znaleziono we wszystkich gatunkach *Sulfolobus*, takich jak Sso7d z *Sulfolobus solfataricus* [103] oraz Ssh7a i Ssh7b z *Sulfolobus shibatae* [104].

Sac7d i Sso7d to dwa najlepiej zbadane białka z w/w rodziny. Scharakteryzowano je pod kątem struktury, funkcji, stabilności chemicznej i właściwości biofizycznych. Sac7d i Sso7d są hipertermostabilne (odpowiednio $T_m = 90,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $100,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) [105] i są odporne na denaturację chemiczną w szerokim zakresie pH od pH 0 do co najmniej pH 12. Mimo, że sekwencje aminokwasowe Sac7d i Sso7d wykazują tylko kilka różnic, Sso7d jest bardziej stabilne niż Sac7d. Ich trójwymiarowe struktury dowodzą, że oba fałdują się w sposób podobny do domeny SH3, ograniczonej przez C-kończową α -helisę oraz skręcają podwójną helisę DNA po związaniu się z mniejszym rowkiem. Wykazano, że Sac7d i Sso7d są czynnikami wiążącymi dsDNA z wartościami Kd zmieniającymi się w sposób zależny od stężenia soli od 20 nM (niskie stężenie soli) do 3,8 μM (wysokie

hipertermofilnym, obligatoryjnym pasożytem/symbiontem *Craenarchaeon Ignicoccus hospitalis*. Wzrost tych drobnoustrojów zachodzi w temperaturze od 70 do 98°C, a optymalnie w temperaturze 90°C, w warunkach ściśle beztlenowych. Ze średnicą zaledwie 400 nm *N. equitans* wyróżniany jest jako jeden z najmniejszych znanych żywych organizmów [109]. Co więcej, obok *Candidatus Carsonella ruddii* [110], ma najmniejszy genom zsekwencjonowany w historii, który ma długość zaledwie 490 885 par zasad. Jest to jeden z najbardziej zwartych genomów. *N. equitans* nie ma genów dla najważniejszych szlaków metabolicznych, w tym biosyntezy lipidów, kofaktorów, aminokwasów i nukleotydów. Jednak w przeciwieństwie do większości znanych organizmów o zredukowanych genomach, ma pełen zestaw enzymów biorących udział w replikacji, naprawie i rekombinacji DNA [111].

Białka wiążące jednoniciowy DNA są istotnymi elementami żywych komórek i są obecne we wszystkich domenach życia oraz w wirusach. Poprzez niezależną od sekwencji interakcję z ssDNA, białka te zapobiegają parowaniu nici, tworzeniu struktury drugorzędowej i degradacji nukleazy [112]. W ten sposób białka SSB biorą udział we wszystkich procesach związanych z metabolizmem ssDNA, takich jak na przykład replikacja, rekombinacja i naprawa [113][114][115]. Białka SSB można zidentyfikować m. in. na podstawie obecności wysoce konserwatywnej domeny wiążącej DNA znanej jako ob. (ang. Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Fold Domain), czyli wiążącej oligonukleotydu/oligosacharydu/oligopeptydu typowo składającej się z około 100 reszt aminokwasowych. [111].

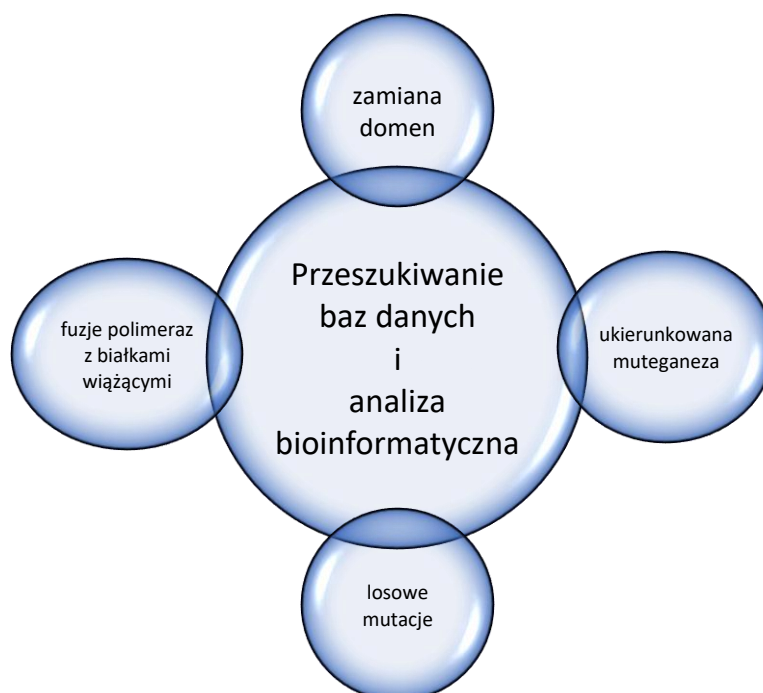
4.4.3. Białko RB69SSB

Białko RB69SSB wchodzi w skład rodziny białek SSB. Posiada silnie zakonserwowaną strukturę, tzw. domenę OB. Domena występuje u wszystkich białek, które mają zdolność wiązania ssDNA. Dzięki obecności tej domeny możliwe jest niespecyficzne wiązanie ssDNA, umożliwia ona także wiązanie RNA. Białko RB69SSB bierze udział w procesach, takich jak replikacja, rekombinacja oraz naprawa DNA. Uniemożliwia powstawanie struktur drugorzędowych i chroni przed szkodliwym działaniem nukleaz. [116]. Białko RB69SSB zostało wyizolowane z faga RB69, który wywołuje infekcje u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Białka wiążące jednoniciowe DNA wspomagają poprawne funkcjonowanie rodziny polimeraz fagowych. Brak tego typu białek znacząco wpływa na spadek procesywności polimerazy DNA oraz odpowiada za częstsze powstawanie struktur drugorzędowych na matrycy DNA [117].

RB69SSB jest niewielkim monomerycznym białkiem, które jest zbudowane z 299 reszt aminokwasowych. Jego struktura krystalograficzna jest zbliżona budową do białka SSB pochodzącego z faga T4. Białko RB69SSB zbudowane jest z 3 domen: N-terminalnej, zwanej także B-domeną (zawiera reszty aminokwasowe 1-21), której zadaniem jest wiązanie się do ssDNA. A-domena, która obejmuje 45 reszt aminokwasowych od C-końca, pozwala ona na interakcje z innymi białkami, które podobnie jak u innych białek SSB uczestniczą w procesie replikacji, rekombinacji oraz naprawy. Ostatnia z domen, domena „rdzenia”, posiada powinowactwo do jednoniciowego DNA (obejmuje reszty aminokwasowe 22-254) [101][118].

4.5. Wyzwania i perspektywy dotyczące modyfikacji polimeraz DNA

Pomimo obiecującego potencjału fuzyjnych polimeraz DNA pozostaje wiele wyzwań i ograniczeń związanych z ich otrzymywaniem. Obejmują one projektowanie, otrzymywanie oraz optymalizację działania enzymu fuzyjnego. Scharakteryzowanie właściwości strukturalnych i funkcjonalnych oraz rozwiązanie potencjalnych problemów związanych ze współdziałaniem różnych domen polimerazy DNA, może być także ogromnym wyzwaniem. Pokonanie tych przeszkód wymaga interdyscyplinarnej współpracy i ciągłego poszukiwania nowych strategii w dziedzinie bioinżynierii oraz wykorzystania wysoko rozwiniętych systemów bioinformatycznych (rysunek 6) [1].



Rysunek 6. Strategie inżynierii genetycznej stosowane do projektowania nowych polimeraz DNA [opracowanie własne]

4.5.1. Ograniczenia w projektowaniu polimeraz DNA

Rozwój rynku polimeraz DNA jest hamowany przez rosnące koszty ich produkcji, co uniemożliwia rozwój nowych technologii wymagających drogich enzymów. Postęp obserwowany w biotechnologii ma znaczący wpływ na rynek polimeraz DNA poprzez gwałtowny wzrost ich cen. Wywołane jest to dużym zapotrzebowaniem na polimerazy DNA w diagnostyce molekularnej, ze względu na potrzebę wykonywania ogromnej ilości testów genetycznych, czego przyczyną była pandemia COVID-19. Wskutek drastycznego wzrostu cen najważniejszego składnika testów służących amplifikacji czyli polimeraz DNA, niektórych laboratoriów badawczych i medycznych nie stać na wykonywanie odpowiedniej ilości analiz genetycznych bez wsparcia finansowego instytucji zewnętrznych (głównie rządowych), zwłaszcza w obliczu potrzeby stosowania testów wykorzystujących polimerazy DNA na masową skalę [1]. Z drugiej strony tak duże zapotrzebowanie na enzymy wykazujące zdolność amplifikacji DNA, powinno przyczynić się do intensyfikacji działań z optymalizacją kosztów ich produkcji, co można uzyskać m.in. poprzez otrzymywanie fuzyjnych polimeraz DNA o zwielokrotnionej aktywności.

4.5.2. Przykłady strategii pozyskiwania nowych polimeraz DNA

4.5.2.1. Polimerazy DNA pochodzenia roślinnego

Oprócz do tej pory poznanych fuzyjnych polimeraz DNA ciekawą alternatywą do tworzenia fuzyjnych enzymów są roślinne polimerazy DNA. Z wyjątkiem kilku szlaków, które są specyficzne dla niektórych linii komórkowych, związanych z rozwojem układu odpornościowego kręgowców, organizmy roślinne wydają się mieć te same wymagania związane z aktywnością polimerazy DNA, co komórki ssaków. Komórki roślinne podlegają ciągłej ekspozycji na promieniowanie UV, muszą zapewnić replikację genomu plastydów i są zdolne do wznowienia podziału komórkowego po latach przebywania w stanie uśpienia w nasionach. Ponadto komórki roślinne czasami podlegają procesowi zmienności genetycznej i epigenetycznej zwanej zmiennością somaklonalną [119]. Molekularne szczegóły tego mutagennego procesu nie są dobrze poznane, ale możliwe, że obejmuje on jedną lub więcej aktywności polimerazy DNA. Ponadto istnieje zasadnicza różnica między komórkami roślinnymi, a zwierzęcymi związana z przekazywaniem informacji genetycznej. Przepuszczalnie komórki zwierzęce mogą tolerować większe obciążenie mutacyjne tkanek somatycznych, ponieważ zawierają

wyspecjalizowaną linię komórkową, która jest zarezerwowana do przekazywania genomu z pokolenia na pokolenie (linię zarodkową). Organizmy roślinne nie zawierają takiej linii, zamiast tego gamety są wytwarzane z komórek merystematycznych po wielu rundach podziału somatycznego. Sugeruje to, że procesy replikacji i/lub naprawy w komórkach roślinnych mogą wymagać większej wierności. W tym kontekście interesujące będzie przeanalizowanie, w jaki sposób polimerazy DNA komórek roślinnych różnią się od ich zwierzęcych odpowiedników i jak ich role są dostosowane do specyficznych warunków fizjologii roślin. Podejrzewa się, że ze względu na ekstremalne warunki bytowania wielu roślin, polimerazy DNA takiego pochodzenia mogą być termostabilne oraz odporne na inhibitory. Jest to istotna informacja oraz punkt odniesienia do otrzymywania nowych wariantów polimeraz DNA [120].

4.5.2.2. Polimerazy DNA pochodzenia środowiskowego

Mutacje genu polimerazy DNA poprzez miejscowo specyficzną lub losową mutagenezę, są skutecznymi sposobami tworzenia zmodyfikowanych enzymów o ulepszonej wydajności PCR lub specyficznych właściwościach do manipulacji DNA *in vitro*. Dużą uwagę badaczy w ostatnich latach przyciąga również wykorzystanie metod sztucznej ewolucji, pozwalającej na tworzenie polimeraz DNA o nowych właściwościach [121]. Strategia ta opiera się o wykorzystanie środowiskowego DNA. Region DNA dotyczący centrum aktywnego polimerazy DNA, w genach polimerazy DNA Taq i polimerazy DNA Pfu, został zastąpiony fragmentami PCR zamplifikowanymi z wykorzystaniem DNA pochodzącym z próbek gleby w różnych miejscach w Japonii, a następnie wklonowany do DNA wektorów ekspresyjnych. Finalnie wyprodukowano w *E. coli* pulę chimerycznych enzymów, które wykazywały aktywność polimerazy DNA o zupełnie różnych właściwościach [122] [123].

4.5.2.3. Pojawiające się trendy i potencjalne innowacje dotyczące nowych wariantów fuzyjnych polimeraz DNA

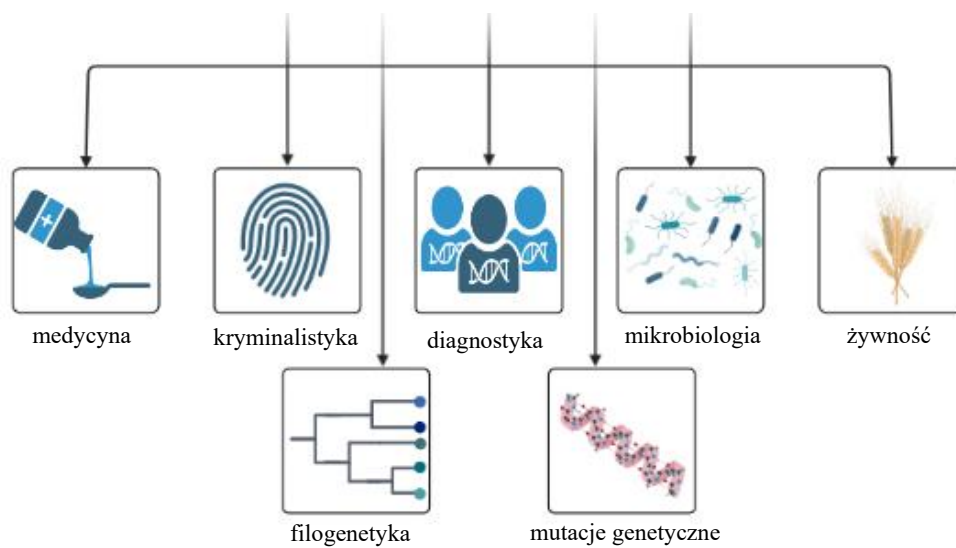
Przypuszcza się, że główny nacisk przyszłego rozwoju polimeraz DNA nie będzie skupiał się na enzymach o uniwersalnych właściwościach, które są w stanie podołać wszystkim problemom związanym z amplifikacją DNA, ponieważ wydaje się to być nieosiągalne. Kładzie się nacisk na projektowanie polimeraz DNA o wyspecjalizowanych funkcjach odpowiednich do indywidualnych celów, w tym amplifikacji całego genomu, szybkiego wykrywania krótkiego DNA, nowych technologii

sekwencjonowania itp. Dalsze badania nad polimerazami DNA mogą ułatwić wynalezienie nowych technologii analizy genetycznej, które są całkowicie różne od dotychczas stosowanych reakcji PCR lub technik z nią związanych. Amplifikacja izotermiczna bez zmiany temperatury jest wygodniejsza i bardziej praktyczna niż standardowy PCR, a rozwój tego typu techniki wciąż trwa [124]. Kilka obecnie stosowanych metod opiera się na aktywności polimeraz DNA polegającej na przemieszczaniu nici (SD). Polimerazy DNA z bakteriofaga $\phi 29$ i *B. stearothermophilus* są reprezentatywnymi enzymami dla aktywności SD. Amplifikacja całego genomu przy użyciu aktywności SD polimerazy DNA $\phi 29$ jest obecnie szczególnie przydatna do analizy pojedynczych komórek. Alternatywnie zastosowano helikazę do dysocjacji dwuniciowego DNA z pomysłu naśladowania replikacji DNA na żywo [125]. Chociaż technika amplifikacji zależnej od helikazy (HDA) nie była rutynowo stosowana [126], odkrycie na nowo tej techniki poprzez konstrukcję fuzyjnej helikazy może przyczynić się do powstania interesującego narzędzia w inżynierii genetycznej [14].

Z drugiej strony jednak aktualne kierunki rozwoju biotechnologii molekularnej wskazują na to, że fuzyjne polimerazy DNA, które z założenia powinny mieć uniwersalne zastosowanie, zyskują na znaczeniu w diagnostyce. Można je zaprojektować tak, aby posiadały wyspecjalizowane właściwości, takie jak np. wysoka procesywność lub zwiększona wierność, w celu dokładnego wykrywania mutacji genetycznych lub ukierunkowanej edycji genomu w podejściach do terapii genowej [1].

W dziedzinie nanotechnologii fuzyjne polimerazy DNA przyczyniły się do rozwoju nanourządzeń i maszyn molekularnych opartych na DNA. Włączając domeny polimerazy DNA o określonych funkcjach, naukowcy mogą projektować systemy, zdolne do wykonywania złożonych zadań, takich jak obliczenia związane z DNA w tzw. komputerze molekularnym. Zapotrzebowanie na technologie diagnostyczne i lecznicze rośnie wraz z występowaniem chorób przewlekłych, w tym nowotworów i chorób układu krążenia. Na znaczeniu zyskały przede wszystkim enzymy o wysokiej wierności, które są coraz częściej stosowane w diagnostyce i leczeniu nowotworów. W rezultacie wzrasta zapotrzebowanie na wysokiej jakości polimerazy DNA, a takimi niewątpliwie są fuzyjne polimerazy DNA, które mogą z wysoką wiernością kopiować DNA i identyfikować mutacje z wysoką czułością i specyficznością (rysunek 7) [1].

Zastosowanie polimeraz DNA w reakcji PCR



Rysunek 7. Przykładowe dziedziny nauki zależne od polimeraz DNA [Grafika stworzona przy wykorzystaniu platformy BioRender Joanna Nowicka 2023]

5. Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie, charakterystyka oraz zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA *Pyrococcus furiosus*. Dodatkowym celem było zbadanie wpływu wybranych inhibitorów na wydajność amplifikacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA.

Modele badawcze, czyli polimeraza Pfu oraz białka wiążące DNA (NeqSSB oraz Sso7d) wykorzystane w prezentowanej rozprawie doktorskiej wybrane zostały ze względu na swoje unikalne cechy, takie jak wysoka termostabilność, która wynika bezpośrednio z właściwości mikroorganizmu, z którego zostały wyizolowane oraz potencjalna oporność na wybrane inhibitory.

Etapy pracy dla każdego modelu badawczego obejmowały:

- Projektowanie i konstrukcję fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA
- Produkcję i oczyszczanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA
- Charakterystykę molekularną fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA
- Zbadanie potencjalnych aplikacji otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA
- Porównanie odporności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na znane inhibitory stanowiące problem w różnych obszarach diagnostyki molekularnej.

Przeprowadzając szczegółową analizę właściwości fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, niniejsza rozprawa miała na celu poszerzenie zakresu wiedzy dotyczącej możliwości nowych sposobów modyfikacji tego jakże popularnego enzymu i dostarczenie cennych wskazówek naukowcom i personelowi technicznemu zajmującemu się amplifikacją DNA. Przedstawiona analiza wyników wraz z przeprowadzoną dyskusją mogą przyczynić się do wyznaczenia nowych sposobów optymalizacji metod powielania DNA opartych na fuzyjnych polimerazach DNA, co w konsekwencji może przełożyć się na poprawienie ich wydajności, dokładności oraz znalezienie szerszego zastosowania w biologii molekularnej.

6. Materiały

6.1. Próbki kliniczne

- Sierść, wymazy, krew psia – GeneVet, Polska (materiał udostępniony za zgodą i wiedzą właściciela zwierzęcia)
- Pióra, krew gołębi – GeneVet, Polska (materiał udostępniony za zgodą i wiedzą właściciela zwierzęcia)
- Włosie końskie – GeneVet, Polska (materiał udostępniony za zgodą i wiedzą właściciela zwierzęcia)

6.2. Szczepy bakteryjne

- Szczep *Escherichia coli* BL RIL – *E. coli* B F – *ompT hsdS (rB – mB –) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam]*, Invitrogen, USA
- Szczep *Pyrococcus furiosus* DSM3638 - modelowy hipertermofilny archeon o optymalnej temperaturze wzrostu bliskiej 100°C, DSMZ, Niemcy

6.3. DNA bakteryjne i plazmidowe

- DNA *Mycobacterium bovis* – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
- Plazmid rekombinowany pBAD/NeqSSB – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Plazmid rekombinowany pBAD/Sso7d – kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- Wektor ekspresyjny pET-30 Ek/LIC – Novagen, USA

6.4. Komercyjne zestawy do izolacji/oczyszczania DNA genomowego, plazmidowego

- Zestaw do izolacji genomowego DNA z krwi, piór, wymazu, sierści, włosa - Sherlock AX, A&A Biotechnology, Polska
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA - GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific, USA
- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego – Gel-Out Concentrator, A&A Biotechnology, Polska

6.5. Zestaw do klonowania metodą Gibsona

- Zestaw do klonowania produktów PCR bez użycia ligazy DNA z wykorzystaniem metody Gibsona – OverLap Assembly, A&A Biotechnology, Polska

6.6. Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne wykorzystywane w inżynierii genetycznej w reakcjach trawienia DNA prezentuje Tabela 8 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabela 8. Spis enzymów restrykcyjnych wykorzystywanych w reakcjach trawienia.

Enzym restrykcyjny	Sekwencja rozpoznania	Bufor reakcyjny	Temperatura trawienia [°C]	Temperatura inaktywacji [°C]
<i>Bam</i> HI	5'...G↓GATCC ...3'	FastDigest Buffer	37	80
<i>Nde</i> I	5'...C↓ATATG...3'	FastDigest Buffer	37	65

6.7. Podłoża mikrobiologiczne i pożywki

6.7.1. Pożywka płynna LB (Lurii-Bertaniego)

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g

Składniki rozpuszczono w 1 l wody destylowanej i jałowiono w autoklawie (20 min, 1,5 atm, 121°C).

6.7.2. Pożywka stała LA

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g

Składniki rozpuszczono w 1 l wody destylowanej i jałowiono w autoklawie (20 min, 1,5 atm, 121°C).

6.7.3. Roztwory antybiotyków i odczynników do pracy z bakteriami

Skład podłoży był modyfikowany w zależności od wykonywanych analiz, poprzez dodatek odpowiednich antybiotyków, IPTG lub glukozy o niezmiennych, stężeniach końcowych podanych poniżej, których roztwory były poddane filtracji w celu zachowania jałowości:

- Kanamycyna [50 µg/ml]
- Chloramfenikol [50 µg/ml]
- IPTG [1 mM]
- Glukoza [0,2%]

6.8. Zestaw do oznaczania aktywności polimeraz DNA

Zestaw EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit – Biotium, USA

6.9. Startery

6.9.1. Startery do amplifikacji fuzyjnych form polimerazy DNA

W tabeli nr 9 zostały przedstawione startery wykorzystane do otrzymywania konstruktów DNA fuzyjnych form polimerazy DNA.

Tabela 9. Startery wykorzystywane do otrzymania zaprojektowanych fuzyjnych form polimerazy DNA.

Lp.	Nazwa	Sekwencja
1	pET30-Pfu-F1	5'at ^t ttg ^t tt ^a act ^t taagaaggagatataCATATGATTTTAGATGTGG ATTACATAACTGAAGAAG
2	Sso7d-L-Pfu-R1	5'TTTACTGTTGC ^{GTCGACCCCTCCGCTTCCGGATTTT} TTAATGTTAAGCCAGGAAGTTAG
3	Pfu-L-Sso7d-F2	5'TTAAAAAATCC ^{GGAAGCGGAGGGGTCGACGCAAC} AGTAAAGTTCAAGTACAAGGG
4	pET30-Sso7d-R2	5'gcaagctgtcgcagcgagctcgaattc ^{GGATCC} TTAATGGTGGTG GTGGTGGTG ^{TTTCTTTTGCTTTTCTAACATTTGTAGT} AGTTCT
5	pET30-Sso7d-F3	5'at ^t ttg ^t tt ^a act ^t taagaaggagatataCATATGGCAACAGTAAAG TTCAAGTACAAGGG
6	Pfu-L-Sso7d-R3	5'ACATCTAAAA ^{TGTCGACCCCTCCGCTTCCTTTCTTTT} GCTTTTCTAACATTTGTAGTAGTTCT
7	Sso7d-L-Pfu-F4	5'AGCAAAAGAAA ^{GGAAGCGGAGGGGTCGACATTTT} AGATGTGGATTACATAACTGAAGAAG

8	pET30-Pfu-R4	5'gcaagcttgcgacggagctcgaattcGGATCCTTAATGGTGGTG GTGGTGGTGGGATTTTTTAATGTAAAGCCAGGAAG TTAG
9	Sso7d-L-Sso7d-F5	5'AGCAAAGAAAAGGAGGGGTCGACATGATCGCAA CAGTAAAGTTCAAGTACAAGG
10	Sso7d-L-Sso7d-R5	5'TTACTGTTGCATCATGTTCGACCCCTCCTTTCTTTT GCTTTTCTAACATTTGTAGTAGTTCT
11	Sso7d-L-Pfu-F6	5'AGCAAAGAAAAGGAGGGGTCGACATGATCATTTT AGATGTGGATTACATAACTGAAGAAG
12	Pfu-L-Sso7d-R6	5'ACATCTAAAAATGATCATGTTCGACCCCTCCTTTCTTTT GCTTTTCTAACATTTGTAGTAGTTCT
13	NeqSSB-L-Pfu-F7	5'GAGAGGCCGATGGAGGGGTCGACATGATCATTTT AGATGTGGATTACATAACTGAAGAAG
14	Pfu-L-NeqSSB-R7	5'ACATCTAAAAATGATCATGTTCGACCCCTCCATCGGCC TCTCCTTTAAAAGCTTTTA
15	pET30-NeqSSB-F8	5'atTTgtttaactttaagaaggagatataCATATGGATGAAGAGGAA CTAATACAACATAATAAT

Na czerwonym oraz zielonym tle oznaczono sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych, odpowiednio *Bam*HI oraz *Nde*I

Na żółtym oraz fioletowym tle oznaczono sekwencje linkerów

Na niebieskim tle oznaczono sekwencje plazmidu pET-30 Ek/LIC

Na szarym tle oznaczono sekwencję domeny oligohistydynowej

Kolorami: zielonym/czerwonym/brązowym/granatowym/niebieskim oznaczono sekwencje komplementarne do genu

6.9.2. Startery do badania właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA

Tabela nr 10 prezentuje startery wykorzystane do charakterystyki uzyskanych fuzyjnych form polimerazy DNA.

Tabela 10. Startery wykorzystywane podczas testów otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA

Lp.	Nazwa	Sekwencja	Rodzaj badania
1.	pET_up	5'GATGCGTCCGCGTAGA	Weryfikacja sekwencji otrzymanych konstruktów DNA
2.	pET_ter	5'TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	
3.	L1	5'CAAGGCATCCACCGT	Analiza pozostałości genomowego DNA <i>E. coli</i> w preparatach białkowych
4.	G1	5'GAAGTCGTAACAAGG	

5.	P	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGC	Badanie procesywności
6.	pET_F	5'GATGCTGCTGGCTACCCTG	Test szybkości syntezy produktu o wielkości 1000 pz
7.	pET_R	5'TCAAGAACTCTGTAGCACCGC	
8.	HEMA1 F	5'TGCTTTCTGTGCCTTTTGCC	Test szybkości syntezy produktu o wielkości 500 pz
9.	HEMA1 R	5'TATCAGAACCACGCCACACC	
10.	DM2 F	5'AAGTCCATGTTCTTCCACTTTCTTG TG	Stosowane w reakcji PCR dla oznaczenia termostabilności, czułości, odporności na inhibitory, temperatury hybrydacji starterów, optymalizacja warunków reakcji PCR
11.	DM2 R	5'TTGAGGATTTTCAATGTTTAGGAGTAGC	
12.	TNS F	5'GTCCTACTTGGAGTGAAGTG	Test szybkości syntezy produktu o wielkości 300 pz
13.	TNS R	5'AGGACTTGTGGTACATCCAT	
14.	MH F	5'TGGTCCTGAACTGTATTGAC	Testy buforów komercyjnych
15.	MH R	5'CGTGCTTGCCAGGAGGG	
16.	DW F	5'GACCTGAAGAGCGCCTACA	Testy buforów komercyjnych
17.	DW R	5'CCGTGAAGGAGACGTCGG	
18.	WFFS F	5'CTCGTGGTAGTGCGTGAGTCGT	Reakcja PCR z dodatkiem psiej krwi pełnej EDTA jako inhibitorem
19.	WFFS R	5'TTGACCCCTGGGTCTTTGCTGG	
20.	MC15 F	5'ACTCCAGCATCACGGTTCTC	Test wydajności amplifikacji matryc bogatych w pary zasad GC
21.	MC15 R	5'GTTGGGCGATCCTCTGTG	
22.	Drd4a F	5'TTTGGGATCGCTCGCTTACC	Optymalizacja warunków reakcji PCR
23.	Drd4a R	5'ATGACAGGGGATGCTACAGC	
24.	T7prom	5' TAATACGACTCACTATAGGG	Potwierdzenie obecności insertu
25.	T7term	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

Temperatura topnienia powyższych starterów była ustalana za pomocą programu OligoAnalyzer.

6.9.3. Startery wykorzystane do oznaczania procesywności otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA

Tabela nr 11 prezentuje startery wykorzystywane do oznaczania procesywności badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA.

Tabela 11. Startery wykorzystywane do oznaczania procesywności – ustalanie temperatury topnienia produktów markerowych.

Nazwa	Sekwencja	Długość [nt]
T	5'TATCGGTCCATGAGACAAGCTTGCTTGCCAGCAGGTTCGACTCTAGAGGATCCCC	54
P1	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG	25
P2	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGG	26
P3	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGC	27
P4	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCA	28
P5	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAA	29
P6	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAG	30
P7	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGC	31
P8	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCA	32
P9	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAA	33
P10	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAG	34
P11	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGC	35
P12	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCT	36
P13	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTT	37
P14	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTG	38
P15	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGT	39
P16	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTC	40
P17	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCT	41
P18	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTC	42
P19	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCA	43
P20	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCAT	44
P21	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCATG	45
P22	5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTGGCAAGCAAGCTTGTCTCATGG	46

6.10. Łańcuchowa reakcja polimerazy

W szeregu reakcji PCR wykonanych na potrzeby realizacji niniejszej pracy wykorzystano różne bufony oraz odczynniki.

- bufony reakcyjne prezentuje tabela nr 12
- 50 mM chlorek magnezu – Thermo Fisher Scientific, USA
- Trifosforany deoksynukleozydów: 100 mM dATP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 100 mM dTTP – Thermo Fisher Scientific, USA
- Polimeraza DNA Phusion™, 2U/μl – Thermo Fisher Scientific, USA
- Woda jałowa DEPC (wolna od DNaz, RNaz) – EURx, Polska
- Startery (10 μM, rozcieńczenia w wodzie) – Microsynth, Szwajcaria/ Genomed, Polska/ Sigma, Niemcy [Mat. 6.9]

Tabela nr 12 zawiera spis komercyjnych buforów wykorzystywanych podczas reakcji PCR.

Tabela 12. Bufory reakcyjne testowane w prowadzonych reakcjach PCR

Nazwa buforu	Firma	Skład (1x)	pH (w 25°C)
10x Pfu EURx	EURx	15 mM MgCl ₂ pozostałe składniki i detergenty	8,0
10x Taq with KCl	Thermo Fisher Scientific	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl Detergent	8,8
10x Taq with (NH₄)₂SO₄	Thermo Fisher Scientific	75 mM Tris-HCl 20 mM KCl 0,01% Tween® 20	8,8
10x ThermoPol®	New England Biolabs	20 mM Tris-HCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM KCl 2 mM MgSO ₄ 0.1% Triton® X-100	8,8
10x TaqNova (NH₄)₂SO₄	BLIRT	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl 0,8% (v/v) Nonidet P40	8,8
10x TaqNova KCl	BLIRT	75 mM Tris-HCl 20 mM KCl 0,01% (v/v) Tween® 20	8,8
5x Q5	New England Biolabs	n.d.	9,3
5x Phusion HF	Thermo Fisher Scientific	n.d.	10,0
5x Phusion GC	Thermo Fisher Scientific	n.d.	10,0
5x OneTaq Standard	New England Biolabs	20 mM Tris-HCl 22 mM NH ₄ Cl 22 mM KCl 1,8 mM MgCl ₂ 0,06% IGEPAL® CA-630 0,05% Tween® 20	8,9
5x Platinum SuperFi II	Thermo Fisher Scientific	n.d.	n.d.
2x Marathon	A&A Biotechnology	5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris 40 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10% DMSO	9,0
10x phi29	Thermo Fisher Scientific	33 mM Tris-HCl 66 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 0.1% Tween®20 1mM DTT	7,9
10x Shark	BLIRT	200 mM Tris-HCl 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% Triton X-100	8,8

6.11. Odczynniki do analizy DNA w żelu agarozowym

- Agaroz – EURx, Polska
- Barwnik do barwienia kwasów nukleinowych SimplySafe – EURx, Polska
- Bromek etydyny 1 mg/ml – Sigma, Niemcy

Bufor TAE 50x stężony:

- EDTA 0,5 M – 100 ml
- Kwas octowy lodowaty – 57,1 ml
- Tris – 242 g
- Woda destylowana – do 1000 ml

pH buforu wynosiło 8,5

W celu przygotowania buforu TAE, bufor TAE 50x odpowiednio rozcieńczano z wykorzystaniem wody destylowanej:

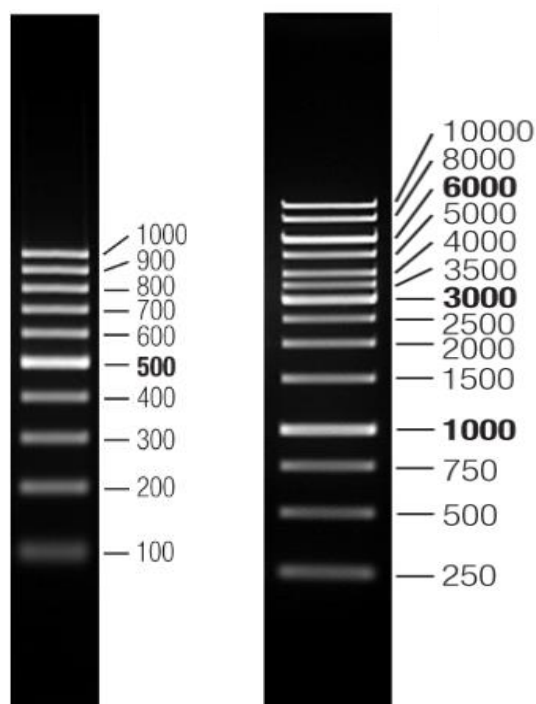
- bufor 50x TAE – 20 ml
- woda destylowana – 980 ml

Bufor obciążający, do nanoszenia próbek DNA:

- Ficoll 400 – 20%
- EDTA – 0,1 M
- Ksylen cyjanu – 0,25%

Markery wielkości DNA:

- Marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz – Thermo Fisher Scientific, nr kat. SM0241, USA
- Marker GeneRuler TM 250-10000: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz – Thermo Fisher Scientific, nr kat. SM0311, USA



Rysunek 8. Markery wielkości DNA [rysunek producenta]

6.12. Materiały do pracy z białkami

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

Żele poliakrylamidowe

Tabela 13. Skład stosowanych żeli poliakrylamidowych do rozdzielania białek metodą SDS-PAGE

Nazwa odczynnika	Żel rozdzielający (dolny) 12% Σ 10 ml	Żel zagęszczający (górny) 5% Σ 2 ml
Woda destylowana	3,3 ml	1,4 ml
30% roztwór akrylamidów	4 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	0,02 ml
10% APS	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	0,002 ml

Bufory i roztwory stosowane do elektroforezy SDS-PAGE

Bufor SDS-PAGE 10x stężony

- Glicyna – 144 g
- Tris – 30 g
- SDS – 10 g
- Woda destylowana do 1000 ml

W celu przygotowania buforu SDS-PAGE, bufor SDS-PAGE 10x odpowiednio rozcieńczano z wykorzystaniem wody destylowanej:

- bufor 10x SDS-PAGE – 100 ml
- woda destylowana – 900 ml

10% APS

- APS – 1 g
- Woda destylowana do 10 ml

10% SDS

- SDS – 1 g
- Woda destylowana do 10 ml

Roztwór barwiący Coomassie:

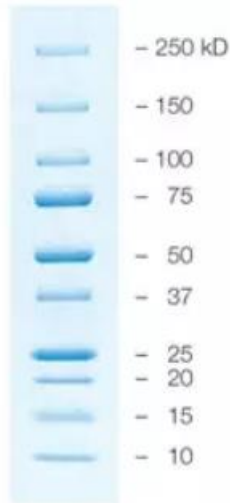
- Coomassie Brilliant Blue G-250 – 250 mg
- Metanol 100% – 50 ml
- Kwas octowy lodowaty – 10 ml
- Woda destylowana do 100 ml

Roztwór do nanoszenia próbek na żel 5x stężony:

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

Marker masy cząsteczkowej białek:

Marker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards 10-250 kDa: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa – Bio-Rad nr kat. #1610373, USA



Rysunek 9. Marker masy cząsteczkowej białek [rysunek producenta]

6.12.2. Bufory i roztwory do oczyszczania białek

1 M Tris pH 9

- Tris – 121,1 g
- Woda destylowana do 1000 ml

1 M KCl

- KCl – 74,55 g
- Woda destylowana do 1000 ml

4M imidazol

- Imidazol – 68,077 g
- Woda destylowana do 250 ml

Bufor A₀ do zawieszania lizatu komórkowego:

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

Bufor A do oczyszczania białek:

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

Bufor B do oczyszczania białek:

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

Bufor C do oczyszczania białek:

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

Bufor D do oczyszczania białek:

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

Bufor E do dializy białek przed zastosowaniem saltonazy:

- 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- 100 mM KCl

Bufor F do dializy po zastosowaniu saltonazy (przygotowanie do zabezpieczenia w buforze do przechowywania polimerazy DNA):

- 40 mM Tris-HCl pH 7,4
- 200 mM KCl

Bufor G do przechowywania polimerazy DNA:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,4
- 100 mM KCl
- 1 mM DTT
- 0,1 mM EDTA
- 1% Tween 20

- 1% Triton-X100
- 50% glicerol

Bufory do regeneracji złoza do oczyszczania białka metodą chromatografii metalopowinowactwa

- Bufor do regeneracji kolumny HisTrap™ (2% SDS + 0,5 M EDTA)
- 2% roztwór chlorku niklu
- 20% etanol

6.13. Materiały podstawowe

- Ezy jałowe – Googlab Scientific, USA
- Głaszczki jałowe – VWR, USA
- Kolby szklane o różnej pojemności: 20 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml i 2000 ml – Chemland, Polska
- Końcówki do pipet automatycznych – Sarstedt, Niemcy
- Krioprobówki 2 ml – Googlab Scientific, USA
- Parafilm – Bionovo, Polska
- Płytki Petriego – Googlab Scientific, USA
- Probówki typu Falcon 15 ml i 50 ml – Sarstedt, Niemcy
- Probówki typu Eppendorf 1,5 ml, 2 ml oraz 5 ml – Sarstedt, Niemcy
- Stripy probówki PCR 0,1 ml, 0,2 ml - Sarstedt, Niemcy/Avantor, USA
- Skalpel Swann Morton – Matopat, Polska
- Worek dializacyjny Nadir® – Roth, Niemcy

6.14. Aparatura

- Aparat do elektroforezy poziomej – Bio-Rad, USA
- Aparat do elektroforezy pionowej – Bio-Rad, USA
- Autoklaw – Tuttnauer, Polska
- Butle i kolby szklane – ChemLand, Polska
- Filtry wirówkowe Amicon Ultra-50 do zagęszczania białek – Milipore, USA
- Inkubator z wytrząsaniem New Brunswick Innova - Eppendorf, Niemcy
- Kolumna chromatograficzna HisTrap™ – GE Healthcare, USA
- Kuchenka mikrofalowa AMMF20M1I – Amica, Polska

- Kołyska laboratoryjna – Biosan, Polska
- Łaźnia ultradźwiękowa Elmasonic X-tra TT – VWR, USA
- Łaźnia wodna – Bionovo, Polska
- Mieszadło magnetyczne – ChemLand, Polska
- Mikrowirówka OHAUS Frontier™5515 – OHAUS, Szwajcaria
- Pehametr – Mettler-Toledo, Szwajcaria
- Pipety automatyczne Eppendorf Research Plus o pojemności: 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 0,5-5 ml – Eppendorf, Niemcy
- Sonikator SONIC-950 WT – MRC, Izrael
- Spektrofotometr NanoDrop 2000 – Thermo Fisher Scientific, USA
- Sterylizator UV – Bionovo, Polska
- Termoblok – Labnet International, USA
- Termocykler gradientowy Veriti 96-dołkowy – Thermo Fisher Scientific, USA
- Termocykler CFX Opus do real-time PCR – Bio-Rad, USA
- Termocykler QPCR thermal cycler NEOS-96/NEOS-48 – Linear, Hiszpania
- Transiluminator – Terra Universal, USA
- Transiluminator Dual LED Blue/White Light – Invitrogen, USA
- Waga precyzyjna WTC3000 – Radwag, Polska
- Wirówka Eppendorf Centrifuge 5920 R – Eppendorf, Niemcy
- Worteks V-32 – Biosan, Polska

6.15. Pozostałe odczynniki

- Ampicylina – Sigma, USA
- Barwnik fluorescencyjny EvaGreen – Jena Bioscience, Niemcy
- Chlorek sodu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek wapnia – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek potasu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Chlorek niklu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Diwodorofosforan sodu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- DTT – Sigma, USA
- EDTA – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Etanol 99,9% – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska

- Ekstrakt drożdżowy – Difco Laboratories, USA
- Heparyna – Sigma, USA
- Imidazol – Sigma, USA
- IPTG – Sigma, USA
- Kwas octowy – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Kwas chlorowodorowy – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Kwas fosforowy (V) – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Metanol 99,8% – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- Nadsiarczan (VI) amonu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska
- 30% roztwór akrylamidów Acrylamide/Bis Solution, 29:1 #1610156N – Bio-Rad, USA
- Oligo d(T)₇₆ – Sigma, USA
- Pepton – Difco Laboratories, USA
- SDS – Sigma, USA
- Saltonaza – A&A Biotechnology, Polska
- TEMED – Sigma, USA
- Tris – Sigma, USA
- Triton X-100 – Sigma, USA
- Tween 20 – Sigma, USA
- Wodorofosforan (V) sodu – Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska

7. Metody

7.1. Metody wykorzystywane do pracy z DNA

7.1.1. Izolacja genomowego DNA

W celu wyizolowania DNA genomowego z wymazu, sierści oraz krwi psa, włosów końskiego, piór oraz krwi gołębia został wykorzystany zestaw Sherlock AX firmy A&A Biotechnology [Mat. 6.4], zgodnie z zaleceniami zawartymi w protokole dołączonym przez producenta.

7.1.2. Izolacja plazmidowego DNA

W celu wyizolowania DNA plazmidowego wykorzystano zestaw GeneJET Plasmid Miniprep Kit firmy Thermo Fisher Scientific [Mat. 6.4.] postępując według zaleceń producenta.

7.1.3. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Do rozdzielania fragmentów DNA wykorzystano 1,5% lub 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe firmy EURx [Mat. 6.11]. Rozdział prowadzono w buforze 1x TAE [Mat. 6.11], w aparacie przeznaczonym do elektroforezy agarozowej [Mat. 6.14]. W zależności od przeprowadzonej analizy, do każdej studzienki nanoszono 5 lub 20 μl badanej próbki z dodatkiem 2,5 μl buforu obciążającego. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w czasie od 25 do 30 min pod napięciem 100 V. Wyniki obserwowano na transiluminatorze przy długości fali 302 nm lub z wykorzystaniem aparatu posiadającego źródło światła LED o długości fali 470 nm [Mat. 6.14].

7.1.4. Izolacja i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego

Izolacja DNA z wyciętych bloczków żelu agarozowego została przeprowadzona przy wykorzystaniu metody precypitacji DNA, rutynowo wykorzystywanej w laboratorium. Wycięte bloczki agarozowe zważono, a następnie włożono do zamrażarki. Kolejno rozdrobniono na parafilmie oraz nałożono na minikolumny. Wirowano do uzyskania maksymalnej ilości przesączu, który następnie przeniesiono do probówki typu Eppendorf. Sprawdzone objętość uzyskanego przesączu, a następnie dodano taką samą ilość 100% izopropanolu oraz 1/10 jego objętości octanu sodu o pH 6,8, a także 5 μl wzmacniacza precypitacji. Całość wymieszano i schowano do

zamrażarki niskotemperaturowej – 80°C na 10 min. Po tym czasie wirowano w schłodzonej wirówce (10 min, 10 000 rpm, 4°C). Po zakończeniu wirowania supernatant odrzucono, zwracając szczególną uwagę, żeby powstały niebieski osad (DNA) nie uległ odklejeniu od dna probówki. Następnie dodano 500 µl 70% etanolu i ponownie wirowano (5 min, 10 000 rpm). Supernatant odrzucono, a pozostały niebieski osad poddano suszeniu przez 10 min w temperaturze pokojowej (T_{pok}). Osad rozpuszczano w wodzie jałowej wolnej od nukleaz.

Zamiennie do metody precypitacji stosowanej w celu izolacji oraz oczyszczania DNA z żelu agarozowego korzystano z zestawu Gel-Out Concentrator firmy A&A Biotechnology [Mat. 6.4], postępując zgodnie z zaleceniami dołączonymi przez producenta.

Otrzymany w ten sposób materiał DNA zabezpieczono w temperaturze -20°C do czasu kolejnych analiz. Powyższy protokół wykorzystano także do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych.

7.1.5. Amplifikacja genów kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA

W celu otrzymania DNA insertu koniecznego do przeprowadzenia klonowania metodą Gibsona wykonano dwie niezależne reakcje PCR, które umożliwiły powstanie konstruktów plazmidowych: Ref1 Pfu-Sso7d, V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Pierwsza z reakcji (PCR 1) umożliwiła otrzymanie produktu PCR o sekwencji nukleotydowej genu kodującego białko wiążące DNA na N-końcu (Sso7d, NeqSSB) lub C-końcu (w zależności od konstrukt) z dodatkową sekwencją łącznika, a także komplementarną do początkowych nukleotydów genu kodującego polimerazę DNA. Produkt powstały w drugiej reakcji amplifikacji (PCR 2) zawierał sekwencję nukleotydową genu kodującego tylko polimerazę DNA lub polimerazę DNA wraz z drugim genem kodującym białko wiążącym DNA, ale umieszczonym na C-końcu, czyli Sso7d z dodatkowymi nukleotydami łącznika oraz nukleotydami komplementarnymi do końcowej sekwencji genu kodującego białko wiążące DNA na N-końcu. Matrycę DNA do reakcji PCR stanowiło wyizolowane DNA plazmidów rekombinowanych [Mat. 6.3] o stężeniu ok. 50 ng/µl. Poniżej zamieszczono tabele nr 14 i 15 (PCR1) oraz nr 16 i 17 (PCR2) przedstawiające składy wykorzystywanych w reakcji mieszanin oraz profile temperaturowo-czasowe dla przeprowadzanych reakcji PCR.

Tabela 14. Skład pierwszej mieszaniny reakcyjnej PCR – insert 1

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter X1 F [10 μM]	1
Starter Y1 R [10 μM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza Phusion™ [2U/μl]	0,2
Bufor reakcyjny 5x HF	4
H ₂ O jałowa	12,3
Matryca	1

Tabela 15. Profil temperaturowo-czasowy – insert 1

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	55	20
	72	X
1	72	300
1	4	∞

X – czas zależny od długości docelowego produktu PCR przy założeniu, że komercyjna polimeraza Phusion ma zdolność syntezy DNA 33,3 nt/s

Tabela 16. Skład drugiej mieszaniny reakcyjnej PCR – insert 2

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter X2 F [10 μM]	1
Starter Y2 R [10 μM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza Phusion™ [2U/μl]	0,2
Bufor reakcyjny 5x HF	4
H ₂ O jałowa	12,3
Matryca	1

Tabela 17. Profil temperaturowo-czasowy – insert 2

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	55	20
	72	X
1	72	300
1	4	∞

X – czas zależny od długości docelowego produktu PCR przy założeniu, że komercyjna polimeraza Phusion ma zdolność syntezy DNA 33,3 nt/s

7.1.6. Reakcje trawienia enzymami restrykcyjnymi

W celu przeprowadzenia reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi DNA plazmidu ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC zostało poddane działaniu enzymów restrykcyjnych *NdeI* oraz *BamHI* [Mat. 6.6]. Najpierw przygotowano mieszaninę, która zawierała tylko enzym *NdeI*, a następnie zawarte w niej DNA poddano reakcji trawienia przez 2 h w temperaturze 37°C. Następnie enzym *NdeI* inaktywowano w temperaturze 65°C przez 5 min. Do tak przygotowanych prób dodano enzym *BamHI*, a następnie ponownie przeprowadzono reakcję trawienia DNA przez 1 h w temperaturze 37°C. Po 1 h próbki umieszczono w termobloku nagrzanym do 80°C [Mat. 6.14] co umożliwiło przeprowadzenie inaktywacji enzymu *BamHI*. W tabeli nr 18 przedstawiono skład mieszaniny stosowanej podczas trawienia enzymami restrykcyjnymi.

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia enzymami restrykcyjnymi

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
DNA plazmidowe [100 ng/μl]	2
10x Bufor FastDigest	2
<i>NdeI</i>	1
<i>BamHI</i> *	1
Woda jałowa	5

* dodawany dopiero po inaktywacji *NdeI*

Tak przygotowany plazmid ekspresyjny pET-30 Ek/LIC po reakcji trawienia DNA nanoszono na żel, a z wyciętych prążków żelu oczyszczano DNA techniką precypitacji [Met. 7.1.4].

7.1.7. Konstrukcja fuzyjnych form polimerazy DNA przy użyciu reakcji Gibsona

Produkty PCR otrzymane w wyniku amplifikacji genów kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA (PCR1, PCR2) [Met. 7.1.5] oraz potrawione enzymami DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC [Met. 7.1.6] posłużyły jako DNA insertów w reakcji Gibsona z wykorzystaniem zestawu OverLap Assembly firmy A&A Biotechnology [Mat. 6.5]. Reakcję Gibsona prowadzono w termocyklerze w 50°C przez 60 min. Mieszaninę do reakcji przygotowano zgodnie z wytycznymi producenta.

W tabeli nr 19 przedstawiono przykładowe obliczenia dla przygotowania reakcji Gibsona, natomiast tabela 20 zawiera skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji Gibsona.

Przeliczenie stężeń/ilości DNA na reakcję:

$$\text{Ilość pz} \times 0,065 = \text{ilość ng/reakcję}$$

Tabela 19. Przeliczanie ilości składników do reakcji Gibsona na przykładzie wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d fuzyjnej formy polimerazy DNA

Skrócony zapis		A	B	A:B
Nazwa DNA	Wielkość [pz]	Ilość ng/reakcję (nt x 0,065)	Stężenie po precypitacji [ng/μl]	Przeliczenia do zestawu OverLap Assembly
Wektor	5439	353,53	62,5	4,82
Insert1	213	13,8	62,6	0,23
Insert2	2541	165	96,4	1,98

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji Gibsona

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
5x bufor OverLap	4
dNTPs	2
Wektor	4,8
Insert 1	0,25
Insert 2	2
Woda jałowa	5
Enzym Mix	2

Po reakcji Gibsona 10 μl mieszaniny dodano do 100 μl komórek kompetentnych *Escherichia coli* DH5α.
 Insert 1 – produkt PCR otrzymany w wyniku amplifikacji genów kodujących wybrane białko wiążące DNA
 Insert 2 – produkt PCR otrzymany w wyniku amplifikacji genów kodujących polimerazę Pfu lub Pfu z białkiem wiążącym DNA
 Wektor – DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC po trawieniu enzymami *NdeI* oraz *BamHI*

7.2. Hodowle bakteryjne

7.2.1. Hodowle na podłożu stałym

Po przeprowadzeniu reakcji Gibson Assembly [Mat. 6.5, Met. 7.1.7], otrzymaną mieszaninę wykorzystano do transformacji komórek *E. coli* DH5α, a następnie wysiano na wcześniej przygotowane podłoże stałe LA z dodatkiem antybiotyku o odpowiednim stężeniu, w tym wypadku kanamycyny [50 μg/ml] oraz 0,2% glukozy [Mat. 6.7]. Komórki szczepu *E. coli* BL RIL wysiewano na płytki z dodatkiem kanamycyny [50 μg/ml] oraz chloramfenikolu [50 μg/ml] [Mat. 6.7]. Wysiane płytki inkubowano

w cieplarni przez ok. 16 h w 37°C, a następnie przechowywano w lodówce w 4°C, do momentu wykonywania dalszych analiz.

7.2.2. Hodowle w pożywce płynnej

W celu przygotowania komórek kompetentnych *E. coli* DH5α hodowle płynne w pożywce LB prowadzono bez dodatku antybiotyku. Natomiast do przygotowania komórek *E. coli* BL RIL hodowle płynne były prowadzone z dodatkiem chloramfenikolu [50 µg/ml] [Mat. 6.7]. Hodowle prowadzono w inkubatorze z wytrząsaniem 250 rpm przez 16 h w temperaturze 37°C.

Hodowle w pożywce płynnej z wybranymi po transformacji klonami prowadzono z dodatkiem kanamycyny [50 µg/ml] oraz 0,2% glukozy dla komórek *E. coli* DH5α, natomiast dla szczepów *E. coli* BL RIL z dodatkiem kanamycyny [50 µg/ml] oraz chloramfenikolu [50 µg/ml] w temperaturze 37°C przez ok. 16 h. Wybrane kolonie pobierano za pomocą jałowej jednorazowej ezy [Mat. 6.7, 6.13].

7.2.3. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*

W celu przygotowania komórek kompetentnych, komórki *E. coli* DH5α lub *E. coli* BL RIL zaszczerpiono w 2 ml pożywki płynnej LB odpowiednio DH5α bez dodatku antybiotyków oraz w przypadku BL RIL z dodatkiem chloramfenikolu [50 µg/ml] [Mat. 6.7]. Do przygotowania nowych partii komórek kompetentnych posłużono się komórkami kompetentnymi przechowywanymi w zamrażarce niskotemperaturowej -80°C. Pierwszym etapem było zaszczerpienie hodowli nocnej, którą prowadzono w wytrząsarce przy 250 rpm przez 16 h w 37°C. Po nocy hodowle odmłodzono w 250 ml LB (z dodatkiem antybiotyku lub bez zależnie od wybranych komórek kompetentnych) oraz prowadzono hodowlę do osiągnięcia $OD_{600} = 0,5$. Otrzymaną hodowlę zwirowano (10 min, 5000 rpm, 4°C), supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 50 ml zimnego 100 mM chlorku wapnia [Mat. 6.15]. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano w lodówce w temperaturze 4°C przez 16 h i ponownie zwirowano (5 min, 2500 rpm, 4°C), a otrzymany osad zawieszono w 10 ml 100 mM schłodzonego chlorku wapnia. Tak przygotowane komórki kompetentne przechowywano przez 24 godziny w lodówce, a następnie ponownie zwirowano (5 min, 2500 rpm, 4°C). Po wirowaniu supernatant odrzucono, a otrzymany osad zawieszono w 2 ml zimnego chlorku wapnia z dodatkiem 15% glicerolu. Komórki porcjowano po 100 µl do jałowych probówek typu Eppendorf, [Mat. 6.13], a następnie niezwłocznie umieszczono w zamrażarce

niskotemperaturowej -80°C do momentu wykonywania dalszych analiz.

7.2.4. Transformacja komórek *E. coli* rekombinowanym DNA

W celu przeprowadzenia transformacji komórek *E. coli* rekombinowanym DNA, mieszaninę po reakcji Gibsona (lub wyizolowane DNA plazmidów rekombinowanych dla wybranego klonu) [Mat. 6.5] dodano do 100 μl komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α (lub *E. coli* BL RIL w przypadku przygotowania do nadprodukcji białka). Otrzymaną mieszaninę inkubowano w lodzie przez 60 min. Po inkubacji przeprowadzono szok ultradźwiękami polegający na umieszczeniu mieszaniny na 10 s w łaźni ultradźwiękowej o mocy 40 kHz [Mat. 6.14], pamiętając o odpowiednim umieszczeniu próbówki typu Eppendorf w wodzie wypełniającej łaźnię ultradźwiękową. Następnie po wyjęciu z łaźni, mieszaninę inkubowano przez 3 min w lodzie, kolejno dodając 500 μl pożywki płynnej SOC (dołączona do zestawu OverLap Assembly) [Mat. 6.5]. Mieszaninę z pożywką inkubowano w cieplarni z wytrząsaniem [Mat. 6.14] w temperaturze 37°C przez 45 min, 350 rpm. Po tym etapie mieszaninę zwirowano (5 min w temperaturze pokojowej, 5000 rpm), odrzucono 400 μl uzyskanego przesącza, a osad zawieszono w pozostałej ilości supernatantu i wysiano na podłoże stałe LA z dodatkiem kanamycyny [50 $\mu\text{g}/\text{ml}$] i 0,2% glukozy lub kanamycyny [50 $\mu\text{g}/\text{ml}$] i chloramfenikolu [50 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. Płytki inkubowano w cieplarni przez 16 h w 37°C [Met. 7.2.1].

7.3. Sprawdzenie obecności DNA insertu

W celu sprawdzenia obecności oczekiwanego DNA insertu przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem kolonii bakteryjnych jako matrycy (kolonie wyrosłe na płytce po klonowaniu), tzw. PCR kolonijny (skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 21 i 22). Obecność produktów PCR sprawdzono w żelu agarozowym [Mat.6.11]. Wyizolowane DNA wybranych klonów poddano sekwencjonowaniu w firmie Genomed (Polska) [Met. 7.10] przy użyciu starterów pET_up i pET_ter [Mat. 6.9.2] w celu wykluczenia mutacji. Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu SnapGene Viewer oraz Clustal Omega [Met. 7.11]. W celu zsekwencjonowania całego konstruktu dodatkowo zaprojektowano parę starterów komplementarną do wewnętrznej sekwencji DNA konstruktu. Zaprojektowane startery przekazano bezpośrednio do pracowni sekwencjonowania.

Tabela 21. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μ l]
Starter T7 prom F [10 μ M]	0,75
Starter T7 term R [10 μ M]	0,75
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza Phusion TM [2U/ μ l]	0,2
Bufor reakcyjny 5x HF	4
H ₂ O jałowa	13,8
Matryca	*

* w mieszaninie reakcyjnej PCR zanurzano czę z pobraną kolonią, wcześniej przesianą na płytkę z podłożem stałym LA

Tabela 22. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	55	20
	72	X
1	72	300
1	4	∞

X – czas zależny od długości docelowego produktu PCR, przy założeniu, że komercyjna polimeraza Phusion ma zdolność syntezy DNA 33,3 nt/s

7.4. Ekspresja genów kodujących białka fuzyjne

7.4.1. Warunki ekspresji genów kodujących białka fuzyjne

W celu optymalizacji warunków ekspresji genów kodujących białka fuzyjne, przeprowadzono produkcję polimeraz DNA na mniejszą skalę (20 ml). Pożywkę płynną LB o objętości 20 ml z dodatkiem kanamycyny [50 μ g/ml] oraz chloramfenikolu [50 μ g/ml] [Mat. 6.7] zaszczepiono kolonią wyrosłą po transformacji komórek *E. coli* BL RIL. Hodowlę prowadzono w cieplarni z wytrząsaniem (250 rpm) przez 16 h w 37°C. Następnie hodowlę odmłodzono poprzez dodanie 1 ml uzyskanej hodowli nocnej do 100 ml pożywki płynnej LB z dodatkiem kanamycyny [50 μ g/ml] oraz chloramfenikolu [50 μ g/ml] [Mat. 6.7] i prowadzono do momentu osiągnięcia OD₆₀₀ = 0,5, po czym dodano IPTG do końcowego stężenia 1mM [Mat. 6.7].

Sprawdzenie najlepszych warunków produkcji polegało na pobieraniu próbki białka w różnych odstępach czasowych (1,5 h, 3 h, 6 h oraz 16 h) od momentu indukcji 1 mM IPTG [Mat. 6.7], z wykorzystaniem różnych szczepów ekspresyjnych *E. coli* (pLys S, BL RIL LEMO21). Pobrane próbki zwirowano, zawieszono w 100 μ l buforu TE

[Mat. 6.15]. Przygotowane próbki denaturowano, a następnie наносzono na wcześniej przygotowany żel poliakrylamidowy i prowadzono elektroforezę w buforze SDS-PAGE [Met. 7.5]. Po zakończeniu elektroforezy żel barwiono z wykorzystaniem roztworu Coomassie [Mat. 7.5].

Optymalizacja warunków ekspresji białek w skali 20 ml pozwoliła na ustalenie warunków produkcji białka na większą skalę (1000 ml pożywki płynnej LB). 20 ml pożywki płynnej LB z dodatkiem kanamycyny [50 µg/ml] oraz chloramfenikolu [50 µg/ml] [Mat. 6.7] zaszczepiono szczepem *E. coli* BL RIL [Mat. 6.2], zawierającym odpowiedni plazmid rekombinowany. Hodowlę nocną prowadzono w cieplarni z wytrząsaniem 250 rpm przez ok. 16 h w 37°C. Następnie hodowlę odmłodzono w 1000 ml LB z dodatkiem kanamycyny [50 µg/ml] oraz chloramfenikolu [50 µg/ml] [Mat. 6.7] i prowadzono w 37°C do momentu osiągnięcia $OD_{600} = 0,5$ i przeprowadzono indukcję 1 mM IPTG [Mat. 6.7]. Po 3 h od indukcji prowadzone hodowle bakteryjne zwirowano (10 min, 5000 rpm), a otrzymany w ten sposób osad bakteryjny umieszczono w temperaturze -20°C, do momentu przeprowadzenia dalszych analiz.

7.5. Metody do pracy z białkami

7.5.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

W celu przygotowania żelu poliakrylamidowego, oczyszczono szyby, między które wylano najpierw 12% żel rozdzielający, a następnie 5% żelu zagęszczający [Mat. 6.12]. Między szybami zostały umieszczone grzebienie w celu uformowania studzienek. Wymagany czas polimeryzacji wynosił 40 min zarówno dla żelu rozdzielającego, jak i zagęszczającego. Spolimeryzowany żel umieszczano w aparacie wypełnionym buforem SDS-PAGE. Po umieszczeniu żelu w aparacie do elektroforezy, a następnie wyciągnięciu grzebienia, наносzono próbki, które wcześniej poddano denaturacji [Met. 7.5.2].

7.5.2. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE

Do przygotowania próbek do elektroforezy białkowej, pobierano 1 ml hodowli bakteryjnej, wirowano (5 min, 5000 rpm), a następnie osad powstały po zwirowaniu zawieszano w objętości 100 µl buforu TE. Do uzyskanej w ten sposób próbki, po odporcjowaniu 20 µl dodano 5 µl buforu 5x Laemmli [Mat. 6.12] oraz przeprowadzano

denaturację w termobloku (10 min, 95°C). Próbkę nanoszono na żel, a następnie rozdzielano. Rozdział prowadzono przez 90 min pod napięciem 160 V.

7.5.3. Barwienie i odbarwianie żeli poliakrylamidowych

W celu wybarwienia żeli poliakrylamidowych, po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, żełe znajdujące się pomiędzy szymbami wyjmowano, a następnie dokładnie płukano w wodzie. Tak przygotowane żełe umieszczano na maksymalnie 1 min w świeżo przygotowanym roztworze barwiącym Coomassie [Mat. 6.12]. Żele odbarwiano poprzez trzykrotne gotowanie w wodzie destylowanej (3 x 5 min) z wykorzystaniem kuchenki mikrofalowej [Mat. 6.14].

7.6. Oczyszczanie fuzyjnych polimeraz DNA z użyciem chromatografii metalopowinowactwa

W celu oczyszczenia otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA przygotowano kolumny ze złożem His-Trap (GE Healthcare) [Mat. 6.14] Objętość wykorzystanego złoża (CV) wynosiła 5 ml.

Na oczyszczenie każdego z wariantów fuzyjnych polimeraz DNA składało się kilka następujących po sobie etapów:

- 1) Otrzymany po zwirowaniu osad hodowli bakteryjnej rozpipetowano w 25 ml buforu A₀ [Mat. 6.12.2], a następnie poddano go sonikacji [Mat. 6.14] w lodzie, zwracając uwagę na umieszczanie sondy, unikając przegrzewania oraz spieniania supernatantu (40% mocy, 2 cykle po 5 min 2 s pulse on, 2 s pulse off).
- 2) Uzyskany w ten sposób lizat komórkowy poddano wirowaniu przez 20 min, 12 000 rpm.
- 3) Supernatant przeniesiono do jałowej probówki typu Falcon o objętości 50 ml i poddano termicznej denaturacji, przy wykorzystaniu łaźni wodnej - 15 min, 80°C, by pozbyć się termolabilnych białek *E. coli*. Następnie pozbyto się zdenaturowanych białek poprzez wirowanie przez 20 min, 12 000 rpm.
- 4) Uzyskany supernatant naniesiono na kolumnę z wcześniej przygotowanym przez zrównoważenie złożem poprzez przemycie 10 CV wody jałowej i 10 CV buforu A [Mat. 6.12.2].
- 5) Dodano 10 CV buforu A [Mat. 6.12.2], aby odmyć z niego niezwiązane białka.

- 6) Docelowe białka eluowano 6 CV odpowiednim buforem: B (V1 Pfu-Sso7d-Sso7 oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d), C (V2 Sso7d-Pfu-Sso7d) lub E (Ref1 Pfu-Sso7d), zależnie od oczyszczanego wariantu fuzyjnej polimerazy DNA [Mat. 6.12.2].
- 7) Frakcje po elucji zebrano, a następnie przeprowadzono elektroforezę w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE [Met. 7.5].
- 8) Zebrane frakcje zostały poddane dializie przez 24 h (bufor E) przed trawieniem pozostałości genomowego DNA *E. coli* z wykorzystaniem saltonazy [Met. 6.15].
- 9) Po zakończeniu procesu oczyszczania złoże His-Trap poddano regeneracji 5 CV buforu zawierającego 2% SDS i 50 mM EDTA [Mat. 6.12.2] następnie przemywano 5 CV wody destylowanej.
- 10) Ostatnim etapem było nanoszenie na złoże 2 CV roztworu chlorku niklu i przemycie go 5 CV wody destylowanej.
- 11) Zregenerowane złoże zabezpieczono w 20% roztworze etanolu do momentu dalszych analiz.

7.7. Usuwanie DNA z preparatów białkowych, dializa oczyszczonych preparatów białkowych, zagęszczanie oraz badanie w preparatach fuzyjnej polimerazy DNA pozostałości kwasów nukleinowych *E. coli* metodą elektroforetyczną

W celu usunięcia śladowych ilości bakteryjnego DNA, preparaty białkowe uzyskane po oczyszczaniu z użyciem metody chromatografii metalopowinowactwa poddano działaniu saltonazy [Mat. 6.15] (dodawano 0,5 μ l saltonazy na 5 ml frakcji preparatu białkowego). Po dodaniu nukleazy inkubowano fuzyjną formę polimerazy DNA przez 1 h w 37°C, a następnie umieszczano preparat w łaźni wodnej [Mat. 6.14] o temperaturze 90°C na 15 min, w celu inaktywacji termicznej saltonazy. Po tym etapie przeprowadzono dializę preparatu białkowego przez 24 h w buforze F [Mat. 6.12.2]. Po dializie białko zateżano z wykorzystaniem koncentratora Millipore [Mat. 6.14] o punkcie odcięcia 50 kDa. Do tak otrzymanego preparatu dodawano glicerol, a także pozostałe składniki [Mat. 6.12.2] i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania dalszych analiz.

7.8. Charakterystyka otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

W tym rozdziale przedstawiono metody wykorzystane do charakterystyki molekularnej otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Prowadzone analizy opierały się na szeroko rozumianej technice PCR. W tabeli nr 23 podano przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej, który podlegał modyfikacjom (ilość dodawanych odczynników, startery, matryce czy bufony reakcyjne) [Mat. 6.9, 6.10] w zależności od prowadzonych eksperymentów. Tabela nr 24 określa przykładowy profil temperaturowo-czasowy stosowany w przeprowadzonych reakcjach PCR, modyfikowany w zależności od specyfiki wykorzystywanego układu. Jeśli nie uwzględniono informacji o objętości to objętość końcowa stosowanych reakcji PCR w większości wynosiła 20 μ l.

Tabela 23. Przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej
Starter X F [10 μ M]
Starter X R [10 μ M]
dNTPs [8 mM]
Polimeraza DNA [1 U/ μ l]
Bufor reakcyjny
H ₂ O jałowa
Matryca

X – startery wykorzystywane w konkretnej reakcji PCR, zależne od prowadzonego eksperymentu

Tabela 24. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy wykorzystywany w reakcjach PCR

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]	Nazwa etapu
1	98	30	Denaturacja wstępna
35	98	10	Denaturacja
	Z	20	Przylączenie starterów
	72	Y	Elongacja
1	72	300	Wydłużanie końcowe
1	4	∞	Chłodzenie

Y – czas zależny od wielkości produktów PCR oraz szybkości syntezy DNA

Z – temperatura adekwatna do obliczonej dla stosowanych starterów

7.8.1. Analiza pozostałości genomowego DNA *E. coli* w fuzyjnych formach polimerazy DNA

Celem sprawdzenia w otrzymanych preparatach białkowych pozostałości genomowego DNA *E. coli* przygotowano po 20 μ l próbek otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA przed oraz po trawieniu saltonazą [Mat. 6.14, Met. 7.7]. Próbki nanoszono na 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe, a rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 100 V, przez 25 min [Mat. 6.11, Met. 7.1.3].

Ponadto wykorzystano dokładniejszą oraz zdecydowanie czulszą metodę oznaczenia pozostałości genomowego DNA *E. coli*. Polegała ona na przeprowadzeniu reakcji PCR (skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 25 i 26) z wykorzystaniem starterów L1 oraz G1 (oczekiwana wielkość produktu 500 pz) [Mat. 6.9.2]. Zastosowane startery pozwoliły na amplifikację DNA pochodzącego z regionu 16S-23S rDNA *E. coli*. Kontrolą ujemną wykonanej reakcji PCR były próbki z komercyjną polimerazą PhusionTM [2 U/ μ l] (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10]. Kontrolę dodatnią stanowiła próbka z dodatkiem genomowego DNA *E. coli* o stężeniu 50 ng/ μ l.

Tabela 25. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter L1 [10 μ M]	1
Starter G2 [10 μ M]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza DNA	1
Bufor reakcyjny A lub B**	4
H ₂ O jałowa	11,5
DNA *	1

* do badanych fuzyjnych form polimerazy DNA nie dodawano genomowego DNA *E. coli*, wyjątek stanowiła kontrola, gdzie matrycę stanowiło genomowe DNA *E. coli* o stężeniu 50 ng/ μ l,

** Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 26. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	56	20
	72	15
1	72	300
1	4	∞

7.8.2. Określenie optymalnych warunków amplifikacji DNA przez fuzyjne formy polimerazy DNA

Do określenia optymalnych warunków działania fuzyjnych form polimerazy DNA wykorzystano dostępne komercyjnie bufony o różnych zakresach pH [Mat. 6.10], a następnie dobrano odpowiednie stężenie poszczególnych soli dodając roztwory zawierające jony: Mg^{2+} w zakresie od 0 do 7 mM, KCl (w zakresie: 0-70 mM) oraz $(NH_4)_2SO_4$ (w zakresie 0-70 mM) [Mat. 6.15]. Do reakcji PCR (skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 27 i 28) wykorzystano różne ilości otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA (od 1 μ l do 0,4 μ l), tak by możliwie jak najlepiej określić wydajną amplifikację DNA. Po wstępnym ustaleniu odpowiedniej ilości badanej fuzyjnej polimerazy DNA przystąpiono do testów odpowiednich zakresów stężeń w/w soli. Ostatnim etapem było sprawdzenie szerokiej puli buforów komercyjnych, które ze względu na różnorodne pH pozwoliły na oszacowanie zakresu pH, w którym działają otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Do testów wykorzystano startery DM2 F/DM2 R (oczekiwana wielkość produktu PCR to 294 pz) oraz Drd4a F/Drd4a R (oczekiwana wielkość produktu to 194 pz) [Mat. 6.9.2]. Matrycami dla prowadzonych reakcji było genomowe DNA psie wyizolowane z krwi pełnej o stężeniu ok. 50 ng/ μ l oraz genomowe DNA gołębia wyizolowane z kropli krwi, również o stężeniu ok. 50 ng/ μ l. Genomowe DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu Sherlock AX [Mat. 6.4, Met. 7.1.1]. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 100 V, przez 25 min [Met. 7.1.3].

Tabela 27. Mieszanina reakcyjna PCR – wybór optymalnego buforu.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter DM2 F/Drd4a F [10 μM]	1
Starter DM2 R/Drd4a R [10 μM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza DNA	1
Bufor reakcyjny *	X
H ₂ O jałowa	Y
Matryca	1

X – testowano różne bufony komercyjne, które były 10x, 5x oraz 2x stężone [Mat. 6. 10]

Y – ilość dodawanej wody jałowej była uzależniona od ilości buforu reakcyjnego

Tabela 28. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	65	30
	72	Z
1	72	300
1	4	∞

Z – czas zależny od stosowanych starterów DM2 – 9 s, natomiast Drd4a – 6 s

Wyniki analizowano przy użyciu programu GelAnalyzer [Met. 7.11] i przedstawiono je w formie wykresów.

7.8.3. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

W celu określenia liczby jednostek aktywności [U/μl] badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano komercyjny zestaw EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit firmy Biotium [Mat. 6.8]. Wybrany zestaw umożliwia oznaczenie jednostek aktywności poszczególnych preparatów przez badanie zależności poziomu fluorescencji barwnika EvaGreen [Mat. 6.15] od czasu trwania reakcji. Reakcję przeprowadzono w warunkach izotermicznych w temperaturze 72°C, która jest optymalna dla działania komercyjnej polimerazy Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat.6.10]. Reakcja została przeprowadzona w aparacie umożliwiającym prowadzenie reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), natomiast skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 29 i 30.

Pierwszym etapem było wykonanie analizy z wykorzystaniem komercyjnej polimerazy DNA Phusion. Pozwoliło to na wyznaczenie krzywej standardowej, która jest

wyznacznikiem wyboru odpowiedniego rozcieńczenia dla badanych preparatów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA.

Zgodnie z wytycznymi firmy Biotium, głównym zadaniem było sporządzenie wykresu zależności sygnału fluorescencji od czasu trwania reakcji dla każdego z rozcieńczeń analizowanych wariantów białek, a następnie na podstawie krzywej standardowej wybranie odpowiedniego rozcieńczenia fuzyjnej formy polimerazy DNA. Istotnym elementem przeprowadzonych optymalizacji było odpowiednie pierwsze rozcieńczenie badanych preparatów. Po ustaleniu tego rozcieńczenia, które określono jako wyjściowe, do dalszych etapów analizy, wykonano seryjne dwukrotne rozcieńczenia fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Tak przygotowane próbki umieszczono w aparacie do analizy real-time PCR [Mat. 6.14, tabela 29, 30]. Uzyskane pomiary pozwoliły na przygotowanie wykresów, gdzie dla każdej z uzyskanych krzywych wyznaczono styczne. Dalsze obliczenia pozwoliły na wybór krzywej (odpowiadającej rozcieńczeniu), która mieści się w zakresie stężeń przygotowanej krzywej standardowej. Dalsze obliczenia posłużyły do wyznaczenia liczby jednostek aktywności fuzyjnej formy polimerazy DNA. Wyznaczenie maksymalnej różnicy poziomu fluorescencji (ΔF_{\max}), przedstawione zostało na rysunku nr 10.

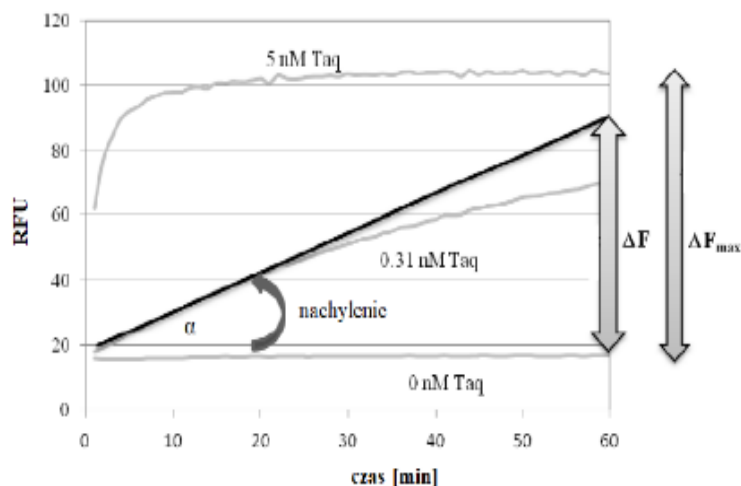
Tabela 29. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μ l]
Polimeraza DNA*	1/0,5/0,25.../0,0075
2x EvaEZ Polymerase Activity	7,5
H ₂ O jałowa	x

* Zastosowano seryjne dwukrotne rozcieńczenia stężenia wyjściowego badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Tabela 30. Profil temperaturowo-czasowy stosowanej reakcji izotermicznej

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



Rysunek 10. Wykres zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji

Na rysunku nr 10 zaznaczono kąt nachylenia krzywej ($\text{tg}\alpha$), różnicę fluorescencji krzywej, która jest styczną do krzywej wybranego stężenia (ΔF) oraz maksymalną różnicę fluorescencji (ΔF_{max}) dla punktu wysycenia na krzywej. Rysunek firmy Biotium z instrukcji do zestawu [Mat. 6.8].

$\Delta F = \text{tg}\alpha \times t$, gdzie, $\text{tg}\alpha$ – nachylenie krzywej, wyznaczone na podstawie wybranej stycznej [RFU/min], t – czas [min], $t = 30$ min

ΔF_{max} – maksymalna różnica fluorescencji, przy czym pod uwagę jest brany punkt wysycenia na krzywej (tzw. *plateau*)

$n = \frac{\Delta F}{\Delta F_{\text{max}}} \times 0,2025 \text{ nmol}$ (ilość moli przeliczona ze względu na objętość prowadzonej reakcji, która została zmieniona z 20 μl na 15 μl)

$u = n \times \frac{1}{N}$, gdzie u to liczba jednostek aktywności badanej fuzyjnej formy polimerazy DNA, N – 10 nmol nukleotydów

Wymienione wartości wynikają bezpośrednio z definicji jednostkowości, która brzmi następująco:

1 jednostka aktywności polimerazy [1U] to ilość polimerazy DNA, która jest w stanie inkorporować 10 nmol nukleotydów w czasie 30 min w jej optymalnej temperaturze działania [130].

7.9. Testy fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

7.9.1. Minimalna ilość jednostek fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w reakcji

W celu wyznaczenia minimalnej ilości jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, która wciąż pozwala na wydajne amplifikowanie DNA przeprowadzono reakcję PCR (skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 31 i 32). Pierwszym krokiem było przygotowanie podwójnych seryjnych rozcieńczeń każdej z badanych fuzyjnych form polimerazy DNA, a następnie wyniki sprawdzano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]. Rozdział prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R, gdzie oczekiwana wielkość produktu PCR wynosi 294 pz [Mat. 6.9.2]. Matrycą było genomowe psie DNA o stężeniu 30 ng/ μ l, wyizolowane z krwi zwierzęcia [Mat. 6.1].

Tabela 31. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μ l]
Starter DM2 F [10 μ M]	1
Starter DM2 R [10 μ M]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza DNA*	1
Bufor reakcyjny A lub B**	4
H ₂ O jałowa	11,5
Matryca	1

* Zastosowano seryjne dwukrotne rozcieńczenia badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, gdzie stężeniem wyjściowym dla każdego z wariantów była 1 U.

** Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 32. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	65	30
	72	9
1	72	300
1	4	∞

7.9.2. Określenie termostabilności i stabilności w temperaturze pokojowej fuzyjnych form polimerazy DNA

W celu określenia termostabilności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano metodykę opracowaną przez Dąbrowskiego i Kura [33]. Każdą z otrzymanych polimeraz inkubowano w termocyklerze [Mat. 6.14] w temperaturze 99°C i 95°C, pobierając próbki w czasie od $t_1 = 0$ min do $t_{13} = 60$ min. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie reakcji real-time PCR z wykorzystaniem inkubowanych fuzyjnych polimeraz DNA z dodatkiem barwnika EvaGreen. Zmiany termostabilności określono na podstawie wydajności powstawania produktu o ustalonej temperaturze topnienia. Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2]. Matrycą było genomowe psie DNA o stężeniu 30 ng/ μ l, wyizolowane z krwi zwierzęcia [Mat. 6.1]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 33 i 34. Wyniki przedstawiono w formie wykresów.

W celu dokładnego oznaczenia czasu półtrwania otrzymanych konstruktów, czas inkubacji dla temperatur 99°C i 95°C został wydłużony do 3 h inkubacji. Ostatnim elementem była weryfikacja zmian aktywności poprzez inkubację fuzyjnych form polimerazy DNA w temperaturze pokojowej do 72 h. Następnie ponownie przeprowadzono reakcję real-time PCR z dodatkiem barwnika EvaGreen (tabela 33, 34). Zmiany termostabilności określono na podstawie wydajności powstawania produktu o ustalonej temperaturze topnienia. Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R, temperatura topnienia produktu wynosiła 85°C. Matrycą było genomowe DNA psie o stężeniu 30 ng/ μ l, wyizolowane z krwi. Wyniki ponownie przedstawiono w formie wykresów.

Tabela 33. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μ l]
Starter DM2 F [10 μ M]	1
Starter DM2 R [10 μ M]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza [1 U/ μ l]*	1
Bufor reakcyjny A lub B**	4
H ₂ O jałowa	11,2
Matryca	1
Barwnik EvaGreen	0,3

* Polimeraza DNA dodawana po inkubacji w określonej temperaturze

** Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 34. Profil temperaturowo-czasowy

	Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]	
	1	98	30	
	35	98	10	
		65	30	
		72	9	
	1	72	300	
Krzywa topnienia	1	95	120	Szybkość grzania 0,5°C/cykl
		60	15	
		95	5	

7.9.3. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Procesywność badanych fuzyjnych polimeraz DNA oznaczono zgodnie z metodą opublikowaną przez Elshawadfy'a oraz współpracowników [127], zgodnie z zamieszczoną tam definicją:

Procesywność to liczba nukleotydów wbudowywanych w trakcie jednej reakcji katalitycznej z udziałem pojedynczej cząsteczki polimerazy DNA.

Reakcję oznaczania procesywności, prowadzono w obecności 10-krotnie mniejszej ilości polimerazy, niż we wcześniej omawianych reakcjach PCR, tak by zgodnie z definicją utrzymać odpowiednie warunki do zajścia reakcji tj. umożliwić jednokrotne przyłączenie badanej fuzyjnej polimerazy DNA do nici DNA. Dodatkowo do reakcji wykorzystano nadmiar tzw. „pułapki”, w tym przypadku heparyny, która posiada większe powinowactwo do polimerazy DNA, niż sama polimeraza DNA do DNA. Stężenie heparyny oznaczano na podstawie określenia ilości inhibującej poszczególne warianty otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA.

7.9.3.1. Wyznaczenie krzywej procesywności na podstawie produktów markerowych

- Mieszaninę o poniższym składzie (tabela 35) inkubowano w temperaturze 50°C przez 5 min.

Tabela 35. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Woda jałowa	6,8
Bufor reakcyjny 5x A lub B**	2
dNTPs [10 mM]	1
Starter Px [10 μM]*	0,4
Matryca T [10 μM]	0,4
Polimeraza Phusion™ [2 U/μl]	0,1
Barwnik EvaGreen	0,3

* startery od P1 do P22 [Mat. 6.9.3.]

**Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

- Inicjacja reakcji przez dodanie jonów magnezu o stężeniu końcowym 50 mM oraz heparynę o odpowiednim stężeniu (analogiczne jak w przypadku badanych fuzyjnych form polimerazy DNA), a następnie przeniesienie do termobloku o temperaturze 72°C oraz inkubacja przez 1 min.
- Detekcja produktów markerowych zgodnie z poniższymi profilami czasowo-temperaturowymi (tabela 36 oraz tabela 37).

Tabela 36. Profil temperaturowo-czasowy

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

Tabela 37. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Szybkość grzania/chłodzenia [°C/s]
Denaturacja	95	10	5
Etap początkowy	60	60	4
Etap końcowy	97	1	0,2

Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono temperatury topnienia dla poszczególnych produktów markerowych (tabela 38). Analizy porównawcze przeprowadzenia reakcji dla produktów markerowych w różnych buforach (A oraz B Mat. 6.10, Met. 7.8.2, Wyn. 8.3.1) nie wykazały różnic w temperaturach topnienia.

Tabela 38. Zestawienie temperatur topnienia produktów markerowych.

Sekwencja startera	Ilość dobudowanych dNTPs	Temperatura topnienia zhybryzowanego DNA [°C]
3'CCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGACCGTTTCGTTTCG AACAGAGTACCTG GCTAT	(Matryca DNA)	-
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG G	1 nt	73,41
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GG	2 nt	74,17
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGC	3 nt	74,89
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCA	4 nt	75,76
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAA	5 nt	75,98
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAG	6 nt	76,35
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGC	7 nt	76,43
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCA	8 nt	76,72
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAA	9 nt	77,42
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG	10 nt	77,68
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG C	11 nt	77,91
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CT	12 nt	78,06
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTT	13 nt	78,27
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTG	14 nt	78,59
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGT	15 nt	78,77
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTC	16 nt	78,82
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCT	17 nt	79,74
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCTC	18 nt	80,01
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCTCA	19 nt	80,51
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCTCAT	20 nt	80,72
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCTCATG	21 nt	81,27
5'GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCTG GGCAAGCAAG CTTGTCCTCATGG	22 nt	82,10

*Pogrubioną czcionką oznaczono nukleotydy dobudowywane przez fuzyjną formę archealnej polimerazy DNA w trakcie trwania reakcji izotermicznej

Analogicznie, oznaczanie procesywności przebiegało dla otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA.

7.9.3.2. Oznaczenie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

- Mieszaninę o poniższym składzie (tabela 39) inkubowano w temperaturze 50°C przez 5 min.

Tabela 39. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]**
Woda jałowa	33
Bufor reakcyjny 5x A lub B*	20
dNTPs [10 mM]	20
Starter P [10 μ M]	4
Matryca T [10 μ M]	4
Polimeraza DNA [1U/ μ l]	1
Barwnik EvaGreen	3

*Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

** Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej 85 μ l

- Dodanie 15 μ l heparyny o stężeniu, które inhibuje badany wariant polimerazy DNA, pobranie próbki w tzw. czasie t_0 , następnie inicjacja reakcji przez dodanie 15 μ l jonów magnezu o stężeniu końcowym 50 mM oraz przeniesienie do termobloku nagrzanego do 72°C
- Pobieranie próbek w różnych odstępach czasowych 30 s, 1 min, 2 min oraz 5 min
- Detekcja produktów, zgodnie z poniższym profilem czasowo-temperaturowym (tabela 40).

Tabela 40. Profil temperaturowo-czasowy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Szybkość grzania/chłodzenia [°C/s]
Denaturacja	95	10	5
Etap początkowy	60	60	4
Etap końcowy	97	1	0,2

7.9.4. Określenie szybkości elongacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

Analizę szybkości syntezy otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA określono na podstawie metody opisanej przez Lee oraz współpracowników [128], która opiera się o poniższą definicję:

Szybkość elongacji określana jest na podstawie ilości nukleotydów wbudowywanych przez 1 U polimerazy DNA w czasie 1 sekundy [nt/s].

W celu analizy szybkości syntezy DNA przeprowadzono reakcje PCR, w których zastosowano startery (3 pary) umożliwiające powstanie różnej wielkości produktów: TNS F/TNS R (300 pz), HEMA1 F/HEMA1 R (500 pz) oraz pET F/pET R (1000 pz) [Mat. 6.9.2]. Do otrzymania każdego z w/w produktów wykorzystano różne czasy wydłużania od 5 do 20 sekund. Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe. Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 41 i 42.

Tabela 41. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter X F [10 μM]**	1
Starter X R [10 μM]**	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza [1 U/μl]	1
Bufor reakcyjny 5x A lub B***	4
H ₂ O jałowa	11,5
Matryca	1*

* W przypadku stosowania starterów DM2 F/ DM2 R oraz HEMA1 F/HEMA1 R matrycą było genomowe DNA psie, natomiast w przypadku starterów pET F/ pET R matrycą było DNA plazmidowe (pET-30 Ek/LIC)

** Startery X F, X R oznaczają odpowiednio starter F oraz R z każdej pary wykorzystywanych starterów

*** Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 42 Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	65	30
	72	5/10/15/20
1	72	300
1	4	∞

7.9.5. Oznaczenie czułości fuzyjnych formy archealnej polimerazy DNA

W celu oznaczenia czułości badanych fuzyjnych form polimerazy DNA wykorzystano metodę opisaną przez Halley'a i Prezioso [129]. Według nich definicja czułości polimerazy DNA brzmi następująco:

Czułość polimerazy DNA to najmniejsza ilość matrycy DNA, która wciąż pozwala na jej wydajne amplifikowanie w reakcji PCR przez 1 U polimerazy DNA.

Badanie czułości polimerazy DNA przeprowadzono z wykorzystaniem genomowego DNA wyizolowanego z krwi psa, a następnie poprzez przygotowanie seryjnych 10-krotnych rozcieńczeń matrycy, gdzie stężenie wyjściowe wynosiło 300 ng/μl. Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R, gdzie oczekiwana wielkość produktu to 294 pz. Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe. Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 43 oraz 44.

Tabela 43. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter DM2 F [10 μM]	1
Starter DM2 R [10 μM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza 1 U/μl	1
Bufor reakcyjny A lub B**	4
H ₂ O jałowa	11,5
Matryca	1*

* W reakcji wykorzystano 10-krotne seryjne rozcieńczenia DNA wyizolowanego z krwi psiej, jego wyjściowe stężenie wynosiło 300 ng/μl

**Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 44. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	65	30
	72	9
1	72	300
1	4	∞

7.9.6. Badanie zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

W celu określenia zdolności amplifikacji sekwencji bogatych w pary GC przez otrzymane fuzyjne formy polimerazy DNA wykorzystano reakcję PCR, podczas której zastosowano matrycę wyizolowaną z *Mycobacterium bovis* BCG Moreau PL [Mat. 6.3]. Do reakcji, w zależności od wybranego wariantu fuzyjnej formy polimerazy DNA stosowano wzrastającą ilość jednostek polimerazy DNA. Do analizy wybrano startery MC15 F/MC15 R, gdzie oczekiwana wielkość produktu to 300 pz. Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe. Rozdział prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy prowadzonej reakcji PCR zawarto w tabelach 45 i 46

Tabela 45. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μ l]
Starter MC15 F [10 μ M]	0,5
Starter MC15 R [10 μ M]	0,5
dNTPs [8 mM]	0,4
Polimeraza 1- 3 U/ μ l	1 – 3
DMSO 100%	1
Bufor reakcyjny A lub B**	4
H ₂ O jałowa	X*
Matryca	0,8

* ilość wody zależna od stosowanej liczby jednostek polimerazy DNA

**Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 46. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	180
35	98	10
	60	10
	72	10
1	72	300
1	4	∞

7.9.7. Badanie odporności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na inhibitory

W celu sprawdzenia oporności otrzymanych fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory, prowadzono reakcje PCR w obecności następujących zakresów stężeń wybranych inhibitorów:

- 1) heparyna: 0,024 mg – 1,5 mg;
- 2) krew pełna EDTA: 0,78% v/v – 50% v/v – mieszaniny reakcyjnej, stosowana jako inhibitor oraz jako matryca i inhibitor;
- 3) antybiotyk – od 3,125 µg do 200 µg;
- 4) 100% izopropanol – 0,78% v/v – 50% v/v mieszaniny reakcyjnej;
- 5) 70% etanol – 0,78% v/v – 50% v/v mieszaniny reakcyjnej;
- 6) kwas humusowy – od 15,63 ng do 1000 ng.

Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R (oczekiwana wielkość produktu 294 pz) oraz WFFS F/ WFFS R (oczekiwana wielkość produktu 284 pz). Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]. Rozdział prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Matrycą było genomowe DNA o stężeniu 50 ng/µl wyizolowane z krwi psa oraz genomowe DNA o stężeniu 50 ng/µl wyizolowane z końskiego włosa. Jako źródło krwi wykorzystano krew psią [Mat. 6.1]. Skład stosowanych mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy dla prowadzonych reakcji zawarto w tabelach 47 oraz 48.

Tabela 47. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [µl]
Starter DM2 F/ WFFS F [10 µM]	1
Starter DM2 R/ WFFS R [10 µM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza [1 U/µl]	1
Bufor reakcyjny A lub B***	4
H ₂ O jałowa + inhibitor**	11,5
Matryca	1*

* W przypadku stosowania krwi pełnej jako matrycy, dodatek genomowego DNA pomijano.

** Dla każdego z inhibitorów przygotowano seryjne dwukrotne rozcieńczenia

***Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 48. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	65	30
	72	9
1	72	300
1	4	∞

7.9.8. Wpływ fuzyjnych polimeraz DNA na amplifikację DNA w zmiennych temperaturach hybrydyzacji wybranych oligonukleotydów

Istotnym elementem przy wyborze białek stosowanych w tworzeniu fuzji z polimerazami DNA jest możliwość stabilizacji, a także zdolność do wiązania DNA. Wspomniane cechy mogą znacząco wpływać na etap hybrydyzacji oligonukleotydu do matrycy DNA. Elementem zmiennym podczas trwania reakcji była temperatura hybrydyzacji starterów. W tym celu w termocyklerze ustawiono gradient temperaturowy w zakresie od 55°C do 72°C. Do analizy wybrano startery DM2 F/DM2 R (oczekiwana wielkość produktu to 294 pz), dla których optymalna temperatura przyłączania starterów wynosi 65°C. Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe. Rozdział prowadzono pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3]. Matrycą było genomowe DNA o stężeniu 30 ng/μl wyizolowane z krwi psa [Mat. 6.1]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zawarto w tabelach 49 i 50.

Tabela 49. Mieszanina reakcyjna PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Ilość [μl]
Starter DM2 F [10 μM]	1
Starter DM2 R [10 μM]	1
dNTPs [8 mM]	0,5
Polimeraza [1 U/μl]	1
Bufor reakcyjny A lub B*	4
H ₂ O jałowa	11,5
Matryca	1

*Bufor stosowany w zależności od badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2; Wyn. 8.3.1]

Tabela 50. Profil temperaturowo-czasowy

Ilość cykli	Temperatura [°C]	Czas [s]
1	98	30
35	98	10
	55...72	30
	72	9
	72	300
1	4	∞

7.9.9. Analiza oddziaływania fuzyjnych polimeraz DNA z ssDNA oraz dsDNA

Analiza możliwości wiązania jedno- lub dwuniciowego DNA przez otrzymane fuzyjne polimerazy DNA została przeprowadzona z wykorzystaniem testu EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay). Test wykonano zgodnie z protokołem opisanym przez Olszewskiego i współpracowników [111]. Badane fuzyjne formy polimerazy DNA inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej w obecności 10 pmol oligonukleotydów d(T)₇₆ znakowanych fluorescencyjnie na końcu 5' oraz 2,5 pmol produktu PCR o długości 194 pz. W reakcji wykorzystano od 1 U do 32 U każdej z badanych fuzyjnych form polimerazy DNA. Wynik analizy sprawdzano przy użyciu elektroforezy agarozowej. Zamiast barwnika SimplySafe użyto bromek etydyny [Mat. 6.11]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 2% żelu agarozowym pod napięciem 100 V przez 25 min [Met. 7.1.3].

Do obliczenia stężeń pmol produktu PCR wykorzystano kalkulator dostępny na stronie <https://pl.promega.com/resources/tools/biomath/>.

7.10. Usługi

- Sekwencjonowanie otrzymanych konstruktów – Genomed, Polska
- Synteza oligonukleotydów – Genomed, Polska; Microsynth, Szwajcaria oraz Merck, Niemcy

7.11. Programy oraz oprogramowania

- SnapGene Viewer <https://www.snapgene.com> – projektowanie oligonukleotydów, sprawdzanie sekwencji.

- <https://pl.promega.com/resources/tools/biomath/> – przeliczanie stężeń do testu EMSA

7.11.1. Analiza zaprojektowanych starterów:

- PrimerBLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- OligoAnalyzer™ Tool <https://www.idtdna.com>

7.11.2. Analiza wyników rozdziału elektroforetycznego uzyskanych w żelach agarozowych oraz poliakrylamidowych:

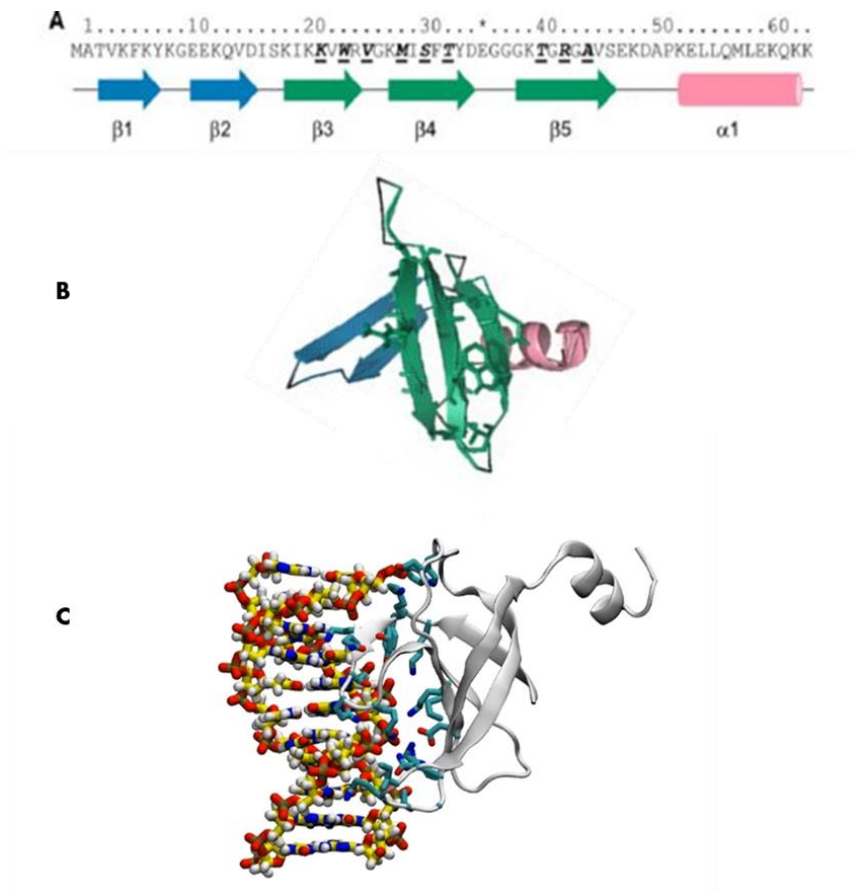
- GelAnalyzer
- ChemiDoc do dokumentacji i densytometrycznej analizy żeli poliakrylamidowych – Bio-Rad, USA
- ProtParam <https://web.expasy.org/protparam/>

8. Wyniki

8.1. Projektowanie i otrzymywanie konstruktów DNA kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA

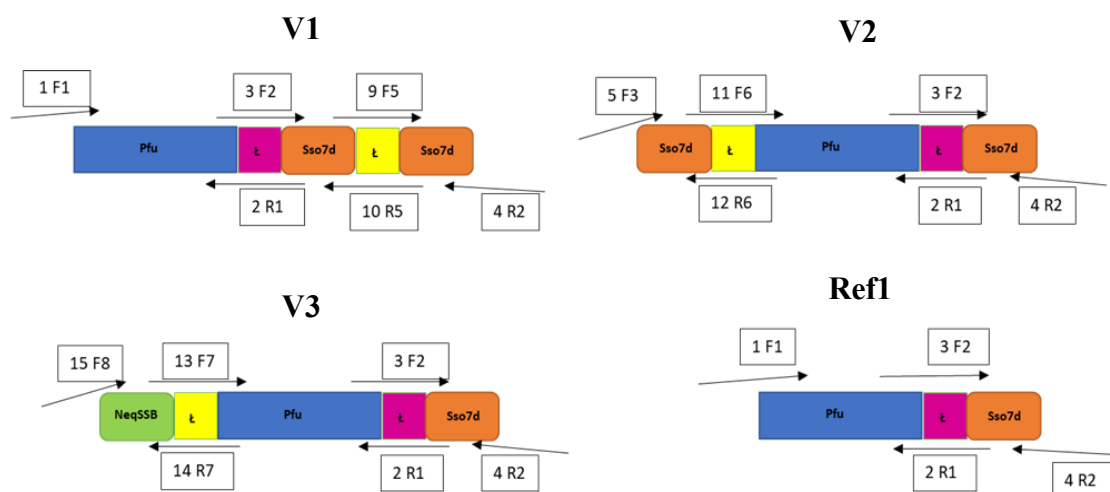
Pierwszym etapem procesu otrzymywania fuzyjnych białek było zaprojektowanie i utworzenie konstruktów DNA zawierających geny kodujące fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA i w celu ich amplifikacji zaprojektowano startery do nich komplementarne [Met. 6.9.1]. Źródłem DNA do amplifikacji pełnej długości genu kodującego polimerazę DNA Pfu był hipertermofilny archeon *Pyrococcus furiosus* (szczep DSM3638). Dodatkowo wykorzystano DNA plazmidowe pochodzące z kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, zawierające geny kodujące białka wiążące DNA, które wybrano na partnerów fuzyjnych polimerazy DNA. W niniejszej pracy jako podstawniki wykorzystano dwa białka pochodzenia archealnego z całkowicie różnych rodzajów białek wiążących DNA. Pierwsze z nich to białko Sso7d, które zostało wyizolowane z *Sulfolobus solfataricus* i wiąże tylko dsDNA i jest najbardziej znanym białkiem służącym jako partner fuzyjny w tworzeniu modyfikacji polimeraz DNA. Drugie białko podstawnikowe, wiążące zarówno ssDNA jak i dsDNA, to wysoce termostabilne białko NeqSSB wyizolowane z *Nanoarchaeum equitans*, o którym wiadomo znacznie mniej w porównaniu do białka Sso7d, jednak z którym wiąże się nadzieje na uzyskanie unikalnych właściwości fuzyjnej polimerazie DNA Pfu, tak jak to miało miejsce w przypadku polimerazy DNA Taq [94]. Przeprowadzono porównanie sekwencji aminokwasowych znanych białek wiążących DNA, w tym przede wszystkim białka Sso7d (rysunek 11A) oraz NeqSSB, i zauważono, że pomimo dużych rozbieżności w wielkości obu białek, to region odpowiedzialny za oddziaływanie ich z DNA posiada zakonserwowane reszty aminokwasowe (na rysunku wyróżnione pogrubioną czcionką) odpowiedzialne za te interakcje. Następnie dokonano modelowania molekularnego mającego na celu określenie przybliżonej budowy białka NeqSSB. Rysunek 11B prezentuje strukturę krystalograficzną termostabilnego białka Sso7d w kompleksie z DNA, którego budowa oraz funkcje w komórce zostały dość dobrze poznane, a samo białko Sso7d zostało wielokrotnie wykorzystane jako partner fuzyjny polimeraz DNA, przez co wręcz można stwierdzić, że jest to biomakromolekuła modelowa we wspomnianym zastosowaniu. Kolejny etap pracy polegał na porównaniu struktur obu termostabilnych białek tzn. struktury krystalograficznej Sso7d w kompleksie z DNA

i wymodelowanej struktury NeqSSB w kompleksie z DNA, czego rezultatem jest zaprezentowany na rysunku 11C obraz. Przedstawia on prawdopodobną budowę białka NeqSSB i miejsce jego oddziaływania z DNA wraz z precyzyjnym wskazaniem ważnych reszt aminokwasowych odpowiedzialny za te zjawisko, które są zbieżne z resztami obecnymi w białku Sso7d.



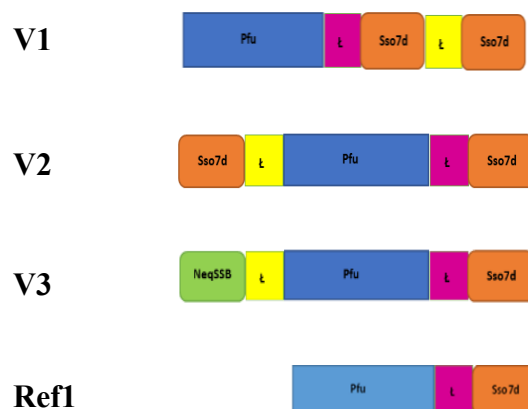
Rysunek 11. Sekwencja oraz struktura białek Sso7d z *Sulfolobus solfataricus* oraz NeqSSB z *Nanoarcheum equitans*. A Sekwencja Sso7d. Struktury drugorzędowe są wskazane pod sekwencją kolorami niebieskim, zielonym oraz różowym. Dziewięć pogrubionych i podkreślonych aminokwasów wskazuje zmienność aminokwasową. B Struktura białka Sso7d z domenami oznaczonymi kolorami (PDB ID 1BNZ). C Wymodelowana struktura białka NeqSSB wraz z wskazaniem rejonu oddziałującego w DNA.

Następnym etapem było uzyskanie konstruktów DNA zawierających geny kodujące polimerazę DNA Pfu w fuzji z dwoma białkami wiążącymi DNA (Sso7d i NeqSSB) tzn. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d.



Rysunek 12. Schemat przedstawiający otrzymane warianty fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, z uwzględnieniem wykorzystanych starterów [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, natomiast Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

Wariant pierwszy (w skrócie V1) fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Pfu, o nazwie V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, zawiera na C-końcu dwa białka Sso7d, połączone ze sobą łącznikami o różnych sekwencjach aminokwasowych (rysunek 12 V1). Wariant drugi (w skrócie V2) fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Pfu, nazwany V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, zawiera dwa białka Sso7d na obu końcach, połączone ze sobą łącznikami o różnych sekwencjach aminokwasowych (rysunek 12 V2). Wariant trzeci (w skrócie V3) fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Pfu, nazwany V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, zawiera na N-końcu białko NeqSSB, natomiast na C-końcu białko Sso7d, połączone ze sobą łącznikami o różnych sekwencjach aminokwasowych (rysunek 12 V3). Jako referencję zastosowano najbardziej znaną na świecie modyfikowaną fuzyjną polimerazę Pfu, która na C-końcu zawiera białko Sso7d połączone za pomocą łącznika (w skrócie Ref1) (rysunek 12 Ref1). W celu zminimalizowania ryzyka nieprawidłowego przyłączenia genów kodujących podstawnikowe białka lub powstania krótszego konstrukt DNA przy zastosowaniu metody klonowania Gibsona wykorzystano dwie różne sekwencje linkerowe. Wykorzystanie łączników pozwala na uniknięcie zawady sterycznej w białku fuzyjnym, która mogłaby zaburzyć odpowiednie oddziaływanie z DNA oraz jego amplifikację przez polimerazę DNA. Zastosowanie różnych łączników zapewnia uzyskanie rekombinowanych plazmidów DNA w prawidłowej konfiguracji, tak jak przedstawiono to na rysunku nr 13.



Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA i białka referencyjnego otrzymanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d.

8.1.1. Klonowanie genów kodujących białka Pfu-Sso7d, Pfu-Sso7d-Sso7d, Sso7d-Pfu-Sso7d, NeqSSB-Pfu-Sso7d

8.1.1.1. Izolacja plazmidowego i genomowego DNA

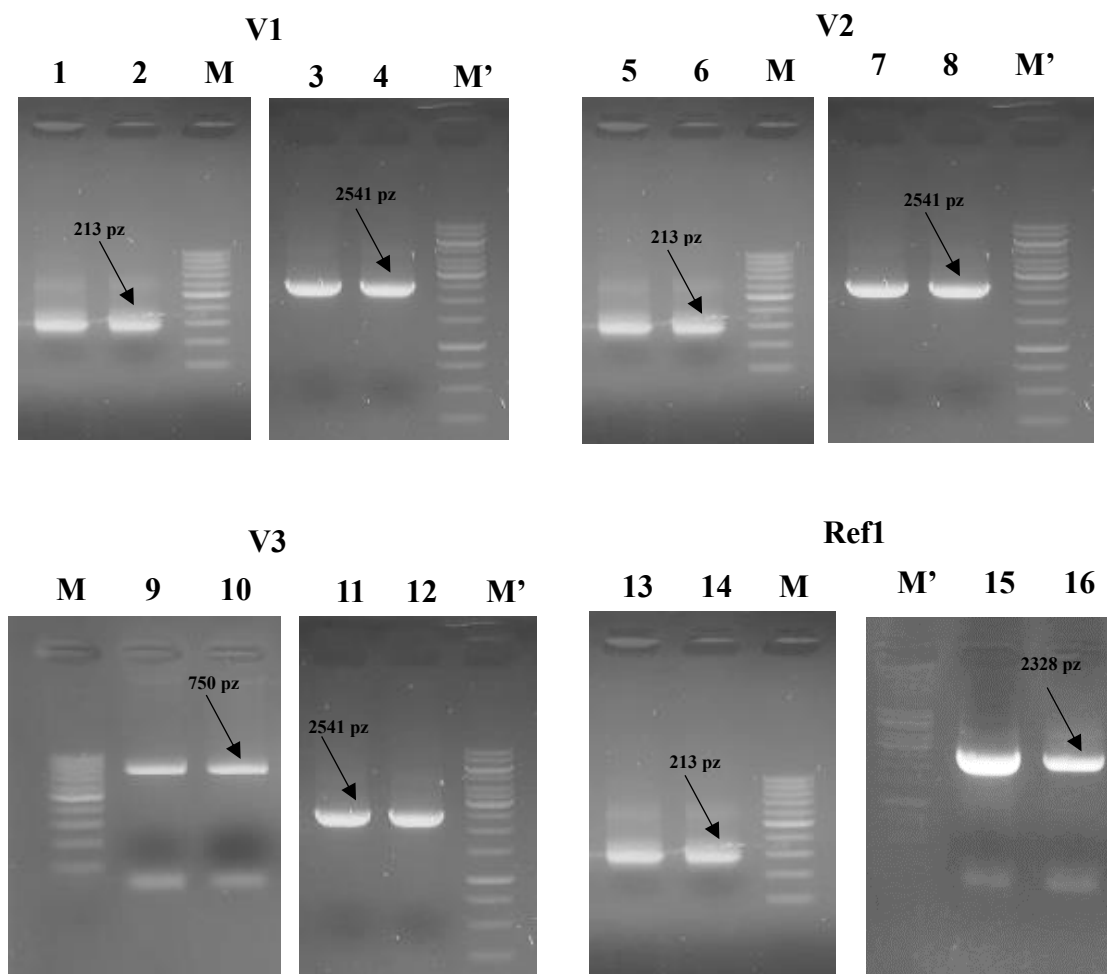
Pierwszy etap polegał na izolacji DNA z plazmidów pBAD/Sso7d i pBAD/NeqSSB pozyskanych z Politechniki Gdańskiej oraz na izolacji genomowego DNA z *P. furiosus* DSM3638, które zostały wykorzystane do reakcji PCR jako matryca [Mat. 6.2, 6.4, Met. 7.1.1].

8.1.1.2. Amplifikacja genów niezbędnych do otrzymania konstruktów DNA kodujących fuzyjne polimerazy DNA

W celu otrzymania konstruktów DNA kodujących warianty V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d i Ref1 Pfu-Sso7d przeprowadzono niezależne reakcje PCR. Pierwsza z nich umożliwiła uzyskanie produktów PCR o sekwencji zgodnej z sekwencją genu kodującego wybrane białka tj. Sso7d oraz NeqSSB z dodatkowym łącznikiem o długości 18 nukleotydów oraz sekwencji komplementarnych do 11 początkowych genów kodujących N-koniec referencyjnej polimerazy Pfu-Sso7d w przypadku wariantów V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz C-koniec polimerazy Pfu-Sso7d dla V1Pfu-Sso7d-Sso7d i Ref1 Pfu-Sso7d. W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymano produkty PCR o długościach 213 pz oraz 750 pz [Met. 7.1.5].

Na drugi produkt PCR o długości 2328 pz składał się gen, który koduje polimerazę

Pfu wraz z 18-nukleotydomy łączykiem oraz 11 dodatkowymi nukleotydomy, które były komplementarne do sekwencji nukleotydomy genu kodującej C-koniec białka Sso7d. Trzeci produkt PCR (2541 pz), złożony z genu kodującej polimerazę DNA Pfu i genu kodującej białko Sso7d wraz z 18-nukleotydomy łączykiem oraz 11 dodatkowymi nukleotydomy, które były komplementarne do sekwencji nukleotydomy genu kodującej N- lub C-koniec białka partnerskiego powstał w oparciu o matrycę jaką było DNA plazmidu pET30-Pfu-Sso7d uzyskanego w drodze klonowania metodą Gibsona (Wyn. 8.1.1.3). Do każdej reakcji amplifikacji DNA zostały użyte odpowiednio zaprojektowane startery. Do reakcji PCR zostało wykorzystane DNA wyizolowane z *P. furiosus* i DNA plazmidu pET30-Pfu-Sso7d. Zarówno DNA genomowe jak i plazmidowe stosowane jako matryca w reakcji PCR miało stężenie ok. 50 ng/μl [Met. 7.1.5]. Produkty otrzymane po reakcji PCR rozdzielano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11] (rysunek 14).



Rysunek 14. Wynik rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji PCR genów kodujących fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.1.5]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzielania: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; V1

oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza NeqSSB-Pfu-Sso7d;

M – marker wielkości DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11.]

M⁺ – marker wielkości GeneRuler 1 kb DNA Ladder [Mat. 6.11.]

1, 2, 5, 6, 13, 14 – produkty amplifikacji genu *sso7d*

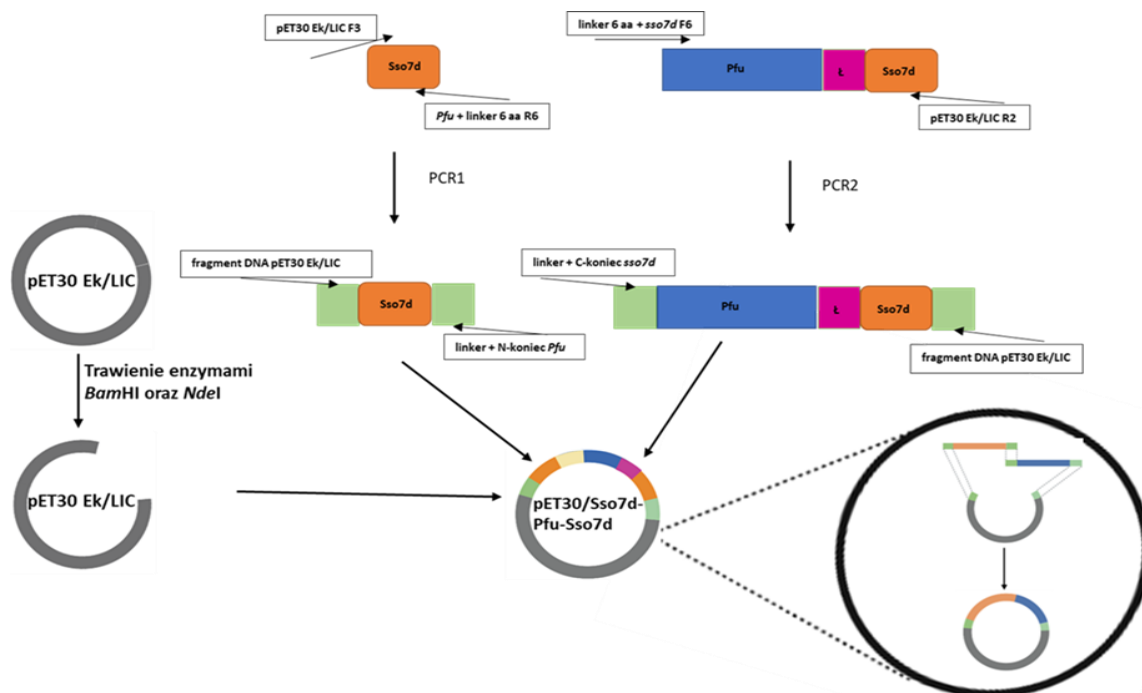
3, 4, 7, 8, 11, 12 – produkty amplifikacji genu *pfusso7d*

9, 10 – produkty amplifikacji genu *neqssb*

15, 16 – produkty amplifikacji genu *pfu*

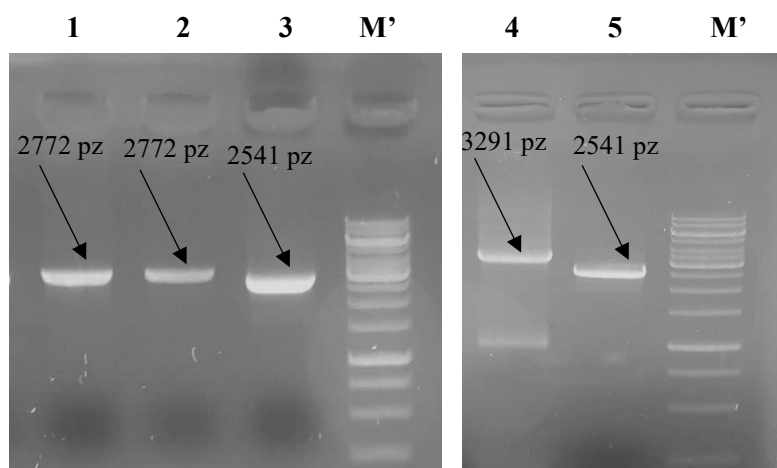
8.1.1.3. Klonowanie genów kodujących fuzyjne polimerazy DNA do DNA wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC

W pierwszym etapie przygotowującym do klonowania genów kodujących fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA do wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC dokonano ekstrakcji produktów PCR z żelu agarozowego, a następnie ich oczyszczania za pomocą precypitacji [Met. 7.1.4]. Kolejnym etapem było poddanie reakcji trawienia DNA plazmidowego pET-30 Ek/LIC z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych *Bam*HI oraz *Nde*I [Mat. 6.6, Met. 7.1.6] i podobnie jak w przypadku produktów PCR izolacji z żelu agarozowego [Met. 7.1.4]. Następnie przeprowadzono proces klonowania metodą Gibsona genów kodujących białka podstawnikowe i polimerazę DNA Pfu do DNA plazmidu pET-30 Ek/LIC [Mat. 6.5, Met. 7.1.7]. Na rysunku 15 przedstawiono schemat według którego przeprowadzano klonowanie dla każdego z konstruktyw DNA, na przykładzie wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d.



Rysunek 15. Schemat klonowania techniką Gibsona na podstawie wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d [opracowanie własne z wykorzystaniem platformy BioRender, Joanna Nowicka 2023]

Po przeprowadzeniu reakcji Gibsona przeprowadzono transformację mieszanin reakcyjnych do komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α [Mat. 6.5., Met. 7.2.4.] Bakterie wysiano na podłoże stałe LA zawierające kanamycynę oraz glukozę i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 h [Mat. 6.7.2, 6.7.3., Met. 7.2.1]. Następnie przeprowadzono reakcję PCR w celu potwierdzenia obecności odpowiednich DNA insertów w otrzymanych koloniach bakteryjnych (tzw. PCR kolonijny) [Met. 7.3] i te które dały pozytywne rezultaty zaszczepiono na podłoże LB z kanamycyną [Mat. 6.7.1, 6.7.3, Met. 7.2.2]. Rezultaty reakcji PCR przedstawiono na rysunku nr 16. Z hodowli nocnych oczyszczono DNA plazmidowe [Mat. 6.4, Met. 7.1.2] i przekazano je do sekwencjonowania, w celu ostatecznego potwierdzenia poprawności sekwencji uzyskanych konstruktów DNA.



Rysunek 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego reakcji PCR kolonijnej przeprowadzonej z wykorzystaniem jako źródła matrycy DNA kolonii bakteryjnych [Met. 7.3]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];

M' – marker wielkości GeneRuler 1 kb DNA Ladder [Mat. 6.11.]

1. DNA konstrukt Pfu-Sso7d-Sso7d o wielkości 2772 pz
2. DNA konstrukt Sso7d-Pfu-Sso7d o wielkości 2772 pz
3. DNA konstrukt Pfu-Sso7d o wielkości 2541 pz
4. DNA konstrukt NeqSSB-Pfu-Sso7d o wielkości 3291 pz
5. DNA konstrukt Pfu-Sso7d o wielkości 2541 pz

Analiza wyników sekwencjonowania potwierdziła otrzymanie wszystkich zaplanowanych do uzyskania konstruktów DNA, które nazwano pET30-Pfu-Sso7d-Sso7d, pET30-Sso7d-Pfu-Sso7d, pET30-NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz pET30-Pfu-Sso7d. Na rysunku nr 17 przedstawiono porównanie sekwencji konstruktów DNA zawierającego gen kodujący fuzyjną polimerazę DNA Pfu-Sso7d otrzymanej w wyniku sekwencjonowania z sekwencją DNA planowaną do uzyskania dla konstrukt Ref1 Pfu-Sso7d. Analogiczne analizy przeprowadzono dla każdego z pozostałych docelowych konstruktów DNA.

sekWRef1	NANSSCRWYYNNNCNGCENNNTNTACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACA	60
Pfu_Sso7d	NANSSCRWYYNNNCNGCENNNTNTACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACA	60
sekWRef1	ATTCCTCTAGAMATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATTTTAGA	120
Pfu_Sso7d	ATTCCTCTAGAMATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATTTTAGA	120
sekWRef1	TGTGGATTACATAACTGAAGAAGGAAAACCTGTTATTAGGCTATTCAAAAAGAGAACGG	180
Pfu_Sso7d	TGTGGATTACATAACTGAAGAAGGAAAACCTGTTATTAGGCTATTCAAAAAGAGAACGG	180
sekWRef1	AAAATTTAAGATAGAGCATGATAGAACTTTTAGACCATACATTTACGCTCTTCTCAGGGA	240
Pfu_Sso7d	AAAATTTAAGATAGAGCATGATAGAACTTTTAGACCATACATTTACGCTCTTCTCAGGGA	240
sekWRef1	TGATTCAAAGATTGAAGAAGTTAAGAAAATAACGGGGAAAGGCATGGAAAAGATTGTGAG	300
Pfu_Sso7d	TGATTCAAAGATTGAAGAAGTTAAGAAAATAACGGGGAAAGGCATGGAAAAGATTGTGAG	300
sekWRef1	AATTGTTGATGTAGAGAAGGTTGAGAAAAAGTTTCTCGCAAGCCTATTACCGTGTGGAA	360
Pfu_Sso7d	AATTGTTGATGTAGAGAAGGTTGAGAAAAAGTTTCTCGCAAGCCTATTACCGTGTGGAA	360
sekWRef1	ACTTTATTTGGAACATCCCCAAGATGTTCCACTATTAGAGAAAAAGTTAGAGAACATCC	420
Pfu_Sso7d	ACTTTATTTGGAACATCCCCAAGATGTTCCACTATTAGAGAAAAAGTTAGAGAACATCC	420
sekWRef1	AGCAGTTGTGGACATCTTCGAATACGATATTCCATTTGCAAAGAGATACCTCATCGACAA	480
Pfu_Sso7d	AGCAGTTGTGGACATCTTCGAATACGATATTCCATTTGCAAAGAGATACCTCATCGACAA	480
sekWRef1	AGGCCTAATACCAATGGAGGGGAAGAAGAGCTAAAGATTCTTGCCTTCGATATAGAAAC	540
Pfu_Sso7d	AGGCCTAATACCAATGGAGGGGAAGAAGAGCTAAAGATTCTTGCCTTCGATATAGAAAC	540
sekWRef1	CCTCTATCACGAAGGAGAAGAGTTTGGAAAAGGCCAATTATAATGATTAGTTATGCAGA	600
Pfu_Sso7d	CCTCTATCACGAAGGAGAAGAGTTTGGAAAAGGCCAATTATAATGATTAGTTATGCAGA	600
sekWRef1	TGAAAATGAAGCAAAGGTGATTACTTGGAAAAACATAGATCTTCATACGTTGAGGTTGT	660
Pfu_Sso7d	TGAAAATGAAGCAAAGGTGATTACTTGGAAAAACATAGATCTTCATACGTTGAGGTTGT	660
sekWRef1	ATCAAGCGAGAGAGAGATGATAAAGAGATTTCTCAGGATTATCAGGGAGAAGGATCCTGA	720
Pfu_Sso7d	ATCAAGCGAGAGAGAGATGATAAAGAGATTTCTCAGGATTATCAGGGAGAAGGATCCTGA	720
sekWRef1	CATTATAGTTACTTATAATGGAGACTCATTGACTTCCATATTTAGCGAAAAGGGCAGA	780
Pfu_Sso7d	CATTATAGTTACTTATAATGGAGACTCATTGACTTCCATATTTAGCGAAAAGGGCAGA	780
sekWRef1	AAAACCTGGGATTAATAAACCATTGGAAGAGATGGAAGCGAGCCAAGATGCAGAGAAT	840
Pfu_Sso7d	AAAACCTGGGATTAATAAACCATTGGAAGAGATGGAAGCGAGCCAAGATGCAGAGAAT	840
sekWRef1	AGGCGATATGACGGCTGTAGAAGTCAAGGGAAGAATACATTTGACTTGTATCATGTAAT	900
Pfu_Sso7d	AGGCGATATGACGGCTGTAGAAGTCAAGGGAAGAATACATTTGACTTGTATCATGTAAT	900
sekWRef1	AACAAGGACAATAAATCTCCCAACATACACACTAGAGGCTGTATATGAAGCAATTTTGG	960
Pfu_Sso7d	AACAAGGACAATAAATCTCCCAACATACACACTAGAGGCTGTATATGAAGCAATTTTGG	960
sekWRef1	AAAGCAAAGGAGAAGGTATACGCCGACGAGATAGCAAAGCCTGGGAAAGTGGAGAGAA	1020
Pfu_Sso7d	AAAGCAAAGGAGAAGGTATACGCCGACGAGATAGCAAAGCCTGGGAAAGTGGAGAGAA	1020
sekWRef1	CCTTGAGAGAGTTGCCAAATACTCGATGGAAGATGCAAAGGCAACTTATGAACCTCGGAA	1080
Pfu_Sso7d	CCTTGAGAGAGTTGCCAAATACTCGATGGAAGATGCAAAGGCAACTTATGAACCTCGGAA	1080
sekWRef1	AGAATTCCTTCCAATGGAATTCAGCTTTCAAGATTAGTTGGACAACCTTTATGGGATGT	1140
Pfu_Sso7d	AGAATTCCTTCCAATGGAATTCAGCTTTCAAGATTAGTTGGACAACCTTTATGGGATGT	1140
sekWRef1	TTCAAGGTCAAGCACAGGGAACCTTGTAGAGTGGTTCTTACTTAGGAAAGCCTACGAAAG	1200
Pfu_Sso7d	TTCAAGGTCAAGCACAGGGAACCTTGTAGAGTGGTTCTTACTTAGGAAAGCCTACGAAAG	1200
sekWRef1	AAACGAAGTAGCTCCAACAAGCCAAGTGAAGAGGAGTATCAAAGAAGGCTCAGGGAGAG	1260
Pfu_Sso7d	AAACGAAGTAGCTCCAACAAGCCAAGTGAAGAGGAGTATCAAAGAAGGCTCAGGGAGAG	1260
sekWRef1	CTACACAGGTGGATTCTGTTAAAGAGCCAGAAAAGGGTTGTGGGAAAACATAGTATACCT	1320

Pfu_Sso7d	CTACACAGGTGGATTCTGTTAAAGAGCCAGAAAAGGGTTGTGGGAAAACATAGTATACCT	1320
sekwRef1	AGATTTTAGAGCCCTATATCCCTCGATTATAAATTACCCACAATGTTTCTCCCGATACTCT	1380
Pfu_Sso7d	AGATTTTAGAGCCCTATATCCCTCGATTATAAATTACCCACAATGTTTCTCCCGATACTCT	1380
sekwRef1	AAATCTTGAGGGATGCAAGAAGCTATGATATCGCTCCTCAAGTAGGCCACAAGTTCTGCAA	1440
Pfu_Sso7d	AAATCTTGAGGGATGCAAGAAGCTATGATATCGCTCCTCAAGTAGGCCACAAGTTCTGCAA	1440
sekwRef1	GGACATCCCTGGTTTTATACCAAGTCTCTTGGGACATTTGTTAGAGGAAAGACAAAAGAT	1500
Pfu_Sso7d	GGACATCCCTGGTTTTATACCAAGTCTCTTGGGACATTTGTTAGAGGAAAGACAAAAGAT	1500
sekwRef1	TAAGACAAAAATGAAGGAACTCAAGATCCTATAGAAAAATACTCCTTGACTATAGACA	1560
Pfu_Sso7d	TAAGACAAAAATGAAGGAACTCAAGATCCTATAGAAAAATACTCCTTGACTATAGACA	1560
sekwRef1	AAAAGCGATAAACTCTTAGCAAATCTTTCTACGGATATTATGGCTATGCAAAAGCAAG	1620
Pfu_Sso7d	AAAAGCGATAAACTCTTAGCAAATCTTTCTACGGATATTATGGCTATGCAAAAGCAAG	1620
sekwRef1	ATGGTACTGTAAGGAGTGTGCTGAGAGCGTACTGCCTGGGGAAGAAAGTACATCGAGTT	1680
Pfu_Sso7d	ATGGTACTGTAAGGAGTGTGCTGAGAGCGTACTGCCTGGGGAAGAAAGTACATCGAGTT	1680
sekwRef1	AGTATGGAAGGAGCTCGAAGAAAAGTTGGATTTAAAGTCCTCTACATTGACACTGATGG	1740
Pfu_Sso7d	AGTATGGAAGGAGCTCGAAGAAAAGTTGGATTTAAAGTCCTCTACATTGACACTGATGG	1740
sekwRef1	TCTCTATGCAACTATCCCAGGAGGAGAAAAGTGAGGAAATAAAGAAAAAGGCTCTAGAATT	1800
Pfu_Sso7d	TCTCTATGCAACTATCCCAGGAGGAGAAAAGTGAGGAAATAAAGAAAAAGGCTCTAGAATT	1800
sekwRef1	TGTAATAACATAAAATTCAAAGCTCCCTGGACTGCTAGAGCTTGAATATGAAGGGTTTTA	1860
Pfu_Sso7d	TGTAATAACATAAAATTCAAAGCTCCCTGGACTGCTAGAGCTTGAATATGAAGGGTTTTA	1860
sekwRef1	TAAGAGGGGATTCTTCGTTACGAAGAAGAGGTATGCAGTAATAGATGAAGAAGGAAAAGT	1920
Pfu_Sso7d	TAAGAGGGGATTCTTCGTTACGAAGAAGAGGTATGCAGTAATAGATGAAGAAGGAAAAGT	1920
sekwRef1	CATTACTCGTGGTTTAGAGATAGTTAGGAGAGATTGGAGTAAAATTGCAAAAAGAACTCA	1980
Pfu_Sso7d	CATTACTCGTGGTTTAGAGATAGTTAGGAGAGATTGGAGTAAAATTGCAAAAAGAACTCA	1980
sekwRef1	AGCTAGAGTTTTGGAGACAATACTAAAACACGGAGATGTTGAAGAAGCTGTGAGAAATAGT	2040
Pfu_Sso7d	AGCTAGAGTTTTGGAGACAATACTAAAACACGGAGATGTTGAAGAAGCTGTGAGAAATAGT	2040
sekwRef1	AAAAGAAGTAATACAAAAGCTTGCCAATTATGAAATTCACCAGAGAAGCTCGCAATATA	2100
Pfu_Sso7d	AAAAGAAGTAATACAAAAGCTTGCCAATTATGAAATTCACCAGAGAAGCTCGCAATATA	2100
sekwRef1	TGAGCAGATAACAAGACCATTACATGAGTATAAGGCGATAGGTCTCACGTAGCTGTTGC	2160
Pfu_Sso7d	TGAGCAGATAACAAGACCATTACATGAGTATAAGGCGATAGGTCTCACGTAGCTGTTGC	2160
sekwRef1	AAAGAACTAGCTGCTAAAGGAGTTAAAATAAAGCCAGGAATGGTAATTGGATACATAGT	2220
Pfu_Sso7d	AAAGAACTAGCTGCTAAAGGAGTTAAAATAAAGCCAGGAATGGTAATTGGATACATAGT	2220
sekwRef1	ACTTAGAGGCGATGGTCCAATTAGCAATAGGGCAATTCTAGCTGAGGAATACGATCCCAA	2280
Pfu_Sso7d	ACTTAGAGGCGATGGTCCAATTAGCAATAGGGCAATTCTAGCTGAGGAATACGATCCCAA	2280
sekwRef1	AAAGCACAAAGTATGACGCAGAATATTACATTGAGAACCAGGTTCTTCCAGCGGTACTION	2340
Pfu_Sso7d	AAAGCACAAAGTATGACGCAGAATATTACATTGAGAACCAGGTTCTTCCAGCGGTACTION	2340
sekwRef1	GATATTGGAGGGATTTGGATACAGAAAGGAAGACCTCAGATACCAAAGACAAGACAAGT	2400
Pfu_Sso7d	GATATTGGAGGGATTTGGATACAGAAAGGAAGACCTCAGATACCAAAGACAAGACAAGT	2400
sekwRef1	CGGCCTAACTTCTGGCTTAACATTAATAAAGGAAGCGGAGGGTTCGACGCAACAGTAAA	2460
Pfu_Sso7d	CGGCCTAACTTCTGGCTTAACATTAATAAAGGAAGCGGAGGGTTCGACGCAACAGTAAA	2460
sekwRef1	GTTCAAGTACAAGGGAGAAGAGAAGGAAGTAGATATAAGTAAGATAAAGAAGGTATGGAG	2520
Pfu_Sso7d	GTTCAAGTACAAGGGAGAAGAGAAGGAAGTAGATATAAGTAAGATAAAGAAGGTATGGAG	2520
sekwRef1	AGTAGGCAAAATGATAAGTTTCACCTATGATGAGGGTGGAGGAAAGACTGGTAGAGGAGC	2580
Pfu_Sso7d	AGTAGGCAAAATGATAAGTTTCACCTATGATGAGGGTGGAGGAAAGACTGGTAGAGGAGC	2580

sekwRef1	TGTAAGCGAGAAAGACGCTCCAAAAGAAGCTACTACAAATGTTAGAAAAGCAAAGAAA	2638
Pfu_Sso7d	TGTAAGCGAGAAAGACGCTCCAAAAGAAGCTACTACAAATGTTAGAAAAGCAAAGAAA	2638

Rysunek 17. Porównanie sekwencji genu kodującego referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d uzyskanej po złożeniu dostępnych sekwencji z bazy NCBI wraz z sekwencją uzyskaną w dzięki sekwencjonowaniu DNA plazmidu ekspresyjnego pET30-Pfu-Sso7d. Sekwencja oznaczona skrótem „sekwRef1” jest wynikiem otrzymanym po sekwencjonowaniu, natomiast jako „Pfu_Sso7d” oznaczono sekwencję planowaną do uzyskania dla konstruktów DNA kodującego polimerazę referencyjną

Otrzymane wyniki sekwencjonowania [Met. 7.10] potwierdziły 100% zgodności sekwencji DNA w uzyskanych plazmidach ekspresyjnych V1 pET30-Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 pET30-Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 pET30-NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 pET30-Pfu-Sso7d. Sekwencje porównywano w programie Clustal Omega [Met. 7.11].

8.2. Produkcja i oczyszczanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

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

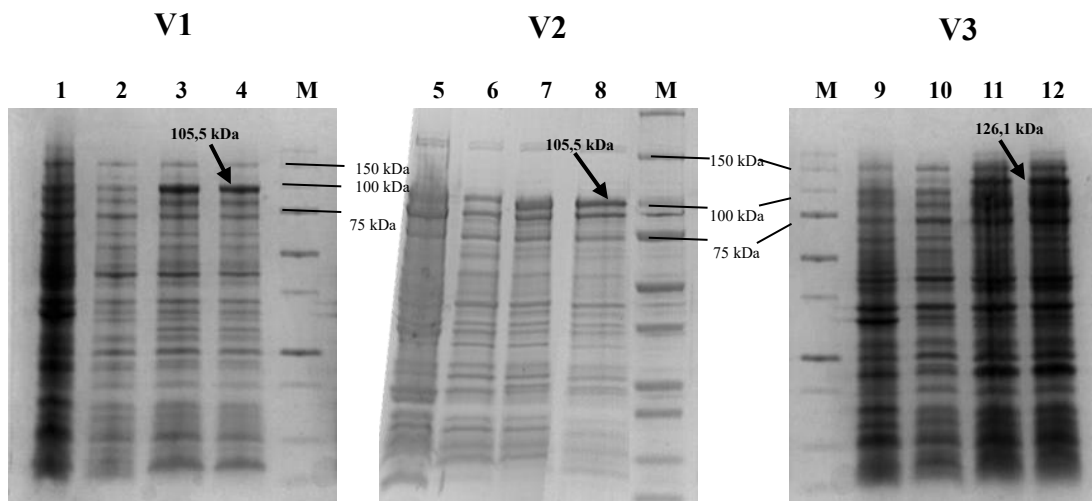
W celu ekspresji genów kodujących fuzyjne formy polimerazy DNA przeprowadzono transformację DNA uzyskanych plazmidów ekspresyjnych do komórek *E. coli* BL RIL [Met. 7.2.4]. Kolejnym etapem była optymalizacja warunków wydajnej produkcji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [Met. 7.4.1]. W tym celu najpierw zaszczerpiono 20 ml pożywki LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu, przy wykorzystaniu kolonii wyrosłych na płycie po transformacji. Hodowlę prowadzono w wytrząsarce w temperaturze 37°C przez 16 h [Mat. 6.7.1, 6.7.3, Met. 7.2.2]. Następnie pobrano 1 ml hodowli nocnej, który przeniesiono do 100 ml pożywki LB z dodatkiem kanamycyny oraz chloramfenikolu. Po osiągnięciu przez hodowlę $OD_{600} = 0,5$ dodano IPTG (końcowe stężenie 1 mM). Po zaindukowaniu hodowli próbki pobierano w określonych odstępach czasowych po: 1,5 h, 3 h, 6 h oraz po 16 h. Pobrane próbki wirowano 10 min, 5000 rpm, otrzymany supernatant odrzucono, a osady zawieszono w buforze 1x TE [Met. 7.5.1.2]. Uzyskane próbki poddano denaturacji termicznej w obecności buforu 5x Laemmli [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1.2.], a następnie наносzono na żel poliakrylamidowy [Mat. 6.12, Met. 7.5.1.2] i przeprowadzono elektroforezę w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1]. Po zakończeniu elektroforezy żele wybarwiono, nadmiar barwnika odmyto i dokonano analizy uzyskanych wyników [Met. 7.5.1.3], które potwierdziły zgodność masy molekularnej

fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z oszacowanymi za pomocą narzędzia informatycznego ProtParam (tabela 51) [Met. 7.11].

Tabela 51. Obliczeniowa masa molekularna badanych białek na podstawie ProtParam

Nazwa białka	V1	V2	V3	Ref1
Masa molekularna (kDa)	105,5	105,5	126,1	97,8

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, natomiast Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d



Rysunek 18. Wynik rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Met. 7.5.1] przedstawiający nadprodukcję fuzyjnych form polimerazy DNA [Met. 7.4.1]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; rozdziel w 12% żelu poliakrylamidowym czas rozdziału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1]; X – V1 Pfu-Sso7d-Sso7d lub V2 Sso7d-Pfu-Sso7d lub V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d

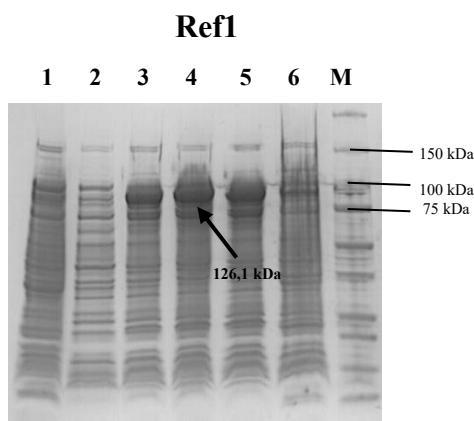
M – Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, białkowy marker wielkości 10-250 kDa [Mat. 6.12.1]

1, 5, 9 – Lizat z hodowli nocnej *E. coli*/BL RIL/pET30-X, przed odmłodzeniem

2, 6, 10 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-X przed indukcją 1 mM IPTG

3, 7, 11 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-X po 1,5 h od indukcji 1 mM IPTG

4, 8, 12 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-X po 3 h od indukcji 1 mM IPTG



Rysunek 19. Wynik rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Met. 7.5.1] przedstawiający nadprodukcję referencyjnej fuzyjnej polimerazy DNA [Met. 7.4.1], gdzie Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; rozdziel w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdziału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1];

M – Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, białkowy marker wielkości 10-250 kDa [Mat. 6.12.1]

1 – Lizat z hodowli nocnej *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d, przed odmłodzeniem

2 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d przed indukcją 1 mM IPTG

3 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po 1,5 h od indukcji 1 mM IPTG

4 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po 3 h od indukcji 1 mM IPTG

5 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po 6 h od indukcji 1 mM IPTG

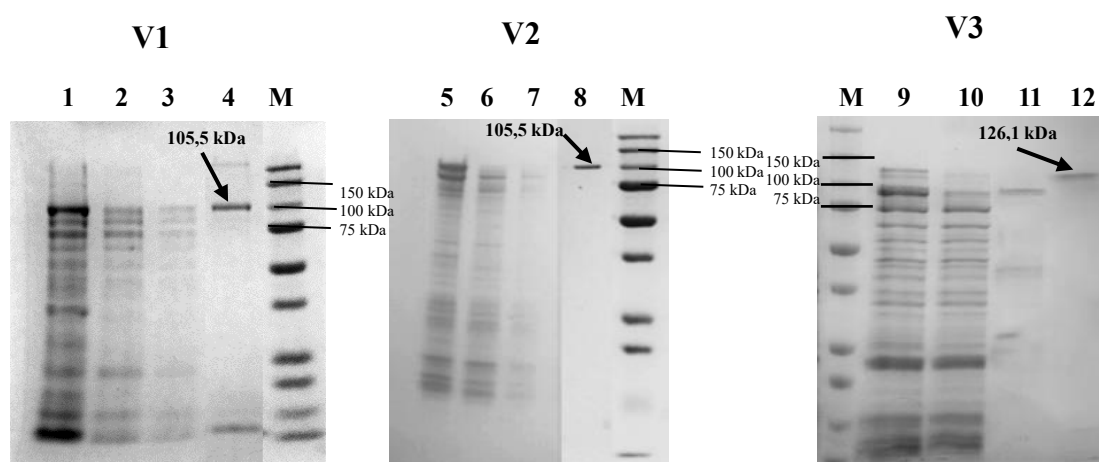
6 – Lizat z hodowli *E. coli*/BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po 16 h od indukcji 1 mM IPTG

Przeprowadzona optymalizacja warunków wydajnej produkcji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA pozwoliła na określenie odpowiedniego czasu ich otrzymywania. Najlepsze rezultaty osiągnięto po 3 h od momentu indukcji 1 mM IPTG (rysunek 18 i 19). Ustalone warunki umożliwiły przeprowadzenie wydajnej produkcji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na większą skalę, czyli w objętości 1000 ml pożywki LB [Mat. 6.7.1, 6.7.3, Met. 7.4.1].

8.2.2. Oczyszczanie rekombinowanych białek Pfu-Sso7d-Sso7d, Sso7d-Pfu-Sso7d, NeqSSB-Pfu-Sso7d, Pfu-Sso7d z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa

W celu oczyszczenia fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, przeprowadzono ich produkcję w objętości 1000 ml pożywki LB, zgodnie z warunkami ustalonymi podczas optymalizacji [Mat. 6.7.1, 6.7.3, Met. 7.4.1]. Następnie hodowle zwirowano, a uzyskane w ten sposób lizaty poddano procesowi sonikacji. Po sonikacji ponownie je odwirowano, po czym przeprowadzono termiczną denaturację białek gospodarza i znów odwirowano [Mat. 6.14, Met. 7.6]. Przygotowane supernatanty naniesiono na odpowiednio przygotowane kolumny chromatograficzne ze złożem His-

Trap [Mat.6.14]. W trakcie oczyszczania zbierano frakcje dla poszczególnych etapów elucji każdej z fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [Met. 7.6]. Próbkki z uzyskanych frakcji poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Met. 7.5.1] w celu potwierdzenia ustalonej wcześniej przy pomocy narzędzia informatycznego ProtParam [Met.7.11] masy molekularnej fuzyjnych białek. Oczyszczone białka poddano dializie we wcześniej przygotowanym oraz schłodzonym buforze E [Mat. 6.12.2, Met. 7.6]. Na rysunku 20 zostały przedstawione efekty oczyszczania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA.



Rysunek 20. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS-PAGE przedstawiający efekty oczyszczania badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na kolumnie chromatograficznej zawierającej złożę His-Trap [Mat. 6.12.2, Met. 7.6]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; rozdział w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdzielu: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1]; X – V1 Pfu-Sso7d-Sso7d lub V2 Sso7d-Pfu-Sso7d lub V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; Y – bufor B (40 mM imidazol) dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, bufor C (100 mM imidazol) dla V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz NeqSSB-Pfu-Sso7d

M – Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, białkowy marker wielkości 10-250 kDa [Mat. 6.12.1]

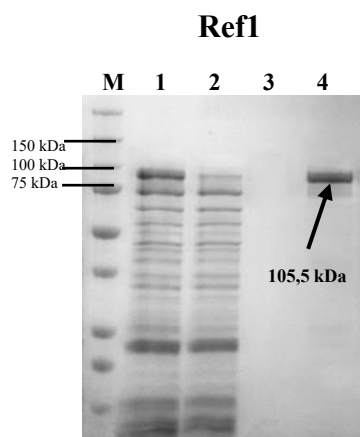
1, 5, 9 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-X po sonikacji

2, 6, 10 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-X po denaturacji białek gospodarza

3, 7, 11 – Frakcja po płukaniu 50 ml buforem A (5 mM imidazol)

4, 8, 12 – Frakcja po elucji 30 ml buforem Y

W taki sam sposób przeprowadzono produkcję białka referencyjnego Ref1, którym było Pfu-Sso7d (rysunek 21).



Rysunek 21. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS-PAGE przedstawiający efekty oczyszczania badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d na kolumnie chromatograficznej His-Trap [Mat. 6.12.2, Met. 7.6]. Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; rozdział w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdziału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1];

M – Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, białkowy marker wielkości 10-250 kDa [Mat. 6.12.1]

1 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po sonikacji

2 – Lizat komórkowy *E. coli* BL RIL/pET30-Pfu-Sso7d po denaturacji białek gospodarza

3 – Frakcja po płukaniu 50 ml buforem A (5 mM imidazol)

4 – Frakcja po elucji 30 ml buforem D (300 mM imidazol)

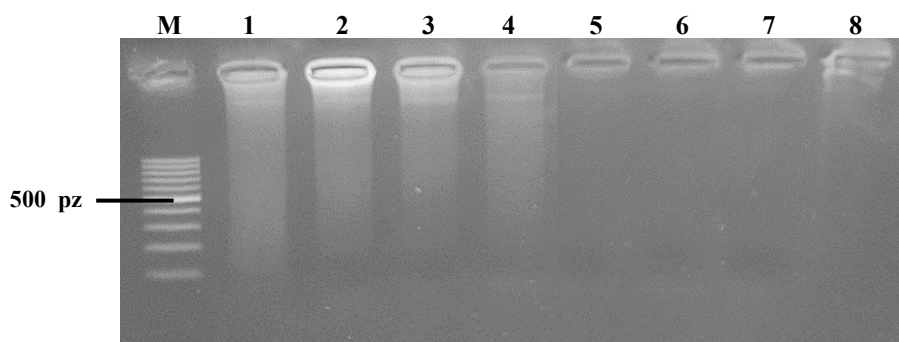
8.2.3. Usuwanie pozostałości genomowego DNA *E. coli* z preparatów białkowych

W celu usunięcia pozostałości genomowego DNA *E. coli* w oczyszczonych i zdializowanych preparatach białkowych przeprowadzono reakcję trawienia saltonazą, czyli nukleazą o szerokim spektrum działania, zdolną zhydrolizować każdą formę kwasu nukleinowych [Mat. 6.15, Met. 7.7].

Reakcja trawienia polegała na inkubacji oczyszczonych enzymów z nukleazą przez 1 h w temperaturze 37°C [Met. 7.7]. Przeprowadzenie powyższego etapu jest istotne z punktu widzenia analiz prowadzonych w trakcie charakterystyki molekularnej fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Zbyt duży stopień zanieczyszczenia DNA komórek gospodarza może negatywnie wpływać na wydajność amplifikacji DNA w reakcji PCR lub powstawanie niespecyficznych produktów PCR.

Po przeprowadzeniu reakcji trawienia z wykorzystaniem saltonazy [Mat. 6.15, Met. 7.7], pierwszy etap weryfikacji stopnia degradacji DNA stanowiła elektroforeza w żelu agarozowym próbek nie poddanych i poddanych procesowi hydrolizy kwasów nukleinowych [Met. 7.8.1]. W tym celu wszystkie rodzaje preparatów rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]

(rysunek 22).



Rysunek 22. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający obecność pozostałości genomowego DNA *E. coli* przed oraz po trawieniu saltonazą [Met.7.7, 7.8.1]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];

M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11.]

1 – 20 μ l preparatu Pfu-Sso7d-Sso7d bez trawienia saltonazą

2 – 20 μ l preparatu Sso7d-Pfu-Sso7d bez trawienia saltonazą

3 – 20 μ l preparatu NeqSSB-Pfu-Sso7d bez trawienia saltonazą

4 – 20 μ l preparatu Pfu-Sso7d bez trawienia saltonazą

5 – 20 μ l preparatu Pfu-Sso7d-Sso7d po 1 h trawienia saltonazą

6 – 20 μ l preparatu Sso7d-Pfu-Sso7d po 1 h trawienia saltonazą

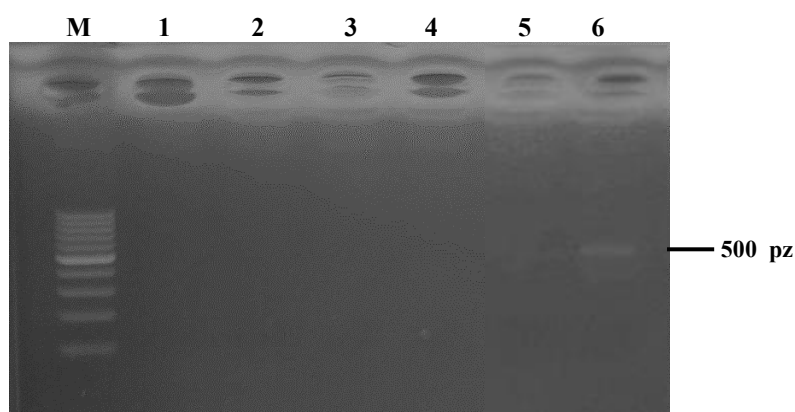
7 – 20 μ l preparatu NeqSSB-Pfu-Sso7d po 1 h trawienia saltonazą

8 – 20 μ l preparatu Pfu-Sso7d po 1 h trawienia saltonazą

Z przedstawionego na rysunku 22 rozdziału elektroforetycznego (ścieżki 1, 2, 3, 4) wynika, że oczyszczone preparaty enzymatyczne zawierały pofragmentowane genomowe DNA *E. coli*. Przeprowadzona reakcja trawienia z udziałem saltonazy [Mat. 6.15, Met.7.7] pozwoliła na skuteczne usunięcie pozostałości genomowego DNA gospodarza (rysunek 22, ścieżki 5, 6, 7 oraz 8).

Wyprodukowane w komórkach bakteryjnych fuzyjne białka mogą zawierać nieznaczne ilości DNA, które nie są widoczne w żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Dlatego w celu sprawdzenia czy preparaty białkowe są całkowicie wolne od kwasów nukleinowych, zastosowano znacznie czulszą oraz dokładniejszą metodę oznaczenia – reakcję PCR z wykorzystaniem polimerazy Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10]. Startery (L1, G1) komplementarne do polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA *E. coli* wykorzystane w reakcji amplifikacji DNA powinny umożliwić powstanie produktu PCR o wielkości ok. 500 pz [Mat. 6.9.2., Met. 7.8.1]. Jako kontrolę prowadzonej reakcji wykorzystano komercyjną polimerazę Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10], równolegle przygotowując tą samą mieszaninę reakcyjną dla wszystkich otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA i referencyjnej polimerazy DNA. Do analizy zostało użyte wyizolowane genomowe DNA *E. coli*. Wynik rozdziału

elektroforetycznego uzyskanych produktów PCR przedstawia rysunek 23.



Rysunek 23. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR powstałych podczas amplifikacji polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA z *E. coli* [Mat. 6.9.2, Met. 7.8.1]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];

M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

1 – 1 μ l polimerazy DNA Pfu-Sso7d- Sso7d w reakcji o objętości 20 μ l bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

2 – 1 μ l polimerazy DNA Sso7d-Pfu-Sso7d w reakcji o objętości 20 μ l bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

3 – 1 μ l polimerazy DNA NeqSSB-Pfu-Sso7d w reakcji o objętości 20 μ l bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

4 – 1 μ l polimerazy DNA Pfu-Sso7d w reakcji o objętości 20 μ l bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

5 – 1 μ l polimerazy DNA Phusion (Thermo Fisher Scientific) w reakcji o objętości 20 μ l bez dodatku genomowego DNA *E. coli*

6 – 1 μ l polimerazy DNA Phusion (Thermo Fisher Scientific) w reakcji o objętości 20 μ l w obecności genomowego DNA *E. coli*

Druga z metod ze względu na wysoką czułość umożliwia wykrycie nawet śladowych ilości DNA *E. coli* w analizowanych preparatach białkowych. Jedynie w przypadku dodania genomowego DNA *E. coli* do kontrolnej mieszaniny reakcyjnej powstał produkt PCR o prawidłowej wielkości ok. 500 pz. Uzyskany wynik pozwala zatem na stwierdzenie, że zastosowanie saltonazy [Mat. 6.15, Met. 7.7] w badanych preparatach białkowych było skuteczne, a otrzymane wyniki są porównywalne do wyniku uzyskanego dla komercyjnej polimerazy DNA Phusion [Mat. 6.10].

8.2.4. Oczyszczanie fuzyjnych form polimerazy DNA z pozostałości saltonazy

W celu oczyszczenia fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z pozostałości saltonazy [Mat. 6.15], wykorzystanej do usunięcia genomowego DNA *E. coli* [Met. 7.7], preparaty poddano działaniu wysokiej temperatury w obecności 1 mM DTT (80°C, 15 min), a następnie odwirowano (10 000 rpm) w schłodzonej wirówce [Met. 7.7]. Inkubacja

w wysokiej temperaturze pozwoliła na denaturację nukleazy, co zabezpieczyło fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przed jej niekorzystnym działaniem na powstające produkty PCR w czasie przyszłych reakcji amplifikacji DNA. Uzyskane preparaty białkowe poddano dializie w buforze F [Mat. 6.12.2], trwającej 24 h i zagęszczono z wykorzystaniem kolumn wirowniczych Amicon Ultra-15 o punkcie odcięcia membrany 50 kDa [Mat. 6.14]. Po zagęszczeniu preparatów białkowych zmierzono ich stężenie w kuwecie kwarcowej (długość drogi optycznej 1 cm) przy wykorzystaniu spektrofotometru NanoDrop. W tabeli 52 zostały zebrane wyniki końcowej wydajności otrzymywania badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z 1 litra hodowli bakteryjnej. Ostatnim etapem było dodanie do uzyskanych białek glicerolu do końcowego stężenia 50% oraz pozostałych związków chemicznych (m.in. detergentów oraz stabilizatorów), które powinny zapewnić możliwość długotrwałego przechowywania polimeraz DNA w temperaturze -20°C [Mat. 6.12.2].

Tabela 52. Wydajność otrzymywania fuzyjnych polimeraz DNA z 1 l hodowli bakteryjnej

Nazwa polimerazy DNA	Wydajność [mg białka/l hodowli]	Wydajność [nmol białka/l hodowli]
V1 Pfu-Sso7d-Sso7d	7	66,28
V2 Sso7d-Pfu-Sso7d	12	113,63
V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d	3	23,79
Ref1 Pfu-Sso7d	20	204,47

8.3. Charakterystyka molekularna fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA poddano serii kompleksowych badań pozwalających na ich charakterystykę molekularną, w co najmniej trzech powtórzeniach technicznych i trzech powtórzeniach biologicznych. W pierwszej kolejności wykonano szereg testów pozwalających na określenie ich optymalnych warunków amplifikacji DNA. Polegały one na doborze właściwego buforu reakcyjnego, ustaleniu stężeń wybranych soli (MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄) jakie powinny znajdować się w w/w buforze oraz ustaleniu najkorzystniejszego pH do przeprowadzenia reakcji PCR. Ponadto wykonano eksperymenty dotyczące oznaczenia: jednostek aktywności fuzyjnych polimeraz DNA, minimalnej ilości jednostek pozwalających na wydajną amplifikację DNA, termostabilności, procesywności, szybkości syntezy DNA,

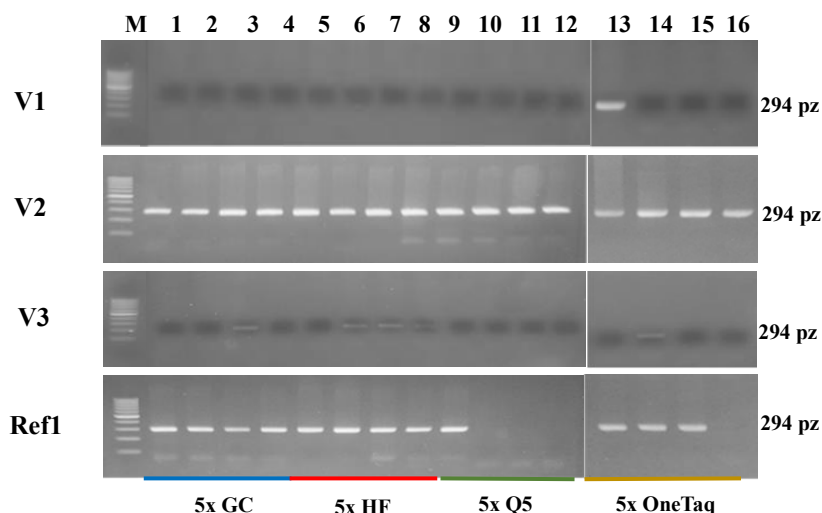
czułości oraz zdolności amplifikacji DNA o dużej zawartości par GC. Dodatkowo zbadano także odporność otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA na popularne inhibitory, stanowiące problem w różnych obszarach diagnostyki molekularnej, takie jak krew pełna EDTA, heparyna, ampicylina, izopropanol, etanol oraz kwasy humusowe. Przeprowadzone analizy miały na celu wskazanie możliwych zastosowań badanych fuzyjnych form polimerazy DNA. Ostatnim etapem badań było określenie oddziaływania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z ssDNA oraz dsDNA.

Wyniki uzyskane dla wszystkich trzech badanych wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d) były porównywane do wyników otrzymanych dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Analizy związane z dokładną charakterystyką unikalnych właściwości enzymów prowadzono z dodatkiem każdej z polimeraz DNA o stężeniu wyjściowym 1 U/ μ l. Założenia wstępne pozwoliły na dokładne przeliczenie używanej w reakcji PCR ilości jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, a także wiarygodne porównanie wyników między wariantami.

8.3.1. Określenie optymalnych warunków amplifikacji DNA fuzyjnych form polimerazy DNA

8.3.1.1. Wstępny dobór optymalnego buforu reakcyjnego

W celu określenia optymalnych warunków amplifikacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA, przeprowadzono szereg reakcji PCR z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie buforów reakcyjnych, takich jak: bufor 5x Phusion HF pH 10 (Thermo Fisher Scientific), bufor reakcyjny 5x Phusion GC pH 10 (Thermo Fisher Scientific), bufor 5x Q5 pH 9,3 (New England Biolabs) oraz bufor 5x OneTaq Standard pH 8,9 (New England Biolabs) [Mat. 6.10]. Rysunek 24 przedstawia wynik rozdziału elektroforetycznego dla otrzymanych produktów PCR. W reakcji zastosowano różne ilości dodawanej polimerazy DNA tzn. 1 μ l, 0,8 μ l, 0,6 μ l, 0,4 μ l, 0,2 μ l [Met. 7.8.2].



Rysunek 24. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla produktów PCR amplifikowanych z wykorzystaniem badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d przy użyciu 4 różnych komercyjnie dostępnych buforów reakcyjnych: 1 – 4 5x bufor GC Phusion, 5 – 8 5x bufor HF Phusion, 9–12 5x bufor Q5, 13 – 16 5x bufor OneTaq Standard [Mat. 6.10, Met. 7.8.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];

M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

1, 5, 9, 13 – 1 μ l fuzyjnej formy polimerazy DNA

2, 6, 10, 14 – 0,8 μ l fuzyjnej formy polimerazy DNA

3, 7, 11, 15 – 0,6 μ l fuzyjnej formy polimerazy DNA

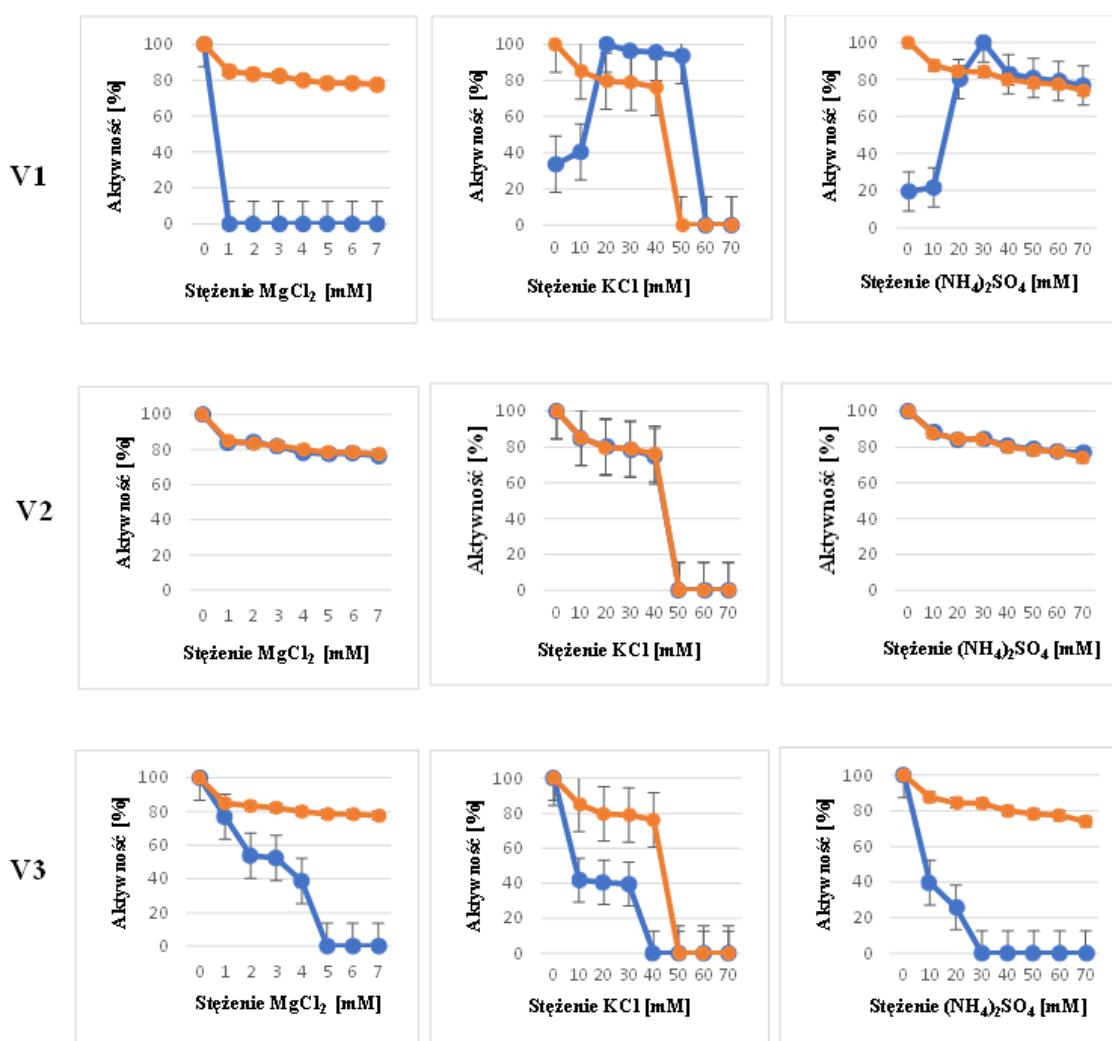
4, 8, 12, 16 – 0,4 μ l fuzyjnej formy polimerazy DNA

Uzyskane wyniki dla badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wskazują na to, że dwa z analizowanych wariantów (V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d) wykazują najwyższą aktywność w buforze 5x HF Phusion [Mat.6.10], podobnie jak referencyjna polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Co istotne, wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d wydajnie amplifikuje DNA w każdym z zastosowanych buforów reakcyjnych. Natomiast wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d wykazuje aktywność jedynie w buforze 5x OneTaq Standard [Mat. 6.10] (rysunek 24). W związku z tym do kolejnych analiz otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano bufor 5x HF Phusion dla wariantów V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d, natomiast dla wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d bufor 5x OneTaq Standard.

8.3.1.2. Dobór optymalnego stężenia chlorku magnezu, chlorku potasu i siarczanu (VI) amonu

W celu doboru optymalnego stężenia soli dla badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA testowano różne zakresy stężeń $MgCl_2$ (0 – 7 mM), KCl (0 – 70 mM)

oraz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0 – 70 mM) w prowadzonych reakcjach PCR [Met. 7.8.2]. Odpowiednio dobrane stężenie tych soli pozytywnie wpływa na wydajność amplifikacji DNA, co może mieć duże znaczenie dla wyników prowadzonych eksperymentów. Istotność stężeń wymienionych powyżej związków chemicznych sprawdzono dla każdego z analizowanych wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Reakcje prowadzono we wcześniej wybranych buforach: 5x HF Phusion dla V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d, natomiast dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d 5x OneTaq Standard [Mat. 6.10, Met. 7.8.2, Wyn. 8.3.1.1]. Zebrane dane zostały przedstawione na wykresach rysunku 25.



Rysunek 25. Wykresy przedstawiające zmiany wydajności amplifikacji DNA dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA pod wpływem dodatku MgCl_2 , KCl , oraz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Wyniki dla wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d odnoszone są do wyników uzyskanych dla Ref1 Pfu-Sso7d. Wartości aktywności fuzyjnych form polimerazy DNA w analizowanych warunkach zostały oznaczone przy pomocy densytometrii z wykorzystaniem programu GelAnalyzer [Met. 7.11] na podstawie rozdzielu elektroforetycznego produktów PCR w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe

[Mat. 6.11]. Pomarańczowe znaczniki odnoszą się do wyników referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, natomiast niebieskie do pozostałych wariantów uzyskanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d [Met. 7.8.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d

Przeprowadzone analizy pozwoliły na określenie optymalnych warunków dla działania uzyskanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [Met. 7.8.2]. Dodatkowo, przeprowadzone badania pozwoliły na oznaczenie zakresu stężeń, które są tolerowane przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. W tabeli 53 zostały zebrane otrzymane wyniki.

Tabela 53. Zakresy optymalnych warunków działania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Optymalne stężenie MgCl ₂ [mM]	0	0-7	0-4	0-7
Optymalne stężenie KCl [mM]	0-50	0-40	0-30	0-40
Optymalne stężenie (NH ₄) ₂ SO ₄ [mM]	0-70	0-70	0-20	0-70

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.3.1.3. Dobór optymalnego zakresu pH i ostatecznego składu buforu reakcyjnego

W celu ustalenia optymalnego zakresu pH i ostatecznego składu buforu reakcyjnego dla działania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, oprócz wcześniej zbadanych buforów komercyjnych (5x HF Phusion, 5x GC Phusion, 5 Q5, 5x OneTaq Standard) zostało przetestowanych także kilka innych, równie znanych na rynku biotechnologicznym buforów [Mat. 6.10]. Przeprowadzone eksperymenty miały za zadanie określić zdolność amplifikacji DNA fuzyjnych polimeraz DNA w szerszym spektrum warunków reakcyjnych niż to dokonano wcześniej [Wyn. 8.3.1.1]. Ponadto miały one wskazać, który wariant fuzyjnej formy polimerazy DNA charakteryzuje się szerokim zakresem tolerancji na heterogeniczny skład komercyjnie dostępnych buforów reakcyjnych, co mogłoby świadczyć o jego uniwersalności i odporności na szeroką gamę stosowanych w nich związków chemicznych o zróżnicowanym stężeniu. Wykonane analizy pozwoliły także na ustalenie optymalnego pH buforów reakcyjnych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Podjęto również działania ustalenia jednego buforu reakcyjnego dla wszystkich otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA. Wyniki

reakcji PCR analizowano z wykorzystaniem 2% żelu agarozowego z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]. W tabeli 54 zostały zebrane wszystkie wyniki.

Tabela 54. Zestawienie wyników reakcji PCR przeprowadzonych w różnych buforach reakcyjnych, w których testowano działanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (+ działa bez względu na stosowane testy diagnostyczne [Mat. 6.9.2], +/- działa tylko w wybranych warunkach reakcyjnych, - nie działa)

Bufor	pH	V1	V2	V3	Ref1
10x Pfu Eurx	8,0	-	+	-	-
10x Taq with KCl	8,8	-	-	-	-
10x Taq with (NH ₄) ₂ SO ₄	8,8	-	+	-	+
10x ThermoPol®	8,8	+	-	+	-
10x TaqNova (NH ₄) ₂ SO ₄	8,8	-	-	-	-
10x TaqNova KCl	8,8	-	-	-	-
5x Q5	9,3	-	+	-	+/-
5x Phusion HF	10,0	-	+	+	+
5x Phusion GC	10,0	-	+	+	+/-
5x OneTaq Standard	8,9	+	+	+/-	+/-
5x Platinum SuperFi II	nd	-	+	-	+
2x Marathon	9,0	-	-	-	-
10x phi29	7,9	-	+	-	-
10x Shark	8,8	-	-	-	-

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

Sprawdzenie wielu komercyjnych buforów reakcyjnych w różnych układach diagnostycznych [Mat. 6.9.2] wykorzystywanych podczas reakcji PCR umożliwiło zweryfikowanie działania fuzyjnych form polimerazy DNA w różnym pH [Mat. 6.10, Met. 7.8.2, Wyn. 8.3.1.3], deklarowanym przez producenta danego buforu. Pozwoliło to na określenie optymalnego zakresu pH i ostatecznego buforu, w którym wydajnie działają otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Co więcej, pozwoliło to na określenie wariantu polimerazy DNA najbardziej odpornego na zmianę warunków reakcyjnych, w tym wypadku jest to wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Mianem najmniej uniwersalnego wariantu polimerazy DNA pod kątem warunków reakcyjnych można określić wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, dla którego udało się uzyskać pozytywny wynik w postaci produktu PCR, jedynie w przypadku dwóch buforów reakcyjnych. W tabeli 55 przedstawiono optymalne zakresy pH dla każdego z wariantów polimerazy DNA.

Tabela 55. Zestawienie optymalnych zakresów pH buforów reakcyjnych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Optymalny zakres pH buforu	8,8 – 8,9	7,9 - 10	8,8 - 10	8,8 - 10

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 Pfu-Sso7d

Na podstawie przeprowadzonych analiz związanych z doбором stężenia soli, pH oraz doбором ostatecznego buforu reakcyjnego udało się ustalić optymalne warunki wydajnej amplifikacji DNA przez otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA [Mat. 6.10, Met. 7.8.2, Wyn. 8.3.1.1, 8.3.1.2, 8.3.1.3]. Ze względu na problemy związane z doбором buforu, w którym działają wszystkie badane fuzyjne formy polimerazy DNA przygotowano 2 różne bufory: A) dla wariantów Ref1 Pfu-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz B) dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d. Tabela 56 przedstawia składy buforów reakcyjnych ustalonych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Skład buforu A ustalono na podstawie informacji zwartych w patencie dla polimerazy Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10] oraz wielokrotnej optymalizacji. Podany skład buforu pozwolił na amplifikację DNA z taką samą wydajnością jak komercyjny bufor reakcyjny 5x HF Phusion. Skład buforu B jest dostępny na stronie producenta buforu czyli firmy New England Biolabs.

Tabela 56. Skład optymalnych buforów reakcyjnych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. A - bufor dla wariantów Ref1 Pfu-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; B- bufor dla wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d

Bufor A		Bufor B	
Składnik	Stężenie [1x]	Składnik	Stężenie [1x]
Tris-HCl pH 10	30 mM	Tris-HCl pH 8,9	20 mM
KCl	10 mM	NH ₄ Cl	22 mM
NH ₄ OAc	10 mM	KCl	22 mM
MgSO ₄	2 mM	MgCl ₂	1,8 mM
Triton X-100	0,1%	IGEPAL® CA-630	0,06%
BSA	0,1 mg/ml	Tween® 20	0,05%

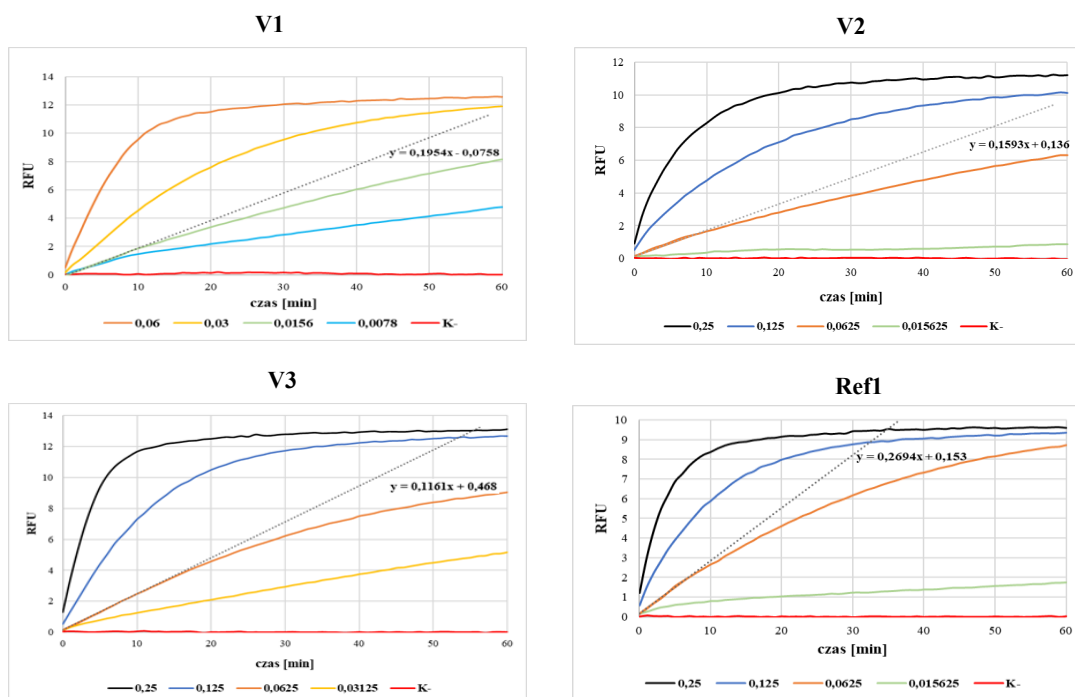
8.3.1.4. Określenie jednostek aktywności fuzyjnych form polimerazy DNA

W celu oznaczenia jednostek aktywności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano komercyjny zestaw o nazwie EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay firmy Biotium [Mat. 6.8]. Przedstawiona przez producenta testu procedura pozwala na przeprowadzenie reakcji amplifikacji DNA w warunkach izotermicznych, z uwzględnieniem temperatury optymalnej dla działania badanej polimerazy DNA [Met. 7.8.3]. Na podstawie wcześniejszych testów dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wybrano temperaturę 72°C. Enzymem referencyjnym, a zarazem kontrolą pozytywną dla prowadzonych reakcji była komercyjna polimeraza DNA Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10] o określonej przez producenta jednostkowości. Temperatura reakcji w przypadku polimerazy DNA Phusion także wynosiła 72°C, co pozwoliło na wykorzystanie uzyskanych wyników do ustalenia krzywej wzorcowej.

Do oznaczenia jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA posłużyła definicja dostępna w literaturze [130] oraz informacje zawarte w ulotce dołączonej przez producenta do komercyjnej polimerazy DNA Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10]. Poniżej treść wykorzystanej definicji:

1 jednostka aktywności polimerazy [1U] to ilość polimerazy DNA, która jest w stanie inkorporować 10 nmol nukleotydów w czasie 30 min w jej optymalnej temperaturze działania [130].

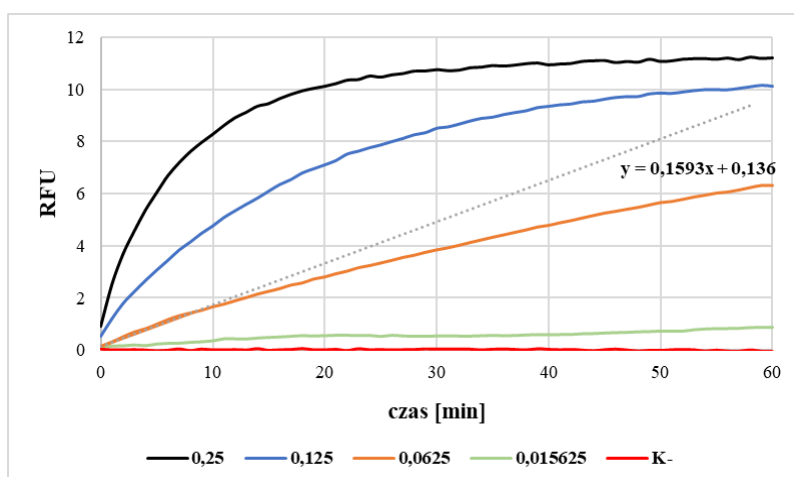
Mając na względzie powyższą definicję można założyć, że jeśli polimeraza DNA jest aktywna to jest w stanie dobudować kolejne nukleotydy, syntetyzując jednocześnie DNA, co z kolei pozwala na stworzenie dwuniciowego produktu PCR, który wchodząc w oddziaływanie z barwnikiem EvaGreen [Mat. 6.15] powoduje wzrost intensywności mierzonej fluorescencji. Dane literaturowe podają [130][131][132], że poziom obserwowanej fluorescencji jest powiązany z aktywnością polimerazy DNA, jednocześnie także z ilością wbudowanych przez nią nukleotydów. Poniżej przedstawione zostały wykresy zależności fluorescencji stosowanego barwnika EvaGreen [Mat. 6.15] od czasu trwania amplifikacji DNA dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (rysunek 26).



Rysunek 26. Wykresy zależności fluorescencji stosowanego barwnika EvaGreen [Mat.6.15] od czasu trwania amplifikacji DNA dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Obok wykresu kolorami określono rozcieńczenia fuzyjnych form polimerazy DNA. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

Na podstawie uzyskanych wyników, które pozwoliły na przygotowanie powyższych wykresów oraz zgodnie z wytycznymi firmy Biotium wyznaczono maksymalną różnicę w sygnale fluorescencji ΔF_{\max} dla stężeń fuzyjnych form polimerazy DNA, kiedy następowało wysycenie układu (tzw. faza *plateau*), a także nachylenie krzywej $\text{tg}\alpha$. Poniżej zostały przedstawione przykładowe obliczenia dla jednego z wariantów tzn. V2 Sso7d-Pfu-Sso7d (rysunek 27). W ten sam sposób wyliczono jednostki aktywności dla każdej z fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA i referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d.

V2



Rysunek 27. Wykres zależności fluorescencji stosowanego barwnika EvaGreen [Mat.6.15] od czasu trwania amplifikacji DNA dla wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA. Obok wykresu kolorami określono stosowane rozcieńczenia fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d

$$\Delta F = tg\alpha \times t = 0,1593 \frac{RFU}{min} \times 30 \text{ min} = 4,779 \text{ RFU}$$

$$\Delta F_{max} = 11,22 \text{ RFU}$$

$$n = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} \times 0,2025 \text{ nmol} = \frac{4,779 \text{ RFU}}{11,22 \text{ RFU}} \times 0,2025 \text{ nmol} = 0,086 \text{ nmol}$$

$$u = n \times \frac{1}{N} = \frac{0,086 \text{ nmol}}{10 \text{ nmol}} = 0,0086 \text{ U w } 0,0625 \mu\text{l polimerazy DNA}$$

Na podstawie powyższych wyliczeń ilość jednostek aktywności dla polimerazy DNA V2 Sso7d-Pfu-Sso7d w 1 μl wynosi:

$$\frac{0,0086 \text{ U}}{0,0625 \mu\text{l}} = 0,14 \frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$$

Na podstawie wielokrotnych testów optymalizacyjnych, podczas których stosowano różne stężenia badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA określono odpowiednie rozcieńczenie preparatu stosowe w prowadzonej reakcji izotermicznej. Do oznaczania jednostkowości, do analizy jednostek aktywności został przygotowany 10-krotnie rozcieńczony preparat badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA, w związku z tym ilość jednostek aktywności w wyjściowym preparacie otrzymanym bezpośrednio po oczyszczeniu oraz zabezpieczeniu go w glicerolu wynosi:

$$0,14 \frac{\text{U}}{\mu\text{l}} \times 10 = 1,4 \frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$$

W tabeli 57 przedstawiono ilość jednostek aktywności w wyjściowych

preparatach enzymatycznych po oczyszczeniu i zabezpieczeniu w glicerolu, dla każdej z analizowanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA i polimerazy DNA referencyjnej.

Tabela 57. Ilość jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d

Nazwa polimerazy DNA		Ilość jednostek aktywności [U/μl]
V1	Pfu-Sso7d-Sso7d	0,31
V2	Sso7d-Pfu-Sso7d	1,40
V3	NeqSSB-Pfu-Sso7d	0,73
Ref1	Pfu-Sso7d	2,77

Uzyskane wyniki dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, pozwoliły jednocześnie na obliczenie specyficznej aktywności dla każdego z analizowanych wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA. Aktywność specyficzna jest wyliczana jako aktywność polimerazy DNA, która jest otrzymana z 1 mg lub 1 nmol białka [133]. Do dalszych analiz każdą z fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA doprowadzono do aktywności wynoszącej 1 U/μl, co umożliwiło wiarygodne porównywanie wyników między sobą i prowadzenie dalszych badań tych enzymów. W tabeli 58 zaprezentowane zostały wyniki aktywności specyficznej fuzyjnych form polimerazy DNA.

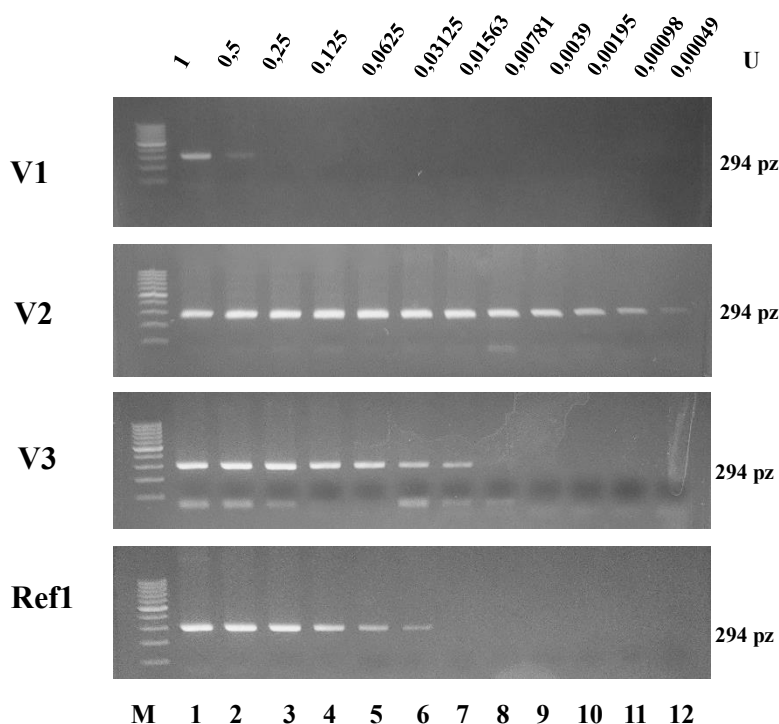
Tabela 58. Zestawienie aktywności specyficznej fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	Aktywność specyficzna	
	[U/mg]	[U/nmol]
V1 Pfu-Sso7d-Sso7d	221	23,39
V2 Sso7d-Pfu-Sso7d	1166,67	123,21
V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d	1216,67	153,43
Ref1 Pfu-Sso7d	1385	135,48

8.3.1.5. Wyznaczenie minimalnej ilości jednostek fuzyjnych form polimerazy DNA w reakcji PCR

W celu określenia minimalnej ilości jednostek aktywności dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, które dodane do reakcji PCR wciąż pozwalają na wydajną amplifikację DNA, wykonano podwójne seryjne rozcieńczenia badanych preparatów [Met. 7.9.1]. Następnie przeprowadzono reakcję PCR z każdym z przygotowanych rozcieńczeń, a uzyskane wyniki sprawdzono z wykorzystaniem 2% żelu agarozowego

z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11] (rysunek 28).



Rysunek 28. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający minimalną ilość jednostek fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA potrzebnych do wydajnej amplifikacji DNA [Met. 7.15.1]. Wartości od 1 do 0,00049 są liczbą jednostek fuzyjnych form polimerazy DNA [U] dodawanej do reakcji PCR. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu to 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11.]

Otrzymane wyniki pozwoliły na określenie minimalnej liczby jednostek pozwalającej na efektywne przeprowadzenie amplifikacji DNA (tabela 59) przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Najbardziej aktywną z fuzyjnych form polimerazy DNA wydaje się być wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, jest on w stanie zamplifikować DNA nawet po rozcieńczeniu wyjściowej ilości stosowanej polimerazy DNA [1 U/ μ l] ponad 2000 razy. Jest to w przybliżeniu 64 razy mniejsza ilość niż w przypadku referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d.

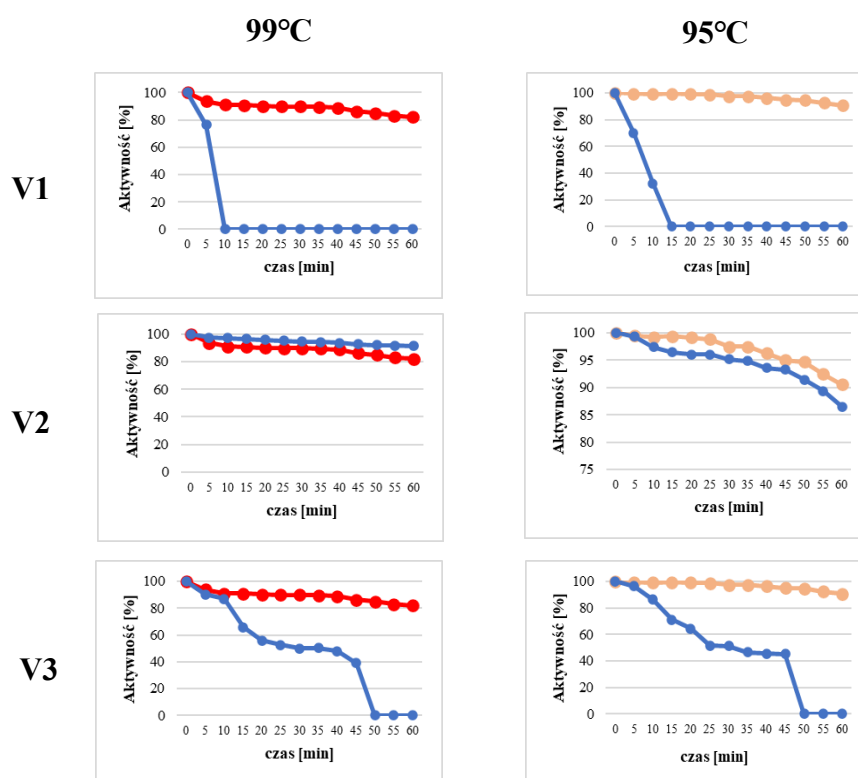
Tabela 59. Zestawienie wyznaczonych minimalnych liczb jednostek dla każdej z fuzyjnych form polimerazy DNA umożliwiających amplifikację DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Minimalna ilość jednostek [U]	0,5	0,00049	0,01563	0,03125

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.3.1.6. Określenie termostabilności i stabilności w temperaturze pokojowej fuzyjnych form polimerazy DNA

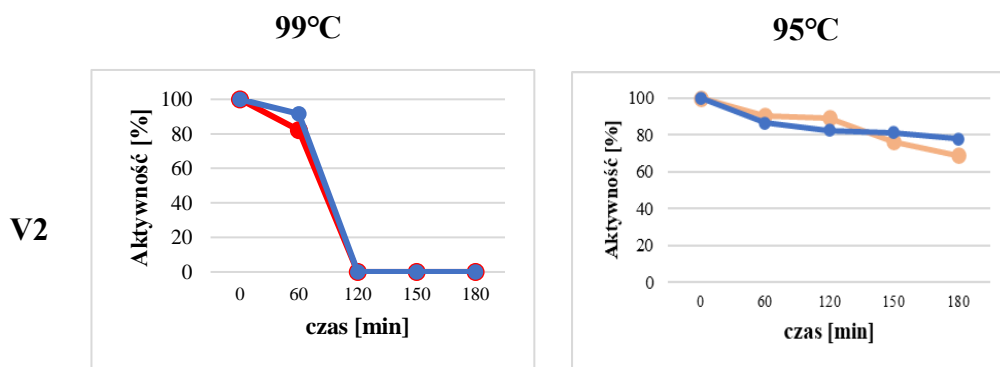
W celu określenia termostabilności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano metodykę opracowaną przez Dąbrowskiego i Kura [33], która została opisana w rozdziale Metody 7.9.2. Każdą z badanych fuzyjnych form polimerazy DNA inkubowano w temperaturze 99°C i 95°C w termocyklerze z pokrywą grzejną ustawioną na temperaturę 105°C, co zapobiega odparowaniu mieszaniny, pobierając próbki w czasie od $t_1 = 0$ min do $t_{13} = 60$ min. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie reakcji real-time PCR z pobranymi w różnych odstępach czasowych próbkami fuzyjnych form polimerazy DNA oraz z dodatkiem barwnika EvaGreen [Mat. 6.15]. Zmiany termostabilności określono na podstawie wydajności powstawania produktu PCR o ustalonej temperaturze topnienia [Met. 7.9.2]. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresach na rysunku 29.



Rysunek 29. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA podczas inkubacji przez określony czas zarówno w 95°C jak i 99°C. Uzyskane wyniki porównywano do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Czerwony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 99°C natomiast niebieski określa zmiany dla pozostałych wariantów, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Pomarańczowy kolor przedstawia natomiast wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 95°C. Kolor niebieski podobnie jak w przypadku ustalania aktywności dla 99°C, oznacza wyniki otrzymane dla wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA. Aktywność określono z wykorzystaniem reakcji

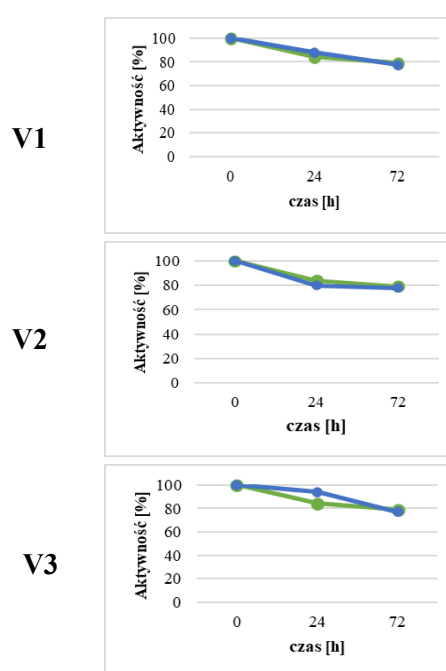
real-time PCR przy użyciu barwnika EvaGreen [Mat.6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu o określonej temperaturze topnienia w zależności od czasu inkubacji w wybranych temperaturach fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

Przeprowadzone analizy dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA jednoznacznie wskazują na wysoką termostabilność zarówno w temperaturze 95°C jak i 99°C w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Uzyskane wyniki są porównywalne z tymi, uzyskanymi dla Ref1 Pfu-Sso7d. Dla Ref1 Pfu-Sso7d oraz dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d czas inkubacji w obu analizowanych temperaturach wydłużono dodatkowo do 3 h [Met. 7.9.2], a uzyskane wyniki zamieszczono na wykresach na rysunku 30. W przypadku wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d w porównaniu z polimerazą referencyjną Ref1 Pfu-Sso7d obserwuje się wyraźny spadek termostabilności w obu testowanych temperaturach (95°C i 99°C). Najmniejszą termostabilność wykazuje wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d. Dokładne analizy uzyskanych wyników umożliwiły określenie czasu półtrwania dla badanych wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d w obu stosowanych temperaturach (tabela 60).



Rysunek 30. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności w trakcie inkubacji w zarówno w 95°C jak i 99°C w czasie do 3 h. Analizę przeprowadzono dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Czerwony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 99°C natomiast niebieski określa zmiany dla wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d. Pomarańczowy kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 95°C. Kolor niebieski podobnie jak w przypadku ustalania dla 99°C, oznacza wyniki otrzymane dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Aktywność określono z wykorzystaniem reakcji real-time PCR z udziałem barwnika EvaGreen [Mat. 6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu PCR o określonej temperaturze topnienia (T_m) w zależności od czasu inkubacji w określonych temperaturach [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d

Przeprowadzono też test, który pozwolił na oznaczenie zmian aktywności badanych fuzyjnych form polimerazy DNA po pozostawieniu ich w temperaturze pokojowej ($T_{pok.}$). Fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA zostały pozostawione na stole laboratoryjnym do 72 h (próbki pobrano po 24 h, a następnie po 72 h). Podobnie jak w przypadku inkubacji w temperaturach 95°C i 99°C, żeby porównać aktywność badanych fuzyjnych form polimerazy DNA w ustalonych warunkach również przeprowadzono reakcję real-time PCR z dodatkiem barwnika EvaGreen [Mat. 6.15]. Zmiany określono na podstawie wydajności powstawania produktu PCR o ustalonej temperaturze topnienia. Na rysunku 31 zaprezentowano wykresy pozwalające na określenie stabilności badanych polimeraz DNA w temperaturze pokojowej ($T_{pok.}$).



Rysunek 31. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA po pozostawieniu ich w temperaturze pokojowej (próbki pobrano po 24 h i 72 h). Uzyskane wyniki porównywano do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Zielony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA, natomiast niebieski określa zmiany aktywności dla pozostałych wariantów, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Aktywność, podobnie jak w przypadku termostabilności w temperaturach 99°C oraz 95°C, ustalono z wykorzystaniem reakcji real-time PCR przy użyciu barwnika EvaGreen [Mat. 6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu PCR o określonej temperaturze topnienia [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

Uzyskane wyniki wskazują na wysoką aktywność wszystkich fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d po inkubacji w temperaturze pokojowej ($T_{pok.}$) przez maksymalny

czas wynoszący 72 h. Otrzymane po 72 h inkubacji w T_{pok} wyniki aktywności dla każdego z wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA są porównywalne z tymi uzyskanymi dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W tabeli nr 60 zaprezentowano czasy półtrwania w 99°C, 95°C oraz T_{pok} dla fuzyjnych form polimerazy DNA.

Tabela 60 Zestawienie wyników czasu półtrwania fuzyjnych form polimerazy DNA w temperaturach: 95°C, 99°C oraz w T_{pok}

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Czas półtrwania w 95°C	10 min	> 3 h	45 min	> 3 h
Czas półtrwania w 99°C	5 min	60 min	45 min	60 min
Czas półtrwania w T_{pok}	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.3.1.7. Wyznaczenie procesywności fuzyjnych form polimerazy DNA

W celu wyznaczenia procesywności badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA skorzystano z metody opracowanej i opublikowanej przez Elshawadfy'a oraz współpracowników [127] [Met. 7.9.3]. Punktem wyjściowym była poniższa definicja:

Procesywność to liczba nukleotydów wbudowywanych w trakcie jednej reakcji katalitycznej z udziałem pojedynczej cząsteczki polimerazy DNA [127].

Reakcję oznaczania procesywności dla fuzyjnych form polimerazy DNA przeprowadzono w taki sposób, by zgodnie z definicją utrzymać odpowiednie warunki do zajścia reakcji tj. umożliwić jednokrotne przyłączenie badanej fuzyjnej formy polimerazy DNA do nici DNA. Reakcję prowadzono w obecności 10-krotnie mniejszej ilości polimerazy DNA, niż we wcześniej przedstawianych reakcjach PCR. Istotne było aby reakcja była prowadzona w obecności tzw. pułapki, czyli substancji wiążącej jony magnezu. Dla badanych w niniejszej pracy fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA jako pułapkę zastosowano heparynę [Mat. 6.15], która jednocześnie posiada większe powinowactwo do polimerazy DNA niż sama polimeraza DNA do DNA [Met. 7.9.3]. Dobór stężenia heparyny oznaczano na podstawie określenia ilości inhibującej amplifikację DNA, którą ustalano dla każdego wariantu otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA [Met. 7.9.7].

Reakcję prowadzono zgodnie z opisem w rozdziale Metody pkt. 7.9.3. Mieszaninę, na którą składała się m.in. badana fuzyjna forma polimerazy DNA, zoptymalizowany bufor reakcyjny, starter (P), matryca (T) oraz barwnik fluorescencyjny EvaGreen [Mat. 6.15] poddano inkubacji w 50°C. Miało to umożliwić polimerazie DNA przyłączenie się do matrycy DNA. Następnie do reakcji dodano heparynę o wcześniej ustalonym stężeniu [Met. 7.9.7], po czym pobrano próbki w czasie $t=0$. Kolejnym krokiem było zainicjonowanie reakcji poprzez dodanie do mieszaniny jonów magnezu [Mat. 6.10]. Tak przygotowane próbki inkubowano w 72°C, ponieważ jest to optymalna temperatura elongacji dla znanej fuzyjnej komercyjnej polimerazy DNA - Phusion (Thermo Fisher Scientific) [Mat. 6.10].

Zadaniem heparyny, której zastosowano zwielokrotnioną ilość w odniesieniu do stosowanych stężeń fuzyjnych polimeraz DNA, było skuteczne zapobieganie ponownemu przyłączeniu się już oddysocjowanej polimerazie DNA do DNA. W ten sposób uniemożliwiła ona także zajście drugiej reakcji katalitycznej. Próbkę fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA do analizy zostały pobrane w różnych odstępach czasowych tzn. przed dodaniem jonów magnezu ($t = 0$ min) oraz od momentu dodania jonów magnezu, które umożliwiły zainicjonowanie reakcji. Tak uzyskane próby umieszczono w aparacie do analizy real-time PCR, w celu detekcji powstałych fragmentów DNA. Ustalenie temperatury topnienia powstałych fragmentów DNA (temperatura została określona z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) było związane z przygotowaniem wcześniej krzywej topnienia dla znanych produktów PCR. Umożliwiło to oznaczenie liczby nukleotydów wbudowywanych przez fuzyjne formy polimerazy DNA. Opisywana metoda została zmodyfikowana, w porównaniu do tej opisywanej przez Elshawadfy'ego oraz współpracowników [127], gdzie analizowano procesywność na podstawie żeli poliakrylamidowych. Metoda real-time PCR jest zdecydowanie dokładniejszą i czulszą metodą.

Na podstawie uzyskanych temperatur topnienia dla produktów markerowych określono procesywność fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Otrzymane wyniki dla polimeraz DNA V1 Pfu-Sso7d-Sso7d V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d porównywano z tymi, które wcześniej uzyskano dla produktów markerowych [Met. 7.9.3] (tabela 31).

Temperatura topnienia produktu PCR, który powstał wskutek działania polimerazy DNA wynosiła dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d – 80,73°C, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d – 82,16 °C, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d – 81,25°C, natomiast dla Ref1 Pfu-Sso7d to 82,06°C.

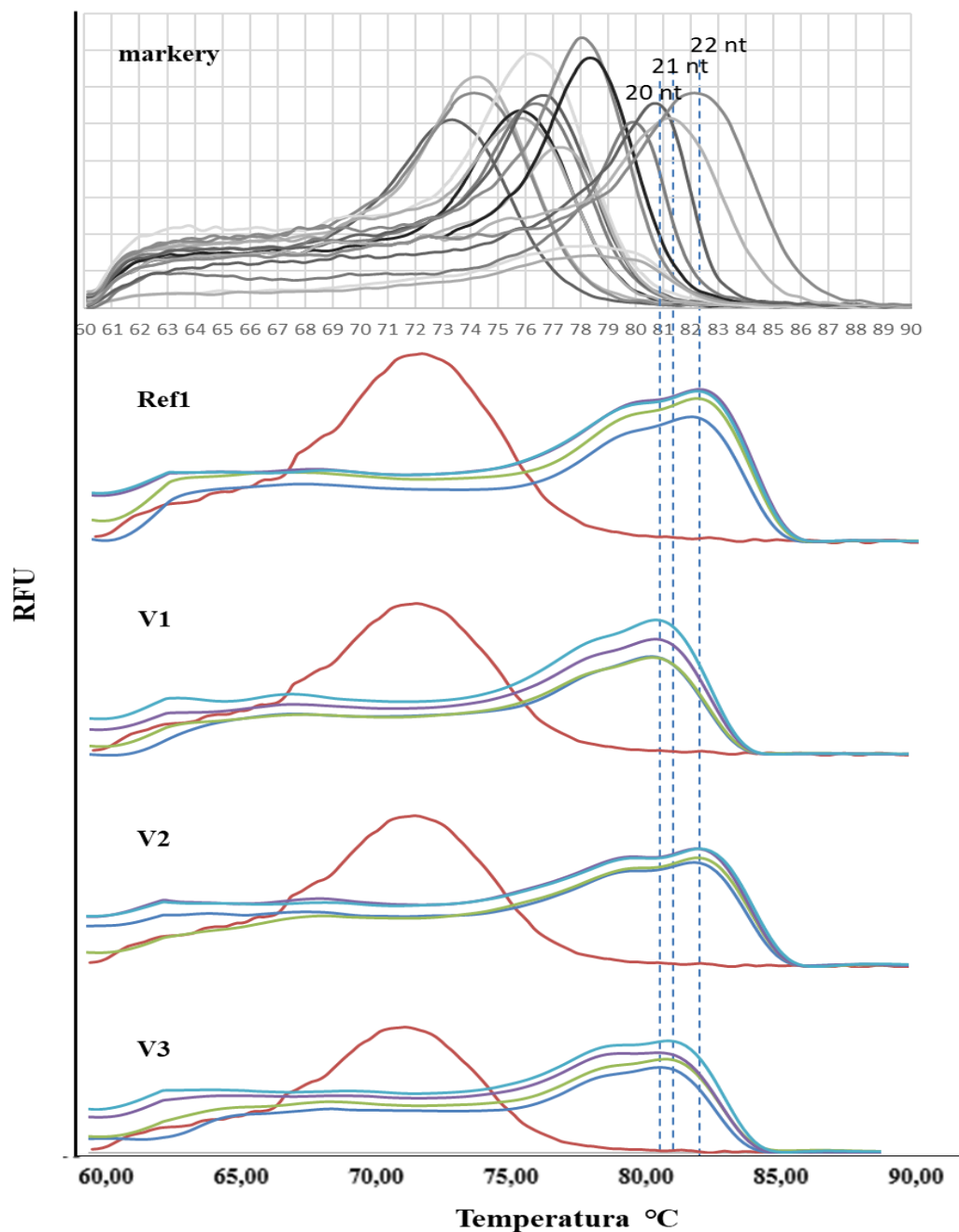
Wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d fuzyjnej polimerazy DNA wykazuje procesywność na tym samym poziomie, co referencja Ref1 Pfu-Sso7d, natomiast pozostałe dwa warianty, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d wykazują obniżoną procesywność w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W trakcie trwania inkubacji nie powstają produkty o wyższych temperaturach topnienia, co pozwala sądzić, że heparyna spełniła rolę „pułapki” i skutecznie związała zarówno oddysocjowane, jak i niezwiązane z matrycą pozostałe cząsteczki badanych polimeraz DNA, co uniemożliwiło przeprowadzenie drugiej reakcji polimeryzacji (rysunek 32).

W tabeli nr 61 przedstawiono temperatury topnienia produktów PCR uzyskane w wyniku działania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA oraz liczbę dobudowanych w czasie trwania reakcji nukleotydów.

Tabela 61. Porównanie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na podstawie określonej temperatury topnienia w odniesieniu do produktów markerowych

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
T_m produktu [°C]	80,73	82,16	81,25	82,06
Liczba dobudowanych nukleotydów [nt]	20	22	21	22

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 Pfu-Sso7d



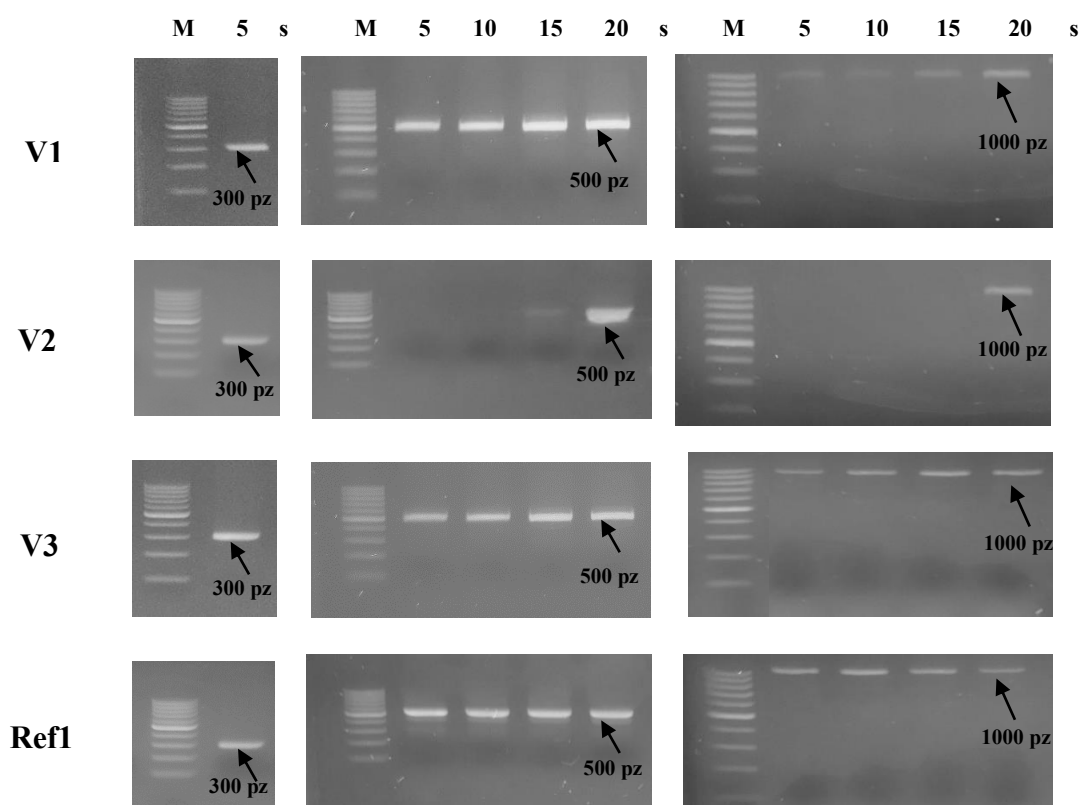
Rysunek 32. Wykresy przedstawiające analizę porównawczą temperatur topnienia dla fragmentów DNA powstałych wskutek prowadzonej izotermicznej reakcji wydłużania przez badane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W górnej części wykresu oznaczono liczbę nukleotydów, o które zostało wydłużone DNA matrycowe. Kolorem pomarańczowym została oznaczona krzywa topnienia odpowiadająca próbkom pobranym w czasie $t = 0$ min tj. przed zainicjowaniem reakcji (obserwujemy krzywą dla dimeru starter-matryca DNA), kolorem granatowym po czasie 30 s od zainicjowania reakcji, kolorem fioletowym po 1 min od zainicjowania reakcji, kolorem zielonym po 2 minutach od zainicjowania reakcji, natomiast kolorem niebieskim po 5 min od zainicjowanej reakcji. Inkubacja po zainicjowaniu reakcji była prowadzona w 72°C [Met. 7.9.3]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.3.1.8. Oznaczenie szybkości syntezy DNA przez fuzyjne formy polimerazy DNA

W celu określenia szybkości syntezy DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA wykorzystano metodę opisaną w publikacji autorstwa Lee i współpracowników [128]. Wykonanie analizy opierało się o poniżej podaną definicję:

Szybkość elongacji określana jest na podstawie ilości nukleotydów wbudowywanych przez dokładnie 1 U polimerazy DNA w czasie 1 sekundy [nt/s].

Analizę szybkości syntezy DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA prowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR w której zastosowano startery (3 pary) [Mat. 6.9.2] umożliwiające powstanie różnej wielkości produktów: 300 pz, 500 pz oraz 1000 pz. Do otrzymania każdego z produktów wykorzystano różne czasy wydłużania od 5 do 20 sekund, zgodnie z warunkami opisanymi w pkt. 7.9.4. rozdziału Metody. Na rysunku 33 przedstawiono wyniki, które uzyskano w trakcie przeprowadzonych reakcji:



Rysunek 33. Wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów PCR o określonej wielkości (300 pz, 500 pz, 1000 pz) uzyskanych przy wykorzystaniu fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami zostały określone zastosowane czasy elongacji dla przeprowadzonych reakcji PCR [Met. 7.9.4]. W reakcji PCR wykorzystano startery: VPS13B F/VPS13B R, oczekiwana wielkość produktu 300 pz; HEMA1 F/ HEMA1 R, oczekiwana wielkość produktu 500 pz oraz pET F/pET R, oczekiwana wielkość produktu 1000 pz. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas

rozdziálu: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Uzyskane wyniki dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wskazują na porównywalne szybkości syntezy DNA dla wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-SSo7d, w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Natomiast wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d wykazuje wydłużenie czasu elongacji podczas otrzymywania produktów o wielkości 500 pz oraz 1000 pz, w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, ale także w odniesieniu do pozostałych wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Zestawienie uzyskanych wyników szybkości syntezy DNA zaprezentowano w tabeli 62.

Tabela 62. Zestawienie uzyskanych wyników dla szybkości elongacji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d

Nazwa polimerazy DNA	300 pz	500 pz	1000 pz	Szybkość elongacji
V1	5 s	5 s	5 s	200 nt/s
V2	5 s	15 s	20 s	50 nt/s
V3	5 s	5 s	5 s	200 nt/s
Ref1	5 s	5 s	5 s	200 nt/s

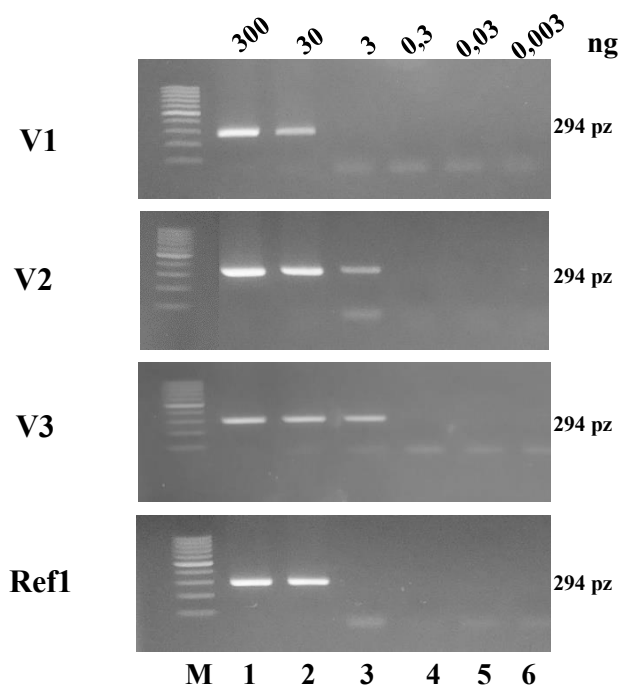
gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.3.1.9. Badanie czułości fuzyjnych form polimerazy DNA

W celu oznaczenia czułości badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wykorzystano metodę opisaną przez Halley'a oraz Prezioso [129]. Według naukowców definicja czułości polimerazy DNA brzmi następująco:

Czułość polimerazy DNA to najmniejsza ilość matrycy DNA, która wciąż pozwala na jej wydajne amplifikowanie w prowadzonej reakcji PCR przez 1 U polimerazy DNA [129] (Halley i Prezioso, 2003).

Badanie czułości dla otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA przeprowadzono z wykorzystaniem genomowego DNA wyizolowanego z krwi psiej [Mat. 6.1, 6.4]. Przygotowanie matrycy DNA do reakcji polegało na wykonaniu seryjnych 10-krotnych rozcieńczeń. Stężenie wyjściowe wynosiło 300 ng/μl [Met. 7.9.5]. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 34.



Rysunek 34. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające analizę czułości fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami oznaczono wykorzystane w reakcji PCR rozcieńczenia genomowego DNA [Met. 7.9.5]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Otrzymane wyniki wskazują na dziesięciokrotnie wyższą czułość fuzyjnych form polimerazy DNA: V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d wykazuje czułość na takim samym poziomie jak referencyjna polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 63.

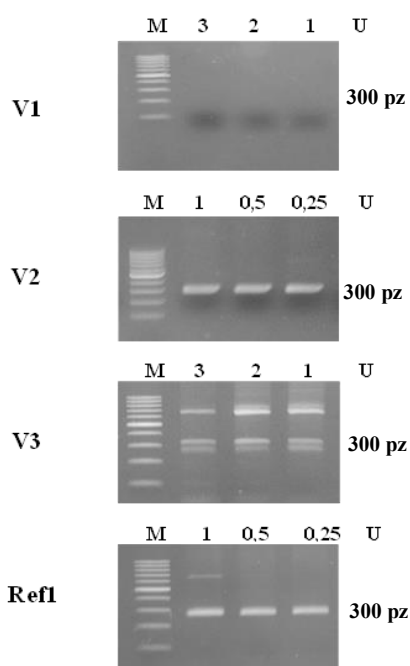
Tabela 63. Wyniki przedstawiające czułość badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Czułość polimerazy DNA	30 ng	3 ng	3 ng	30 ng

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

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

W celu sprawdzenia zdolności amplifikacji sekwencji bogatych w pary GC przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem matrycy wyizolowanej z *Mycobacterium bovis* BCG Moreau PL [Mat. 6.3, Met. 7.9.6]. Amplifikowana sekwencja DNA zawierała ok. 80% par GC, a w jej obrębie znajduje się fragment, gdzie występuje aż 29 nukleotydów G obok siebie. Produkty PCR rozdzielono z wykorzystaniem 2% żelu agarozowego [Met. 7.1.3], a otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 35.



Rysunek 35. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające zdolność amplifikacji matrycy bogatej w pary GC przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami oznaczono liczbę jednostek aktywności [U] fuzyjnej formy polimerazy DNA dodawanej do reakcji PCR [Met. 7.9.6]. W reakcji PCR wykorzystano startery MC15 F/ MC15 R, oczekiwana wielkość produktu 300 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Uzyskane wyniki wskazują na wydajną amplifikację matrycy bogatych w pary GC jedynie przez wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, a wydajność reakcji PCR jest porównywalna do tej uzyskanej z wykorzystaniem referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Jednak w odróżnieniu od wyników uzyskanych dla referencji Ref1 Pfu-Sso7d, w żadnym z zastosowanych warunków nie pojawiają się niespecyficzne produkty PCR. Wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d nie jest w stanie przeprowadzić amplifikacji matrycy bogatej w pary

GC, mimo zwiększenia ilości dodawanych jednostek polimerazy DNA w reakcji. Podobnie sytuacja wygląda dla wariantu V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, jednak w tym wypadku powstaje szereg niespecyficzných produktów PCR, z których żaden nie znajduje się na odpowiedniej wysokości.

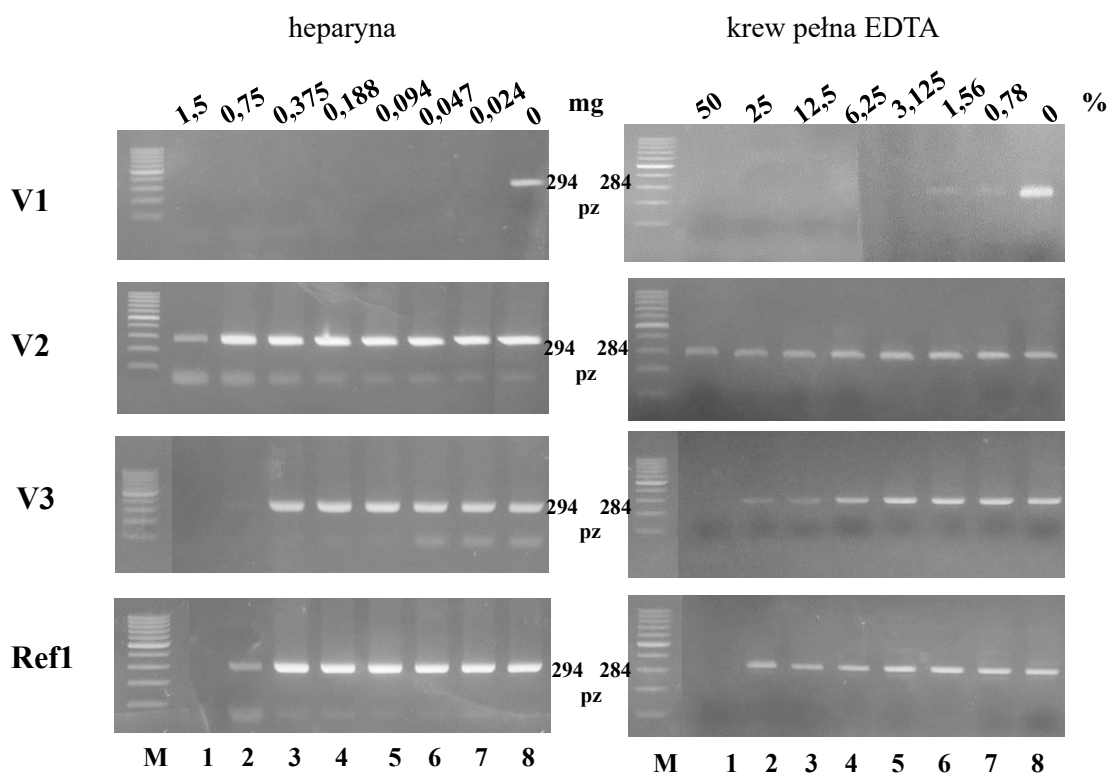
8.4. Porównanie odporności fuzyjnych form polimerazy DNA na popularne inhibitory stanowiące problem w różnych obszarach diagnostyki molekularnej

8.4.1. Zdolność amplifikacji DNA w obecności inhibitora pochodzącego z krwi pełnej oraz krwi pełnej EDTA

W celu sprawdzenia odporności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na inhibitory pochodzące z krwi psiej, przeprowadzono reakcje PCR w obecności ustalonych stężeń wybranych inhibitorów:

1. heparyna – zakres badanych stężeń: 0,024 mg –1,5 mg
2. krew pełna EDTA – zakres badanych stężeń: 0,78% v/v –50% v/v mieszaniny reakcyjnej.

Reakcje prowadzono zgodnie z punktem 7.9.7 opisanym w rozdziale Metody. Otrzymane produkty PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11, Met. 7.1.3]. Wyniki umieszczono na rysunku 36.



Rysunek 36. Wyniki rozdziału elektroforetycznego umożliwiające porównanie wpływu stosowanych inhibitorów: heparyny oraz krwi psiej na wydajność amplifikacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenia dla każdego z wykorzystywanych inhibitorów [Met. 7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz oraz WFFS F/ WFFS R o oczekiwanej wielkości produktu 284 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Przedstawione na rysunku 36 wyniki dowodzą, że najwyższą odporność na oba wykorzystane w analizach inhibitory wykazuje wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Wariant V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d posiada podobne właściwości jak referencyjna polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d nie jest odporny na badane w zastosowanych zakresach stężeń inhibitorów.

W tabeli 64 zostały zebrane szczegółowe zakresy maksymalnych dopuszczalnych stężeń badanych inhibitorów, pozwalających na wydajną amplifikację przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA.

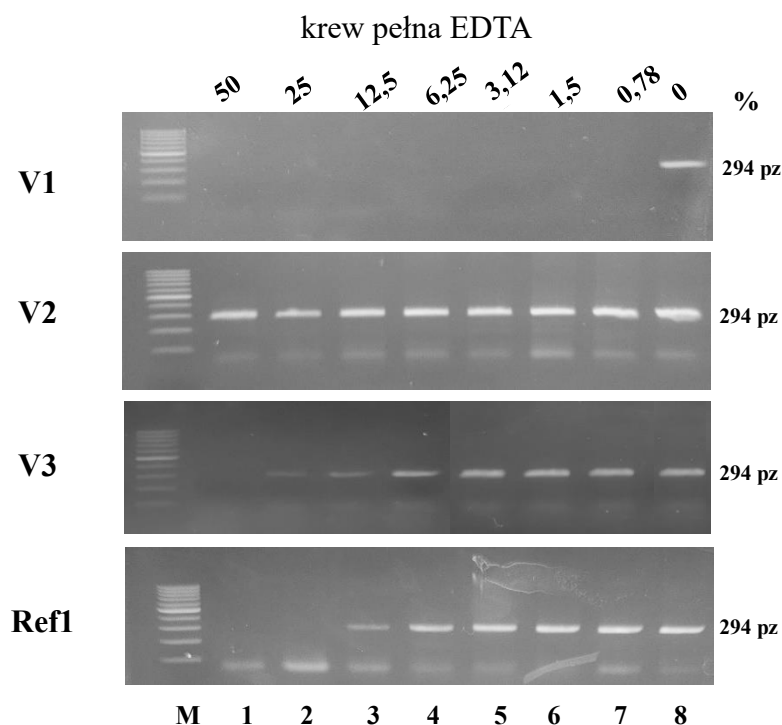
Tabela 64. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń wykorzystywanych inhibitorów w próbce mieszaniny reakcyjnej przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Heparyna [mg/ml]	< 0,024	> 150	70	70
Krew [% v/v]	< 0,78	> 50	25	25

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.4.2. Zdolność amplifikacji DNA w obecności krwi pełnej EDTA jako czynnika pełniącego rolę matrycy oraz inhibitora przez fuzyjne formy polimerazy DNA

W celu określenia zdolności amplifikacji matrycy pochodzącej z krwi przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem krwi pełnej EDTA jako matrycy. Do przeprowadzenia analizy wykorzystano krew psią. Maksymalne stężenie krwi pełnej EDTA stosowanej w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 50% jej objętości [Met. 7.9.7]. Produkty otrzymane w wyniku reakcji PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym [Met. 7.1.3], natomiast uzyskane wyniki zostały przedstawione na rysunku 37.



Rysunek 37. Wyniki rozdziału elektroforetycznego umożliwiające porównanie wpływu krwi pełnej EDTA jako matrycy (jednocześnie inhibitor i źródło matrycy) w reakcji PCR na wydajność amplifikacji przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono

stężenie dodawanej krwi pełnej EDTA do mieszaniny reakcyjnej [Met.7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Uzyskane wyniki wskazują na pełną odporność wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d na zastosowane stężenia krwi pełnej EDTA jako matrycy w reakcji PCR. Obserwowana jest zdolność amplifikacji DNA dla tego enzymu przy co najmniej czterokrotnie wyższym stężeniu krwi niż w przypadku referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, przy czym wzrastające stężenie krwi praktycznie nie wpływa na wydajność amplifikacji DNA w reakcji PCR. Ponadto wariant V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d wykazuje zdolność amplifikacji DNA przy co najmniej dwukrotnie wyższym stężeniu krwi w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Natomiast wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d nie przejawia jakiegokolwiek odporności na inhibitor. W tabeli 65 przedstawiono zestawienie otrzymanych wyników.

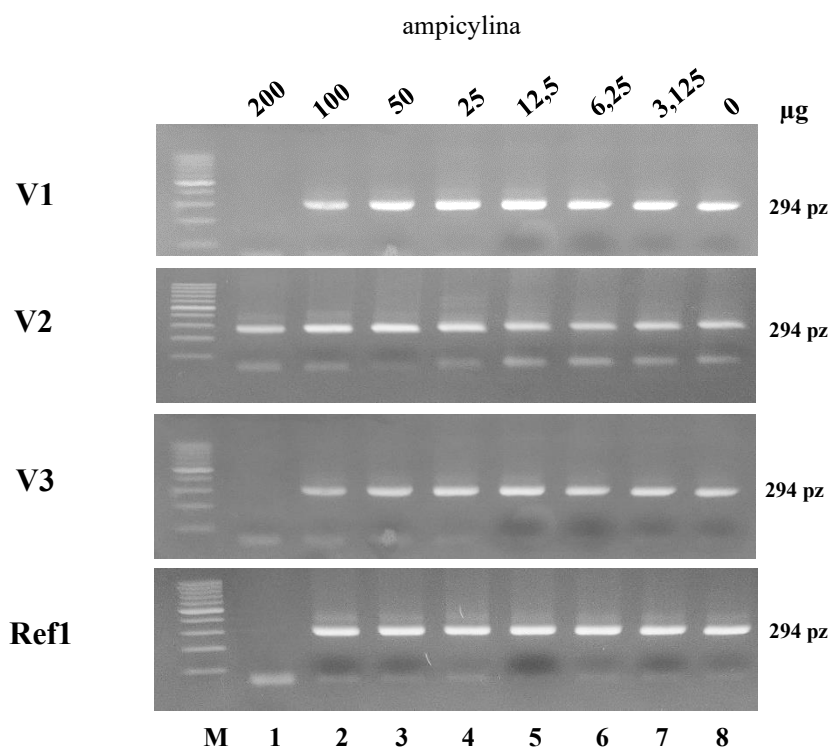
Tabela 65. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń krwi pełnej EDTA wykorzystanej w mieszaninie reakcyjnej przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Krew [% v/v]	< 0,78	> 50	25	12,5

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.4.3. Zdolność amplifikacji DNA w obecności antybiotyku przez fuzyjne formy polimerazy DNA

W celu sprawdzenia zdolności amplifikacji DNA w obecności antybiotyku przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przeprowadzono reakcję PCR z dodatkiem powszechnie stosowanego antybiotyku, jakim jest ampicylina [Mat. 6.15, Met. 7.9.7]. Odporność otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA sprawdzano w zakresie stężeń ampicyliny od 3,125 µg do 200 µg. Podobnie jak w przypadku poprzednich analiz otrzymane produkty PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym [Met. 7.1.3]. Uzyskane wyniki zamieszczono na rysunku 38.



Rysunek 38. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku ampicyliny na wydajność amplifikacji DNA przez otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego antybiotyku do mieszaniny reakcyjnej [Met. 7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiają odporność wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d na co najmniej dwukrotnie wyższe stężenie ampicyliny w porównaniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Odporność na ten antybiotyk dla pozostałych wariantów fuzyjnych formy polimerazy DNA, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d jest porównywalna z wynikiem uzyskanym dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W tabeli 66 zostały przedstawione dokładne zakresy tolerowanych stężeń ampicyliny przez wszystkie testowane warianty fuzyjnych form polimerazy DNA.

Tabela 66. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń ampicyliny w mieszaninie reakcyjnej przez warianty fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA

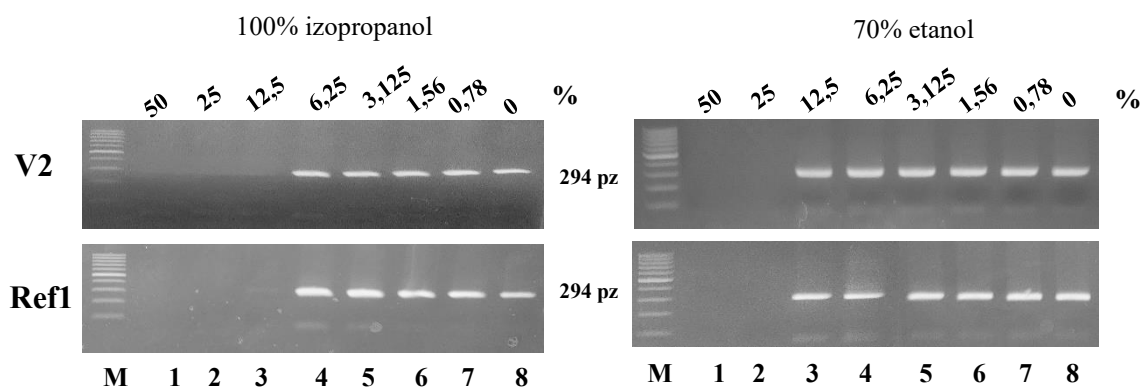
Nazwa polimerazy DNA	V1	V2	V3	Ref1
Ampicylina [µg/ml]	100	> 200	100	100

gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.4.4. Zdolność amplifikacji DNA w obecności izopropanolu oraz etanolu przez fuzyjne formy polimerazy DNA

W celu określenia zdolności amplifikacji DNA w obecności 100% izopropanolu oraz 70% etanolu przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przeprowadzono reakcję PCR z wymienionymi inhibitorami [Met. 7.9.7]. Na podstawie wyników otrzymanych z wcześniej przeprowadzanych badań do analizy został wybrany wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, ze względu na wysoką odporność na wszystkie dotychczas stosowane inhibitory. Te same testy zostały wykonane z wykorzystaniem referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d.

Wybór izopropanolu oraz etanolu jako inhibitorów nie był przypadkowy, ponieważ są to odczynniki powszechnie stosowane podczas izolacji genomowego DNA, w każdym laboratorium diagnostycznym. W przypadku obu inhibitorów zastosowano stężenie od 0,78% do 50% objętości mieszaniny reakcyjnej, podobnie jak w przypadku testów związanych z krwią pełną EDTA. Uzyskane w wyniku przeprowadzonych reakcji PCR produkty rozdzielono w 2% żelu agarozowym. Na rysunku 39 przedstawiono rezultaty przeprowadzonych analiz. W nakładaniu prób na żel agarozowy uwzględniono dodatek większej ilości buforu obciążającego (w skład którego wchodzi glicerol), ze względu na specyfikę prób. Większa ilość glicerolu w przypadku prób uniemożliwiła wypłynięcie ich ze studzienki oraz pozwoliła na uwidocznienie wyników w żelu agarozowym.



Rysunek 39. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku 100% izopropanolu oraz 70% etanolu na wydajność amplifikacji DNA przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego inhibitora do mieszaniny reakcyjnej. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Dzięki przeprowadzonym eksperymentom uzyskano wyniki, które wskazują na porównywalną odporność na zastosowane inhibitory wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Fuzyjna polimeraza DNA V2 Sso7d-Pfu-Sso7d przedstawia taki sam zakres tolerancji na obecność zarówno 100% izopropanolu i 70% etanolu, jak jej referencyjny odpowiednik Ref1 Pfu-Sso7d. W tabeli 67 zaprezentowano zestawienie otrzymanych wyników.

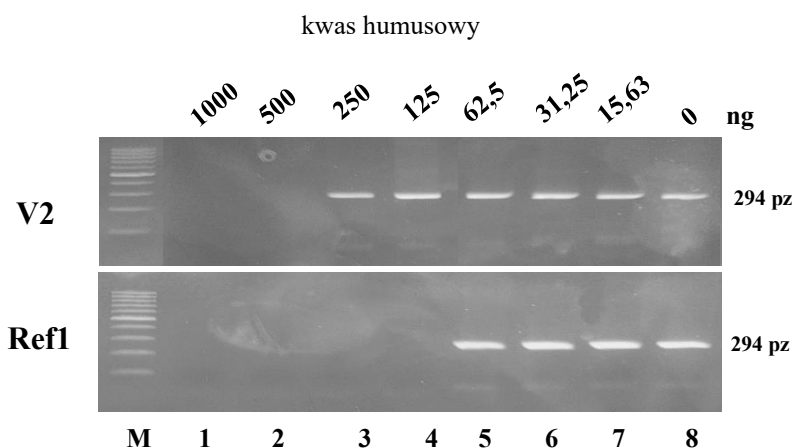
Tabela 67. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń 100% izopropanolu oraz 70% etanolu wykorzystanych w mieszaninie reakcyjnej przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V2	Ref1
100% izopropanol [%]	6,25%	6,25%
70% Etanol [%]	8,75%	8,75%

gdzie V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

8.4.5. Zdolność amplifikacji DNA w obecności kwasu humusowego przez fuzyjne polimerazy DNA

W celu oznaczenia zdolności amplifikacji DNA w obecności kwasu humusowego przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA przeprowadzono reakcję PCR z jego dodatkiem jako inhibitorem często spotykanym w próbkach środowiskowych [Met. 7.9.7]. Sprawdzono efekt działania kwasu humusowego na wydajność amplifikacji DNA w zakresie stężeń od 15,63 ng do 1000 ng. Uzyskane po reakcji PCR produkty rozdzielono w 2% żelu agarozowym [Met. 7.1.3]. Na rysunku 40 zamieszczono otrzymane wyniki.



Rysunek 40. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku kwasu humusowego na wydajność amplifikacji DNA przez wybrane fuzyjne formy archealnej

polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego inhibitora do mieszaniny reakcyjnej [Met. 7.15.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Otrzymane wyniki analizy elektroforetycznej wskazują na odporność wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d na co najmniej czterokrotnie wyższe stężenie kwasu humusowego w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W tabeli 68 zaprezentowano podsumowanie uzyskanych wyników.

Tabela 68. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń kwasu humusowego w mieszaninie reakcyjnej przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	V2	Ref1
Kwas humusowy [mg/ml]	0,25	0,0625

gdzie V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

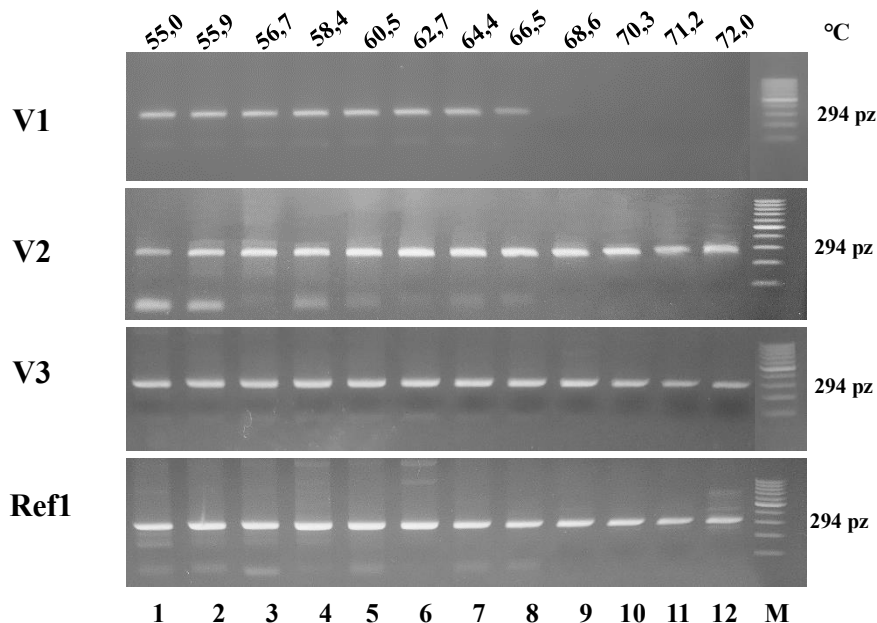
8.5. Oddziaływanie badanych fuzyjnych form polimerazy DNA z kwasami nukleinowymi

W celu ustalenia oddziaływań otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z dsDNA oraz z ssDNA, przeprowadzono test EMSA, który został opisany w pkt. 7.9.9 rozdziału Metody. Dodatkowo określono także wpływ białek wiążących DNA na hybrydyzację wybranych oligonukleotydów do matrycy DNA [Met. 7.9.8].

8.5.1. Wpływ fuzyjnych form polimerazy DNA na amplifikację DNA w zmiennych temperaturach hybrydyzacji starterów

Jedną z najważniejszych właściwości białek partnerskich stosowanych do tworzenia kowalencyjnych fuzji z polimerazami DNA jest ich zdolność do oddziaływania z różnymi formami kwasów nukleinowych, a co się z tym zazwyczaj łączy zdolność stabilizacji DNA. Białko wiążące DNA może pozytywnie wpływać na proces przyłączenia oligonukleotydu do matrycy w czasie reakcji PCR, co skutkuje zdolnością hybrydyzacji w szerokim zakresie temperatur [94]. W celu określenia wpływu fuzyjnych enzymów na w/w etap reakcji PCR przeprowadzono amplifikację DNA w szerokim spektrum temperatur przyłączania starterów od 55°C do 72°C [Met. 7.9.8]. Do przeprowadzenia zaplanowanej reakcji PCR wykorzystano genomowe DNA wyizolowane z krwi psa, niezbędne do amplifikacji fragmentu genu *SOD1* (produkt PCR

o długości 294 pz). Jedynym elementem zmiennym w reakcji PCR była temperatura hybrydyzacji starterów, którą ustawiono w termocyklerze w postaci gradientu temperaturowego w zakresie od 55°C do 72°C [Met. 7.9.8]. Na rysunku nr 41 przedstawiono otrzymane rezultaty.



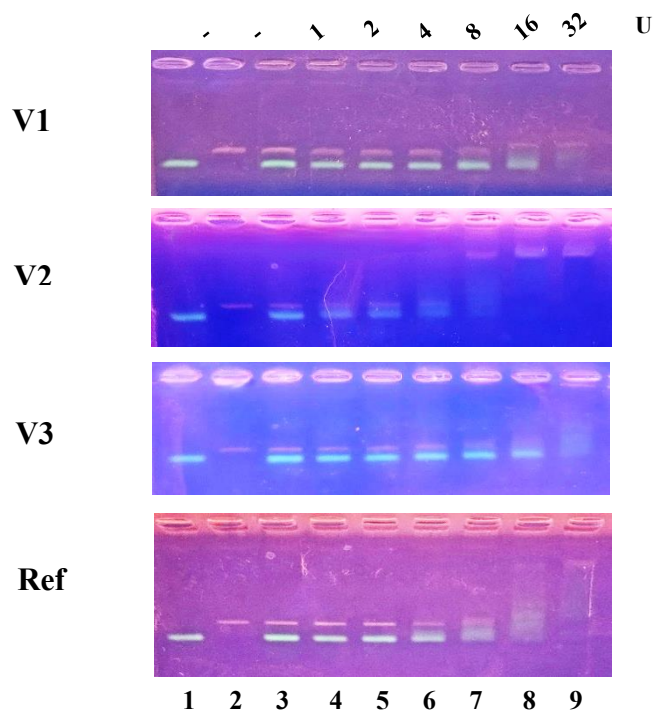
Rysunek 41. Wyniki rozdzielania elektroforetycznego przedstawiające wpływ zmiennej temperatury hybrydyzacji starterów na amplifikację genu *SOD1* przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.9.8]. Wykorzystane w reakcji PCR startery to DM2 F/DM2 R, a oczekiwana wielkość produktu to 294 pz. Nad studzienkami umieszczono temperatury, które zastosowano podczas hybrydyzacji starterów w reakcji PCR. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzielania: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]

Uzyskane wyniki dowodzą, że zarówno wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d są w stanie efektywnie przeprowadzić reakcję PCR w pełnym zakresie badanych temperatur od 55°C do 72°C mimo tego, że optymalna wyliczona przy pomocy algorytmu OligoAnalyzer temperatura przyłączania wybranych starterów wynosi 65°C. Wyniki te są porównywalne z otrzymanymi dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Jedynie w przypadku wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d zakres temperatur, w których wydajnie powstaje produkt PCR jest bardzo ograniczony i wynosi od 55°C do 66,5°C. Obecność w fuzyjnych polimerazach DNA dodatkowych białek posiadających zdolność wiązania kwasów nukleinowych prawdopodobnie umożliwia stabilizację jednoniciowego DNA lub powstającej w trakcie hybrydyzacji dwuniciowej struktury złożonej z matrycy i komplementarnego do niej startera. Te właściwości pozwalają prowadzić amplifikacji DNA bez potrzeby optymalizacji temperatury

przyłączania starterów, co może znacząco skrócić czas walidacji reakcji PCR.

8.5.2. Analiza oddziaływania fuzyjnych form polimerazy DNA z jedno- i dwuniciowym DNA

W celu sprawdzenia zdolności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA do wiązania jedno- oraz/lub dwuniciowego DNA wykonano test EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay). Przygotowanie eksperymentu odbyło się według protokołu opisanego w punkcie 7.9.9 Metod i opracowanego wcześniej przez zespół dr hab. inż. Marcina Olszewskiego prof. uczelni jako test dwubarwny pozwalający zaobserwować preferencję oddziaływania białka z ssDNA lub dsDNA, na bazie tworzonych kolorowych kompleksów, po raz pierwszy zaobserwowanych w przypadku białka NeqSSB [111]. Barwa zielona pochodzi od fluorescencyjnie znakowanego oligonukleotydu d(T)₇₆ [Mat. 6.15] lub jego kompleksu z badanym białkiem fuzyjnym. W kolorze różowym, który powstał na skutek dodania bromku etydyny, widoczny jest produkt PCR o długości 191 pz uzyskany dzięki wykorzystaniu starterów Drd4a F i Drd4a R lub jego kompleksy z fuzyjną polimerazą DNA. Na rysunku 42 zaprezentowano wyniki rozdziału elektroforetycznego [Met. 7.1.3] dla przeprowadzonego eksperymentu kompleksowania dwóch różnych postaci DNA z fuzyjnymi polimerazami DNA.



Rysunek 42. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające rezultaty testu EMSA w obecności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z ssDNA oraz dsDNA [Met. 7.9.9]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; Mieszanina nakładana na żel zawierała 10 pmol fluorescencyjnie znakowanego oligonukleotydu d(T)₇₆ [Mat. 6.15] oraz 2,5 pmol produktu PCR o długości 191 pz

1. d(T)₇₆
2. 191 pz
3. d(T)₇₆ + 191 pz
4. d(T)₇₆ + 191 pz + 1 U fuzyjnej polimerazy DNA
5. d(T)₇₆ + 191 pz + 2 U fuzyjnej polimerazy DNA
6. d(T)₇₆ + 191 pz + 4 U fuzyjnej polimerazy DNA
7. d(T)₇₆ + 191 pz + 8 U fuzyjnej polimerazy DNA
8. d(T)₇₆ + 191 pz + 16 U fuzyjnej polimerazy DNA
9. d(T)₇₆ + 191 pz + 32 U fuzyjnej polimerazy DNA

Wyniki testu EMSA wskazują na zwiększoną zdolność wiązania zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA jedynie przez wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Jednocześnie warto zauważyć, że wariant ten wiąże dsDNA już przy 8 U, a ssDNA przy 16 U, co świadczy o jego preferencji wiązania najpierw dwuniciowego DNA, podobnie jak ma to miejsce w przypadku białka referencyjnego, przy czym nie udało się dla tego ostatniego związać całkowitej ilości oligonukleotydu, a w pełni wysycony kompleks z produktem PCR powstaje dopiero przy dodaniu maksymalnej ilości białka (32 U). Najmniejszą zdolnością wiązania obu form DNA charakteryzuje się wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d. W przypadku

wariantu V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d nastąpiło częściowe zmniejszenie oddziaływania z ssDNA i dsDNA w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA, jednakże białko to nieco lepiej wiąże się z kwasami nukleinowymi niż wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, przy czym nie udało się zaobserwować całkowitego wiązania obu form kwasów nukleinowych.

Tabela 69. Zestawienie zbadanych cech fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	pH	Bufory	Minimalna liczba jednostek pozwalających na wydajną amplifikację [U]	Termostabilność			Procesywność [nt]	Czułość [ng/μl]	Wydajność amplifikacji matryc bogatych w pary GC	Szybkość syntezy [nt/s]	Hybrydyzacja starterów [°C]
				99 [min]	95 [min]	T _{pok} [h]					
V1	8,8 – 8,9	2	0,5	5	10	>72	20	30	brak	200	55-66,5
V2	7,9 - 10	8	0,00049	> 60	>180	>72	22	3	tak	50	55-72
V3	8,8 - 10	2/3	0,01563	45	45	>72	21	3	brak	200	55-72
Ref1	8,8 - 10	3/5	0,03125	> 60	>180	>72	22	30	tak	200	55-72

,gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

	wartości dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 oraz niezmienione w odniesieniu do niej
	parametry, które uległy poprawie
	parametry, które uległy pogorszeniu

Tabela 70. Porównanie odporności na inhibitory fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA

Nazwa polimerazy DNA	Heparyna [mg/ml]	Krew pełna EDTA		Ampicylina [μg/ml]	Izopropanol 100% [%] v/v	Etanol 70% [%] v/v	Kwas humusowy [mg/ml]
		jako inhibitor [%] v/v	jako matryca i inhibitor [%] v/v				
V1	< 0,024	< 0,78	< 0,78	100	n.d.	n.d.	n.d.
V2	> 150	> 50	> 50	> 200	6,25	12,5	0,25
V3	70	25	25	100	n.d.	n.d.	n.d.
Ref1	70	25	12,5	100	6,25	12,5	0,0625

,gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d

	wartości dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 oraz niezmienione w odniesieniu do niej
	parametry, które uległy poprawie
	parametry, które uległy pogorszeniu

9. Wnioski i dyskusja

Postęp cywilizacyjny miał ogromny wpływ na rozwój różnych dziedzin nauki, zwłaszcza w XXI wieku. Diagnostyka molekularna to obecnie najszybciej rozwijający się dział medycyny oraz biologii. Badania oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych nabierają w dzisiejszych czasach szczególnie ważnego znaczenia, umożliwiając szybkie wykrycie wielu chorób, jak również predyspozycji genetycznych. PCR czyli łańcuchowa reakcja polimerazy jest podstawową techniką diagnostyki molekularnej typu NAAT (ang. Nucleic Acid Amplification Test). Zdarzenia epidemiologiczne związane z gwałtownym rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych w ostatnich latach, w tym pandemia wirusa SARS-CoV-2, miały ogromny wpływ na rynek biotechnologiczny, zwłaszcza na błyskawiczny rozwój sektora diagnostyki molekularnej, czego konsekwencją jest wzmożony popyt na białka oddziałujące z kwasami nukleinowymi, w szczególności polimerazy DNA. Intensyfikacja badań nad uzyskaniem coraz bardziej wydajnych i odpornych na inhibitory enzymów tego rodzaju stanowi główne zainteresowanie wielu grup badawczych oraz czołowych firm biotechnologicznych na całym świecie. Z uwagi na powyższe, celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie, charakterystyka oraz zastosowanie zupełnie nowych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, które mogłyby wykazywać lepsze właściwości niż ich dotychczas opisane w literaturze odpowiedniki.

Modele badawcze, tj. polimeraza DNA Pfu oraz białka wiążące DNA czyli Sso7d i NeqSSB, wykorzystane w prezentowanej rozprawie doktorskiej, wybrane zostały ze względu na swoje unikalne cechy, takie jak m. in. wysoka termostabilność oraz potencjalna odporność na wybrane inhibitory.

W ramach niniejszej pracy zaprojektowano i otrzymano konstrukty genetyczne kodujące referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d, jak też trzy fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA tzn. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Wszystkie konstrukty, poza referencyjną polimerazą DNA Ref1 Pfu-Sso7d, zawierały dwie różne sekwencje łączników składających się z 6-ciu reszt aminokwasowych. Pierwszy łącznik o skróconej nazwie Ł1 i sekwencji aminokwasowej Gly-Gly-Val-Asp-Met-Ile zastosowano na N-końcu polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d dla wariantów V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz na C-końcu referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d dla wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d.

Natomiast drugi łącznik o skróconej nazwie Ł2 i sekwencji aminokwasowej Gly-Ser-Gly-Gly-Asp-Val zastosowano na C-końcu polimerazy DNA *P. furiosus*, czyli w celu otrzymania referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Wykorzystanie łączników umożliwiło kowalencyjne powiązanie wybranych białek wiążących DNA tzn. NeqSSB oraz Sso7d z referencyjną polimerazą DNA Ref1 Pfu-Sso7d, w sposób pozwalający na optymalne wzajemne zachowanie dystansu pomiędzy połączonymi białkami, a zarazem zapewniający elastyczność, dzięki obecności niewielkich reszt aminokwasowych takich jak glicyna, seryna, walina czy izoleucyna.

Elementy łącznikowe wykazują coraz większe znaczenie w konstrukcji stabilnych, bioaktywnych białek fuzyjnych [134]. Ogólne właściwości i skład aminokwasowy linkerów pochodzących z naturalnie występujących białek wielodomenowych można uznać za punkt wyjścia w projektowaniu ich nowych rekombinowanych wariantów [134]. Łączniki zaprojektowane *in silico* dzieli się na 3 kategorie w zależności od ich cech strukturalnych, tzn. wyróżnia się linkery: elastyczne, sztywne i rozszczepialne *in vivo*. Poza podstawową rolę integrowania ze sobą domen funkcjonalnych (jak w elastycznych i sztywnych linkerach) lub uwalniania wolnych domen funkcjonalnych *in vivo* (jak w linkerach rozszczepialnych *in vivo*), łączniki mogą oferować wiele innych korzyści w produkcji białek fuzyjnych, takich jak poprawa aktywności biologicznej, zwiększenie wydajności ekspresji i uzyskanie pożądanych profili farmakokinetycznych [134]. Dodatkowo obecność linkera pomiędzy dwoma białkami w przeciwieństwie do sztywnego lub bezpośredniego łączenia białek bez linkera, jest w stanie zapewnić dołączonemu partnerowi fuzyjnemu, jak np. wykorzystanemu w niniejszej pracy białku NeqSSB lub Sso7d, pewną swobodę wiązania z substratem, zapewniając jednocześnie odpowiedni dystans względem polimerazy DNA. Pozwala to na uniknięcie zawady sterycznej, która mogłaby zaburzyć proces oddziaływania z DNA oraz jego amplifikację [101].

Kolejny etap pracy dotyczył produkcji, oczyszczania i charakterystyki trzech fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA oraz polimerazy DNA stanowiącej referencję. Zbadanie potencjalnych zastosowań otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wskazało właściwy kierunek modyfikacji enzymów, takich jak polimerazy DNA w celu uzyskania unikalnych właściwości w odniesieniu do popularnych komercyjnych odpowiedników.

Przeprowadzając dogłębną analizę właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA,

niniejsza praca doktorska miała na celu poszerzenie zakresu wiedzy dotyczącej tego enzymu i dostarczenie cennych spostrzeżeń naukowcom oraz praktykom zajmującym się amplifikacją DNA. Przedstawione wyniki badań i wyciągnięte wnioski mogą przyczynić się do udoskonalenia technik opartych na fuzyjnych polimerazach DNA, co w konsekwencji powinno przełożyć się na poprawienie ich wydajności, szybkości, czułości, dokładności oraz znalezienie szerszego zastosowania w biologii molekularnej. Realizowane prace były częścią projektu Młodych Naukowców pt.: „Fuzyjna polimeraza DNA z białkami wiążącymi jedno- i dwuniciowe DNA – produkcja, charakterystyka i zastosowanie w trudnych reakcjach PCR”, nr projektu 539-D000-B954-22. Dodatkowo prezentowana rozprawa doktorska ma wysoce aplikacyjny charakter, co zostało potwierdzone wynikami uzyskanymi w eksperymentach z udziałem próbek klinicznych.

Polimerazy DNA to niezwykle istotne enzymy zaangażowane w metabolizm kwasów deoksyrybonukleinowych, które m.in. syntetyzują komplementarne nici DNA na bazie istniejącej matrycy w komórkach każdego żywego organizmu. Polimerazy DNA są szeroko stosowane w różnych technikach molekularnych, opartych na manipulacji DNA, w tym między innymi łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), klonowaniu molekularnym, sekwencjonowaniu, znakowaniu DNA i mutageniezie [135][136][1]. Wiele termostabilnych polimeraz DNA zostało wyizolowanych i zbadanych u prokariotów [137][138][139][140][141]. Ze względu na dużą różnorodność strukturalną polimeraz DNA dokonano ich podziału na osiem rodzin: A, B, C, D, X, Y, RT i AEP [136][1]. Większość polimeraz DNA stosowanych w reakcji PCR należy do rodziny A i B polimeraz DNA, pochodzących z bakterii termofilnych i archeonów. Każda polimeraza DNA wykorzystywana w reakcji amplifikacji materiału genetycznego powinna posiadać cechy ważne m.in. z punktu widzenia samego procesu, ale i końcowego przeznaczenia zamplifikowanego DNA – np. klonowania DNA i diagnostyki molekularnej. Do najbardziej istotnych właściwości zalicza się: termostabilność, szybkość wydłużania DNA, wierność, procesywność, specyficzność, odporność na zanieczyszczenia i inhibitory, możliwość dołączania zmodyfikowanych nukleotydów i zdolność korektorską związaną z posiadaniem aktywności nukleolitycznej. Polimerazy DNA rodziny A bakterii rodzaju *Thermus* nadal należą do najczęściej używanych w diagnostyce molekularnej i dotyczą przede wszystkim powszechnie stosowanej polimerazy DNA Taq pochodzącej z *T. aquaticus*, uważanej za enzym referencyjny. Z innych gatunków bakterii rodzaju *Thermus* wyizolowano oraz

scharakteryzowano szereg polimeraz DNA, w dużej mierze o podobnych właściwościach do białka referencyjnego Taq, w tym polimerazy DNA: Tfi z *T. filiformis*, Tfl z *T. flavus*, Tbr z *T. brockianus*, Tca z *T. caldophilus* i Tth z *T. thermophilus*. Niewielkie różnice w sekwencjach aminokwasowych polimeraz DNA pochodzących z tego samego rodzaju mikroorganizmu, ale różnego gatunku mogą skutkować drastycznymi zmianami ich właściwości, co sugeruje, że możliwe jest otrzymanie polimeraz DNA o ulepszonej funkcjonalności [135]. Ponadto polimerazy DNA rodziny A z innych termofilnych bakterii zostały wyizolowane i wdrożone do komercyjnej sprzedaży, jak chociażby z rodzaju *Thermotoga*, np. polimeraza DNA Tma z *T. maritima* i polimeraza DNA Tne z *T. neapolitana* [99]. Pomimo stale wzrastającej liczby modyfikowanych, a zarazem dostępnych komercyjnie polimeraz DNA, wciąż istnieje ogromne zapotrzebowanie na enzymy o nowych cechach [142], a niniejsza praca wskazuje na jeden z możliwych kierunków modyfikacji polimeraz DNA.

Polimeraza DNA Pfu pochodząca z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus furiosus* jest znacznie bardziej termostabilna niż polimeraza DNA Taq [143], dlatego jej modyfikacje cieszą się coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców. Efektywna amplifikacja DNA w reakcji PCR wymaga polimerazy DNA, która jest nie tylko wysoce termostabilna, ale także charakteryzuje się dużą wiernością i szybkością syntezy DNA. Zdolność polimerazy DNA do przeprowadzania syntezy DNA bez dysocjacji od matrycy nazywana jest procesywnością. Definiuje się ją jako średnią liczbę nukleotydów wbudowanych przez cząsteczkę polimerazy DNA w trakcie jednej reakcji katalitycznej [144][145]. Wysoka procesywność i wierność to podstawowe cechy polimerazy DNA, które skracają czas wydłużania i umożliwiają bezbłędną amplifikację długich fragmentów DNA [144]. Istotnym parametrem jest też czułość, która pozwala na wydajną amplifikację DNA przy użyciu minimalnej ilości matrycy [10]. Wszystkie wymienione cechy odnoszą się m.in. do polimerazy DNA Pfu, dlatego jej różne modyfikacje, w tym fuzyjne formy znajdują się od wielu lat w kręgu zainteresowań różnych zespołów badawczych.

Najbardziej znaną techniką opartą na polimerazie DNA jest reakcja PCR, która stanowi podstawowe narzędzie amplifikacji DNA [146]. Zwiększenie szybkości oraz procesywności stosowanej polimerazy DNA wpływa na efektywność reakcji PCR podczas analizy genetycznej, klonowania i diagnostyki. W wielu doniesieniach naukowych coraz częściej zwraca się uwagę na potrzebę pozyskiwania

zmodyfikowanych polimeraz DNA o ulepszonych właściwościach do reakcji PCR. Elshawadfy i współpracownicy wykazali, że połączenie domen białkowych o pożądanых cechach z kilku polimeraz DNA w jeden enzym chimeryczny może zwiększyć zarówno szybkość, jak i procesywność podczas reakcji PCR [127]. Podobnie Yamagami i in. tworzą nowe polimerazy DNA poprzez zamianę domen związanych z miejscem aktywnym polimerazy DNA występujących u organizmów bytujących w gorących źródłach w celu selekcji hybrydowych polimeraz DNA o pożądanых właściwościach [147].

Polimerazy DNA są kluczowymi narzędziami w biotechnologii molekularnej, umożliwiającymi wydajną, szybką i dokładną amplifikację DNA, jednak wiele pożądanых cech tych enzymów, jak zostało to już wyżej omówione, nie jest obecna w natywnych formach polimeraz DNA. Nowe lub ulepszone właściwości można wprowadzić poprzez mutagenezę lub tworzenie chimer białkowych. Inżynieria genetyczna pozwoliła na otrzymanie polimeraz DNA, które tolerują ekstremalne warunki lub obecność inhibitorów w znaczących stężeniach [1]. Niniejsza praca prezentuje przykład wykorzystania inżynierii genetycznej do próby poprawy właściwości najbardziej popularnej na świecie fuzyjnej polimerazy DNA (Pfu-Sso7d) o komercyjnej nazwie Phusion, wyposażonej w jednego partnera fuzyjnego (białko Sso7d), poprzez otrzymanie innych fuzyjnych wariantów tej polimerazy DNA wyposażonych w dodatkowe domeny wiążące kwasy nukleinowe czyli białko NeqSSB lub Sso7d.

Na podstawie wielu wykonanych do tej pory analiz przez różne grupy badawcze, w tym zespół naukowy dr hab. inż. Marcina Olszewskiego, poznany został pozytywny wpływ łączenia polimerazy DNA (np. Taq) z innymi białkami wiążącymi zarówno ssDNA jak i dsDNA na właściwości fuzyjnych polimeraz DNA. Z danych literaturowych wynika, że poprawie uległa procesywność, czułość, szybkość syntezy czy odporność na stosowane w reakcji inhibitory [93][94].

Użyte w niniejszej pracy białka wiążące DNA są wynikiem wnikliwej analizy dostępnej literatury. Białka fuzyjne są znane, ze swoich unikalnych właściwości, a w ostatnich latach literatura podaje coraz więcej przykładów fuzji białkowych o poprawionych właściwościach w odniesieniu do polimerazy DNA dzikiego typu. Jednym z przykładów mogą być np. odwrotne transkryptazy w skrócie RT (ang. reverse transcriptase), które są polimerazami DNA zależnymi od RNA, rutynowo stosowanymi zarówno w badaniach podstawowych, jak i diagnostyce wykorzystywanej do

profilowania transkryptomu, czy wykrywania wirusów RNA-zależnych. Odwrotne transkryptazy powinny charakteryzować się wyższą optymalną temperaturą syntezy cDNA, wysoką stabilnością termiczną, procesywnością oraz tolerancją na zanieczyszczenia pochodzące z analizowanych substancji biologicznych. Skonstruowano szereg fuzyjnych form odwrotnej transkryptazy, opartych na kombinacji odwrotnej transkryptazy M-MuLV (ang. murine leukemia virus) i domen wiążących DNA: domeny wiążącej DNA ligazy DNA *Pyrococcus abyssi* i białka Sto7d *Sulfolobus tokodaii*, odpowiednika Sso7d. Fuzyjne formy odwrotnej transkryptazy wykazywały tę samą optymalną temperaturę syntezy DNA i wydajność, co niezmodyfikowany enzym. Natomiast procesywność i wydajność syntezy cDNA przez fuzyjną formę odwrotnej transkryptazy ze Sto7d wzrosła kilkukrotnie. Przyłączenie Sto7d do C-końca odwrotnej transkryptazy M-MuLV zwiększyło tolerancję tego enzymu na znane inhibitory amplifikacji DNA tj. NaCl, mocznik, chlorek guanidyny, formamid, składniki ludzkiej krwi pełnej i osocza krwi ludzkiej. Zatem połączenie odwrotnej transkryptazy M-MuLV z dodatkową domeną wiążącą kwasy nukleinowe zaowocowało otrzymaniem enzymu o pożądanym walorach aplikacyjnych, charakteryzującym się zwiększoną odpornością na inhibitory i zwiększoną wydajnością syntezy cDNA [96].

Ze względu na stale rosnące zainteresowanie fuzyjnymi polimerazami DNA o unikalnych cechach, interesującymi właściwościami białka Sso7d i NeqSSB w kowalencyjnym połączeniu z polimerazami DNA, w niniejszej pracy podjęto próbę skonstruowania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA Pfu, w konfiguracjach dotychczas niespotykanych w literaturze. W przypadku otrzymywania fuzyjnych polimeraz DNA literatura wskazuje na ogromne zainteresowanie właściwościami białka Sso7d, które wydaje się być najlepiej poznany oraz najczęściej wykorzystywanym białkiem wiążącym DNA w fuzjach z polimerazami DNA. Należy jednak pamiętać, że mechanizmy, które pozwalają polimerazom DNA osiągnąć wysoką procesywność, są często specyficzne dla danej polimerazy i nie można ich uogólniać na inne. Wykorzystując białko Sso7d wykazano, że procesywność zarówno polimeraz rodziny A, jak i rodziny B można znacznie zwiększyć [102]. Wprowadzając mutacje punktowe w Sso7d dowiedziono natomiast, że właściwość wiązania dsDNA przez Sso7d jest niezbędna do polepszenia właściwości polimeraz DNA. Po pierwsze, fuzja heterologicznego białka wiążącego dsDNA z polimerazą DNA może zwiększyć procesywność bez uszczerbku dla aktywności katalitycznej i stabilności enzymu. Po

drugie enzymy fuzyjne wykazują znaczną przewagę nad niezmodyfikowanymi enzymami w zastosowaniach PCR [98].

Natomiast wykorzystując białko Sso7d do kowalencyjnego połączenia z polimerazą DNA Taq na jej końcu aminowym, przedstawiono przydatność takiego fuzyjnego enzymu do przeprowadzania reakcji PCR bezpośredniego z ludzkiej krwi pełnej oraz do wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu B bezpośrednio z próbek klinicznych, bez potrzeby izolacji materiału genetycznego. Dzięki fuzji uzyskano też zwiększoną termostabilność polimerazy DNA Sso7d-Taq (S-Taq) w porównaniu z polimerazą DNA Taq oraz wykazano jej wyższą stabilność w reakcji z dodatkiem detergentów [100].

Badania naukowe przeprowadzone przeze mnie nieujęte w niniejszej pracy doktorskiej wykazują zasadność zastosowania białka pochodzącego z archeonu *Nanoarchaeum equitans* (NeqSSB). Białko NeqSSB pochodzi z hipertermofilnego archeonu posiadającego najmniejszy zidentyfikowany genom przy jednoczesnej pełnej funkcjonalności kluczowej dla procesów transkrypcji, translacji i replikacji DNA. Białko NeqSSB ma charakter plejotropowy wykazujący właściwości wiązania jedno- i dwuniciowego DNA, jak też RNA. W niniejszej pracy przeprowadzono porównanie sekwencji aminokwasowych najważniejszych białek wiążących DNA, uwzględniając przede wszystkim modelowe białko Sso7d (rysunek 11) oraz białko NeqSSB, z których wynika, że pomimo dużych rozbieżności w wielkości obu białek i zgodności sekwencji, to ich regiony odpowiedzialne za oddziaływanie z DNA posiadają podobne zakonserwowane reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie DNA. Ponadto dokonano modelowania molekularnego białka NeqSSB i porównania struktur obu termostabilnych białek w kompleksie z DNA. Z analiz tych jednoznacznie wynika, że w obrębie porównywanych regionów przedmiotowych białek ich struktury wykazują duży stopień podobieństwa, łącznie z rozmieszczeniem ważnych reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za interakcje z kwasami nukleinowymi.

Jedyną znaną do tej pory fuzyjną polimerazą DNA wykorzystywaną do reakcji PCR z białkiem NeqSSB jest polimeraza NeqSSB-TaqS. Sekwencję kodującą polimerazę DNA Taq Stoffel i białko wiążące DNA z *N. equitans* poddano fuzji. Fuzyjne białko NeqSSB-TaqS wykazywało znacznie wyższą szybkość wydłużania, procesywność, termostabilność i wyższą tolerancję na inhibitory PCR niż niemodyfikowana polimeraza DNA. Ponadto badania wykazały, że polimeraza DNA NeqSSB-TaqS wykazuje dużą

tolerancję w stosunku do jonów Mg^{2+} oraz soli KCl lub $(NH_4)_2SO_4$. Użycie polimerazy DNA NeqSSB-TaqS zamiast polimerazy DNA Taq może być lepszym wyborem w wielu zastosowaniach PCR [93].

Na podstawie wyżej przytoczonych doniesień literaturowych do otrzymania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA zostały wybrane dwa białka wiążące DNA: Sso7d (wiążące dsDNA) oraz NeqSSB (wiążące ssDNA oraz dsDNA), których obecność polepszyła właściwości dwóch z trzech zaprojektowanych w niniejszej pracy fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA.

W celu otrzymania trzech konstruktów DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, wykorzystano klonowanie metodą Gibsona, która umożliwia wstawienie jednego lub większej liczby fragmentów DNA w praktycznie dowolną pozycję zlinearyzowanej cząsteczki DNA wektora. Zastosowanie opisanej metodyki w niniejszej pracy pozwoliło na efektywne otrzymanie zaprojektowanych konstruktów DNA. W porównaniu z konwencjonalną metodą klonowania, wykorzystanie techniki Gibsona w znacznym stopniu skróciło czas otrzymania konstruktów DNA.

Najczęściej stosowanym systemem ekspresji genów heterologicznych pochodzenia prokariotycznego jest system bakteryjny oparty na szczepach *E. coli*, ze względu na liczne zalety takie jak krótki czas trwania hodowli, wysoki poziom ekspresji docelowych genów, łatwe oczyszczanie rekombinowanych białek oraz niskie koszty prowadzenia hodowli [148]. W niniejszej pracy przetestowano ekspresję genów kodujących fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA w różnych szczepach bakteryjnych *E. coli*. Analiza produkcji białek w wyżej wymienionych szczepach, wykazała najlepszą wydajność w przypadku komórek *E. coli* BL (DE3) RIL.

W celu oczyszczenia fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA wybrano chromatografię metalopowinowactwa (złóże HisTrap), która jest bardzo często stosowaną techniką wykorzystywaną przy oczyszczaniu polimeraz DNA [100]. Charakteryzuje się ona prostotą przy jednoczesnym zachowaniu wydajności oczyszczania białek. Metoda ta została wybrana wzorując się na przykładzie dostępnego w literaturze opisu wydajnego sposobu oczyszczania polimerazy DNA Taq. W przypadku produkcji enzymów na dużą skalę, wysiłek, czas i koszty są kluczowymi czynnikami. Polimeraza DNA Taq ze znacznikiem His była produkowana w komórkach *E. coli* i izolowana w pierwszym etapie przez denaturację termiczną lizatu bakteryjnego, by

pozbyć się termolabilnych białek gospodarza. Polimeraza DNA Taq jest białkiem termostabilnym, dlatego po denaturacji pozostaje we frakcji rozpuszczalnej, a następnie oczyszczono ją za pomocą chromatografii metalopowinowactwa. Dzięki temu uzyskano enzym o wysokiej jakości i czystości, o aktywności porównywalnej z większością dostępnych na rynku odpowiedników [100][149]. Sugerując się m.in. w/w danymi literaturowymi i doświadczeniem własnym postanowiono w ramach niniejszej pracy oczyścić fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA dwuetapowo tzn. z wykorzystaniem denaturacji termicznej i chromatografii metalopowinowactwa, ponieważ wszystkie docelowe białka fuzyjne wykazały termostabilność. Uzyskane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA oczyszczono na złożu HisTrap z wysoką czystością i wydajnością (Wyn. 8.2.2).

Zanieczyszczenie kwasami nukleinowymi gospodarza rekombinowanych polimeraz DNA stanowi poważny problem, zwłaszcza podczas amplifikacji DNA, ponieważ ich obecność może powodować powstawanie niespecyficznych produktów PCR. Wszystkie polimerazy DNA są białkami wiążącymi DNA, które powinny być pozbawione DNA w procesie ich oczyszczania również tego, które jest z nimi związane. W związku z tym niezmiernie ważnym etapem było usunięcie z preparatów enzymatycznych zanieczyszczeń w postaci pozostałości genomowego DNA *E. coli* za pomocą saltonazy hydrolizującej wszystkie formy kwasów nukleinowych, która obecnie uważana jest za najlepszą komercyjną nukleazę, m.in. ze względu na aktywność w bardzo wysokich stężeniach soli i możliwość nieodwracalnej inaktywacji w łagodnych warunkach termicznych, nawet w temperaturze 55°C.

W celu potwierdzenia czy oczyszczone fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA zostały skutecznie pozbawione pozostałości DNA gospodarza, wykonano wstępny test poprzez sprawdzenie czystości otrzymanych preparatów białkowych w agarozowym teście elektroforetycznym w obecności barwnika SimplySafe. Przeprowadzono także szczegółowe badanie wykonując reakcję PCR z udziałem starterów pozwalających na amplifikację fragmentu genu 16S-23S rDNA. Wyniki obu eksperymentów jednoznacznie wykazały, że oczyszczone fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA nie zawierają kwasów nukleinowych, tym samym zostały w pełni przygotowane do dalszej części prac badawczych związanych z określeniem ich właściwości (Wyn. 8.2.3)

Charakterystyka otrzymanych wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA składała się z kilku etapów. Referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d

uzyskano jednocześnie ze wszystkimi pozostałymi wariantami enzymów (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d), zapewniając identyczne warunki otrzymywania, co pozwoliło na przeprowadzenie dalszych wiarygodnych doświadczeń porównawczych wszystkich preparatów białkowych. Komercyjnie dostępna polimeraza DNA (np. Phusion) nie są odpowiednim enzymem referencyjnym ze względu na brak dokładnych informacji na temat wprowadzonych w niej modyfikacji w obrębie sekwencji aminokwasowej, jak też samym buforze do przechowywania. Z analiz elektroforetycznych i badań spektrometrii mas (przeprowadzonych przez zespół naukowy promotora) dot. badania zawartości składników zawartych w sprzedawanych polimerazach DNA wynika, że zawierają one niejednokrotnie liczne wzmacniacze amplifikacji DNA jak np. albumina wołowa. Co więcej, wyniki testów ujawniane przez producenta polimeraz DNA nie wskazują parametrów, według których produkty są porównywane. Dlatego zasadnym było otrzymanie referencyjnej polimerazy DNA w sposób identyczny jak pozostałych jej modyfikowanych fuzyjnych form z dodatkowymi podstawnikami. By zachować wiarygodność wyników, każdy z przeprowadzonych eksperymentów związanych z charakterystyką badanych fuzyjnych form polimerazy DNA odnosił się do jednostki wyjściowej tj. 1 U. Właściwości uzyskanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d zawsze porównywano do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W poszczególnych eksperymentach dotyczących charakterystyki molekularnej badanych białek fuzyjnych wzorowano się na dobrze opisaną w literaturze metodyce ich wykonania [33][93][94][128][130][127][111][129].

Pierwszym etapem charakterystyki molekularnej było ustalenie optymalnych warunków działania każdego z otrzymanych wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA. Przetestowano kilka komercyjnych buforów, a następnie wybrano dwa najlepsze, które umożliwiły ustalenie optymalnych stężeń soli, stanowiących kluczowy składnik buforów reakcyjnych, zapewniający odpowiednią wydajność amplifikacji DNA [93][94]. Warto podkreślić, że wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d jako jedyny działał praktycznie w każdym buforze, niezależnie od ilości użytej do reakcji PCR. Z uwagi na rozbieżności w przypadku tolerancji stężeń soli przez badane warianty białek, jak również utrudnioną możliwość doboru jednego buforu dla wszystkich otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA ustalono dwa bufor (Wyn. 8.3.1.3, tabela 56), które stosowano w trakcie molekularnej charakterystyki otrzymanych fuzyjnych polimeraz

DNA. Jedynie wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d wykazał tak szeroką tolerancję na testowane stężenia różnych soli (KCl, MgCl₂ oraz (NH₄)₂SO₄) jak wariant referencyjny Ref1 Pfu-Sso7d. Polimeraza DNA V1 Pfu-Sso7d-Sso7d wykazała większą tolerancję jedynie w przypadku (NH₄)₂SO₄ w stosunku do pozostałych wariantów oraz referencji. Ogólnie jednak warianty V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz V1 Pfu-Sso7d-Sso7d wykazały znacznie mniejszą tolerancję stosowanych stężeń wybranych soli (Wyn. 8.3.1.2, tabela 53). Prawdopodobnie obecność kolejnego białka wiążącego DNA nie wpływa istotnie na zwiększenie stężeń tolerancji soli.

Kolejny test dotyczył weryfikacji wydajności amplifikacji DNA w znacznie większej puli komercyjnie dostępnych buforów reakcyjnych. Największą uniwersalnością oraz zakresem tolerancji pH wykazał się wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, zdecydowanie większą w porównaniu do Ref1 Pfu-Sso7d. Najmniejszą uniwersalnością oraz zakresem tolerancji na zmienność warunków reakcyjnych wykazał się wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d (Wyn. 7.3.1.3, tabela 54). Przeprowadzone eksperymenty nie pozwoliły na ustalenie jednego wspólnego buforu reakcyjnego dla wszystkich badanych enzymów. Dla wariantów V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a także białka referencyjnego Ref1 Pfu-Sso7d został wybrany bufor A, natomiast dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d bufor B (Wyn. 8.3.1.3, tabela 56). Literatura wskazuje, że pierwotnym założeniem stworzenia fuzyjnej polimerazy Pfu-Sso7d było uzyskanie polimerazy DNA odpornej na zmiany stężeń soli w buforze reakcyjnym [150], co jak przedstawiają uzyskane wyniki w niniejszej pracy, nie udało się. Taką tendencję obserwujemy jedynie w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, ponieważ jako jedyny z otrzymanych wariantów nie tylko wykazał zdolność amplifikacji DNA w większości zastosowanych buforów (8 z 14), ale ma także najszerszy zakres tolerancji na różne pH (tabela 54).

W dalszych badaniach ustalenie liczby aktywnych jednostek otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA, stało się jednym z kluczowych eksperymentów, ponieważ na jego podstawie określono jednakowe stężenia dla każdego preparatu enzymatycznego, tak by można było w sposób wiarygodny porównywać wyniki pozostałych testów między nimi. Największą jednostkowość wykazała referencyjna polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d, a dalej kolejno V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d i V1 Pfu-Sso7d-Sso7d (Wyn. 8.3.1.4, tabela 57). Wszystkie uzyskane warianty fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA i białka referencyjnego doprowadzono do stężenia 1 U/μl. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu

firmy Biotum, EvaEZ Fluorometric Polymerase Activity Assay [93][130][94].

Kolejny etap, czyli weryfikacja minimalnej ilości jednostek w reakcji, umożliwiająca wciąż wydajną amplifikację DNA pozwoliła na określenie aktywności i stabilności badanych polimeraz DNA w reakcji PCR. Każdą z otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [1 U] rozcieńczono ponad 2000 razy. Ustalono, że wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d jest w stanie zamplifikować DNA nawet przy maksymalnym zastosowanym rozcieńczeniu, czyli jest ponad 64x aktywniejszy niż polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d oraz 1000x aktywniejszy niż wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d (Wyn. 8.3.1.5, tabela 59). Uzyskane wyniki wskazują, że nawet częściowa utrata aktywności w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d nie zmniejszy wydajności amplifikacji DNA.

Następny etap wiązał się z określeniem stabilności w temperaturze pokojowej i termostabilności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Eksperyment polegał na inkubacji wszystkich wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA oraz referencyjnej polimerazy DNA w trzech różnych temperaturach [33]. Zakładano, że fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA będą wysoce termostabilne. Największą termostabilnością, porównywalną do polimerazy Ref1 Pfu-Sso7d, zarówno w 95°C i jak i 99°C charakteryzuje się wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, okres półtrwania w temp. 99°C wynosił >60 min, natomiast w 95°C wynosił >3 h czyli porównywalnie do Ref1 Pfu-Sso7d. Najniższą termostabilnością charakteryzował się wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, czas półtrwania w tym wypadku wynosił jedynie 5 min w 99°C, natomiast 10 min w 95°C. W przypadku wariantu V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d w obu temperaturach czas półtrwania wynosił 45 min. Weryfikacja aktywności w temperaturze pokojowej (T_{pok}) dla wszystkich trzech wariantów wynosiła >72h czyli porównywalnie z Ref1 Pfu-Sso7d (Wyn. 8.3.1.6, tabela 60). Powyższe wyniki mogą mieć wpływ, na wydajność amplifikacji DNA o specyficznym profilu temperaturowo-czasowym tzn. w przypadku zastosowania długiego czasu denaturacji lub denaturacji w temperaturze podwyższonej np. do 98°C. Na podstawie uzyskanych wyników można określić, że wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, podobnie jak Ref1 Pfu-Sso7d będą w stanie przeprowadzić amplifikację DNA w bardzo wymagających warunkach termicznych.

Procesywność jest jednym z parametrów szeroko opisywanym w literaturze jako ulegający poprawie w przypadku tworzenia fuzyjnych polimeraz DNA. Pozwala na oznaczenie liczby nukleotydów wbudowywanych w trakcie trwania reakcji przez jedną

cząsteczkę polimerazy DNA [127]. Dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d wynosi on 22 nt, czyli tyle samo ile w przypadku Ref1 Pfu-Sso7d. Natomiast dla pozostałych wariantów czyli V1 Pfu-Sso7d-Sso7d – 20 nt, a dla V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d 21 nt, czyli mniej niż dla Ref1 Pfu-Sso7d (Wyn. 8.3.1.7, tabela 61). Wysoka procesywność świadczy o możliwości wydajnej amplifikacji DNA przez fuzyjne formy polimerazy DNA. Obecność dodatkowych domen we wszystkich wariantach polimerazy DNA nie zwiększyła jej procesywności, tak jak początkowo zakładano.

Kolejnym z istotnych oznaczanych parametrów było określenie szybkości syntezy DNA. Przeprowadzenie tego eksperymentu może mieć szczególne znaczenie w analizie długich produktów PCR [128]. Należy mieć jednak na względzie, że każdy z analizowanych układów jest inny oraz potrzebuje na początku żmudnej optymalizacji warunków reakcji, na które składają się dobór profilu temperaturowo-czasowego, wzmacniaczy, buforu reakcyjnego czy odpowiedniej ilości starterów oraz stężenia dNTPs. Otrzymane wyniki wskazują na porównywalną szybkość syntezy DNA przez V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d w odniesieniu do Ref1 Pfu-Sso7d, która wynosi 200 nt/s. Natomiast w przypadku V2 Sso7d-Pfu-Sso7d jest ona 4x niższa w porównaniu z pozostałymi wariantami oraz Ref1 Pfu-Sso7d i wynosi 50 nt/s (Wyniki 8.3.1.8, tabela 62). Otrzymane wyniki mogą być istotną wskazówką dla kierunku projektowania nowych fuzyjnych polimeraz DNA, zwłaszcza w przypadku otrzymywania długich produktów PCR. Dodatkowe białka w konstrukcji nowych polimeraz DNA mogą poprawiać, bądź utrzymywać procesywność na wysokim poziomie, jednak może to spowodować wydłużenie czasu elongacji oraz szybkości syntezy DNA, co można zaobserwować w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Tak zmodyfikowane enzymy nie nadają się do uzyskiwania długich produktów PCR. Nie bez znaczenia może być tutaj rodzaj białka wiążącego DNA, czy sposób jego lokalizacji. Otrzymywanie bardzo długich produktów PCR jest efektywniejsze w przypadku dodania do mieszaniny reakcyjnej dwóch różnych polimeraz DNA [53]. Istotnym czynnikiem w tym wypadku jest także procesywność oraz szybkość syntezy stosowanej polimerazy DNA, dlatego w takiej sytuacji odpowiednia jest polimeraza DNA Taq, która charakteryzuje się wymaganą wysoką procesywnością. Żeby uzyskać produkt PCR znaczącej wielkości przy jednoczesnym zachowaniu wydajności reakcji stosuje się mieszaninę polimerazy DNA Taq oraz Pfu. Reakcja jest katalizowana przez polimerazę DNA Taq, natomiast polimeraza DNA Pfu pełni funkcję korektorską [52][53].

W przypadku bardzo długich produktów PCR projektowanie nowych enzymów dedykowanych ich powstawaniu powinno raczej skupiać się na tworzeniu mutacji punktowych, niż na tworzeniu fuzyjnych wariantów polimeraz DNA [150], których nowo pozyskane właściwości mogą znaleźć zastosowanie w szeroko pojętej diagnostyce, gdzie kluczowa może być wysoka odporność na inhibitory.

Następnym etapem pracy była analiza czułości otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [129]. Wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d wykazują 10x większą czułość niż referencyjna polimeraza DNA Ref1 Pfu-Sso7d, co może być istotne z punktu widzenia laboratoriów diagnostycznych, gdzie stężenia prób często są niskie. Natomiast czułość enzymu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d jest na takim samym poziomie jak dla białka referencyjnego Ref1 Pfu-Sso7d (Wyn. 8.3.1.9, tabela 63).

W dalszej kolejności sprawdzono wydajność amplifikacji matryc bogatych w GC [93][94], co jest istotne w przypadku badań m.in. bakterii rodzaju *Mycobacterium*. Amplifikowana sekwencja wykorzystana podczas eksperymentów zawierała aż ok. 80% par GC przy czym część zawierała długie ciągi nukleotydów G obok siebie nawet do 29 G. Analiza wyników uzyskanych w tych doświadczeniach z udziałem badanych enzymów pozwoliła na ustalenie, że zarówno wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d jak i Ref1 Pfu-Sso7d są w stanie wydajnie amplifikować matryce bogate w pary GC, czego nie można stwierdzić w przypadku wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, mimo dokonania wielu prób optymalizacyjnych (Wyn. 8.3.1.10, rysunek 34).

Kolejne eksperymenty dotyczyły amplifikacji DNA z udziałem badanych enzymów w obecności inhibitorów, przy czym ze względu na obszerność uzyskanych rezultatów dyskusję z nimi związaną przeniesiono na koniec tego rozdziału.

Dodatkowo określono także wpływ dodatkowego białka wiążącego DNA na hybrydyzację oligonukleotydów komplementarnych do matrycy. Zarówno w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d jak i V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d zastosowanie zróżnicowanej temperatury przyłączania starterów w zakresie 55°C – 72°C nie wpłynęło na wydajność amplifikacji DNA. Uzyskane wyniki są porównywalne z otrzymanymi dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Jedynie w przypadku wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d wydajność amplifikacji DNA drastycznie spada przy zastosowaniu temperatury wyższej niż optymalna dla wykorzystywanych starterów, tzn. produkt PCR powstaje w zakresie temperatury przyłączania starterów od 55°C do 66,5°C, czyli zdecydowanie odbiega od wyników osiągniętych przez pozostałe enzymy (Wyniki 8.5.1, rysunek 40).

Ostatnim etapem pracy była weryfikacja oddziaływań otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z ssDNA oraz z dsDNA z wykorzystaniem testu EMSA [111]. Wyniki przeprowadzonego testu wskazują na zwiększoną zdolność wiązania zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA jedynie przez wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Najmniejszą zdolnością wiązania ss- i dsDNA charakteryzuje się wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, natomiast wyniki uzyskane dla wariantu V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d wskazują, iż nastąpiło częściowe pogorszenie zdolności wiązania obu form kwasów nukleinowych. Dane literaturowe dowodzą, że zwiększenie oddziaływania z dwuniciowym DNA przez polimerazy DNA jest istotnym warunkiem do polepszenia właściwości nowych polimeraz DNA, co jest zgodne z większością wyników uzyskanych dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d [98] (Wyniki 8.5.2, rysunek 41.). Warto dodać, że enzym ten wiąże też efektywniej jednoniciowe DNA niż referencyjna polimeraza DNA i to też może mieć pozytywny wpływ na poprawę jego parametrów.

Najistotniejszymi eksperymentami z punktu widzenia diagnostyki molekularnej były prace związane ze sprawdzeniem odporności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na szereg inhibitorów występujących w próbkach klinicznych zarówno ludzkich, zwierzęcych jak i środowiskowych. Dodatkowe białka wiążące, którymi zostały zmodyfikowane polimerazy DNA być może nie są najlepszym rozwiązaniem do otrzymywania długich produktów PCR, ale mogą zwiększać odporność fuzyjnych polimeraz DNA na inhibitory, które stanowią ogromny problem w diagnostyce [93][96][100][94]. W analizach wykorzystano inhibitory takie jak krew pełna EDTA, heparyna, ampicylina, etanol, izopropanol oraz kwas humusowy. Są to jedne z najczęściej występujących w badanych próbkach inhibitorów, które mogą hamować reakcję PCR nawet w niskich stężeniach.

Największą odporność na każdy z zastosowanych inhibitorów wykazuje wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, minimum dwukrotnie większą niż białko referencyjne Ref1 Pfu-Sso7d, co jest doskonałym rezultatem i spójnym z wynikiem dot. badania oddziaływań z DNA – wariant ten osiągnął najlepszą zdolność ich wiązania. W połączeniu z jego zwiększoną czułością, może mieć to istotne znaczenie w przypadku badania zanieczyszczonych inhibitorami próbek m.in. w laboratorium diagnostycznym próbek zwierzęcych, gdzie przeprowadzono część eksperymentów. Najmniejszą odporność na stosowane inhibitory wykazuje wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d (Wyniki 8.4, tabela 64, 65,

66, 67, 68).

Biorąc pod uwagę wszystkie wykonane eksperymenty najbardziej uniwersalnym enzymem jest zdecydowanie wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Spośród wszystkich otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA został on poddany największej ilości eksperymentów ze względu na najlepsze właściwości jakie wykazał we wcześniej przeprowadzonych doświadczeniach. Uniwersalność buforów, stosowanego profilu temperaturowo-czasowego, odporności na inhibitory sprawia, że może być doskonałym rozwiązaniem w różnego typu laboratoriach diagnostycznych. Jako jedyny działa w szerokiej puli komercyjnie dostępnych buforów reakcyjnych oraz wydajnie amplifikuje DNA bez względu na zastosowany profil temperaturowo-czasowy. Dodatkowo warianty V1 Pfu-Sso7d-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d nie są w stanie amplifikować matrycy zawierającej w swojej sekwencji ponad 80% par GC, co jest istotnym problemem z punktu widzenia diagnostyki molekularnej w przypadku analiz materiału genetycznego bogatego w pary GC. Odporność na szeroki zakres inhibitorów w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz możliwość bezpośredniego dodatku próbek klinicznych jako matrycy do reakcji PCR, pozwoliłoby na znaczne obniżenie kosztów pracy laboratoriów klinicznych. Ponadto dzięki wykorzystaniu białka V2 Sso7d-Pfu-Sso7d można zniwelować negatywny wpływ czynników inhibujących amplifikację DNA, jakie mogą znaleźć się nawet w wyizolowanym DNA.

Jak już wielokrotnie podnoszono dodatek białka wiążącego DNA może w znacznym stopniu wpłynąć na poprawę cech otrzymywanych fuzyjnych form polimerazy DNA. Powyżej omówione wyniki wskazują na to, że dołączenie kolejnego białka do polimerazy DNA, tak jak ma to miejsce w przypadku wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, może wzmocnić odporność polimerazy DNA na inhibitory. Co więcej pozwala także na zastosowanie szerokiej puli buforów reakcyjnych oraz ich pH bez zmniejszenia wydajności reakcji PCR. W przeciwieństwie do wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d wariant V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, mimo obecności dodatkowego tego samego białka wiążącego DNA, ale zamieszczonego na C-końcu polimerazy DNA (jako kolejne białko Sso7d) nie wykazuje polepszenia jakichkolwiek właściwości. Przeprowadzone z udziałem tego enzymu eksperymenty wskazują wręcz na znaczące obniżenie wydajności amplifikacji DNA, drastyczny spadek odporności na inhibitory i termostabilności oraz problemy z doбором odpowiedniego buforu reakcyjnego.

Spośród trzech otrzymanych wariantów tylko jeden z nich wykazuje się

unikalnymi właściwościami, których jest co najmniej kilka. Wpływ na to ma zarazem dobór właściwego białka wiążącego kwasy nukleinowe, jak też wybór jego miejsca przyłączenia do polimerazy DNA. Otrzymanie polimerazy DNA o wszechstronnych cechach i aplikacjach jest nie lada wyzwaniem, być może nieosiągalnym, ale z całą pewnością można i należy projektować nowe polimerazy DNA, które wykazują unikalne cechy dedykowane do określonych zastosowań. Niniejsza praca doktorska wskazała nowy kierunek do prowadzenia dalszych badań związanych z modyfikowaniem polimeraz DNA, w celu nadania im cennych właściwości.

Polimerazy DNA są obecne we wszystkich organizmach i są ważnymi enzymami syntetyzującymi cząsteczki DNA. Znajdują one zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, przede wszystkim jako niezbędne składniki do syntez DNA *in vitro*, głównie reakcji PCR. Nowoczesna diagnostyka, biologia molekularna i inżynieria genetyczna potrzebują polimeraz DNA, które przewyższają właściwościami dotychczas poznane m.in. wykazują lepszą wydajność amplifikacji DNA w zróżnicowanych warunkach.

Reakcja PCR i jej liczne odmiany od wielu lat zajmują bardzo ważne miejsce w diagnostyce, zarówno ludzkiej, jak i zwierzęcej, czy środowiskowej. Do czynników wpływających na jakość uzyskiwanych wyników w diagnostyce należą między innymi wykorzystywane w laboratoriach polimerazy DNA. Wpływają one przede wszystkim na wydajność i wierność prowadzonych amplifikacji DNA podczas rutynowo wykonywanych reakcji PCR. Oprócz wspomnianej wydajności i wierności polimeraza DNA w zastosowaniach diagnostycznych powinna wykazywać się także, a nawet w opinii części naukowców przede wszystkim odpornością na inhibitory, których niejednokrotnie nie sposób uniknąć mimo izolacji materiału genetycznego. Na szczególną uwagę zasługuje krew oraz jej pochodne, które są głównym i najczęściej dostarczanym do laboratorium materiałem do badań. Poszukiwane są polimerazy DNA, które wykazują się dużą odpornością na różnego rodzaju inhibitory, bez utraty aktywności. Jednym z najlepszych rozwiązań okazuje się możliwość wykorzystania do reakcji PCR fuzyjnych polimeraz DNA, które niejednokrotnie już dowiodły swojej wyższości w stosunku do dotychczas rutynowo wykorzystywanych w laboratoriach polimeraz DNA.

Mając na uwadze fakt stałego zapotrzebowania na polimerazy DNA o zwiększonej efektywności i odporności na inhibitory postanowiono podjąć się zaprojektowania, produkcji, charakterystyki i zastosowania opisanych w niniejszej pracy doktorskiej trzech różnych wariantów fuzyjnych archealnych form polimerazy DNA

tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Otrzymanie tego typu fuzyjnych polimeraz DNA miało na celu wykazanie pozytywnego wpływu fuzyji dwóch różnych białek partnerskich wiążących kwasy nukleinowe na odporność na inhibitory przy zachowaniu dotychczasowych parametrów, w tym czułości, co może mieć szczególne wpływ na efektywniejsze wykonywanie badań w laboratoriach diagnostycznych lub kryminalistycznych. Przeprowadzone i opisane w niniejszej pracy eksperymenty wykazały, że jest możliwe uzyskanie doskonalszego enzymu niż uważane za najlepsze dostępne na rynku i opisane w literaturze białka fuzyjne do reakcji PCR, czego doskonałym przykładem a zarazem wielkim sukcesem jest fuzyjna forma polimerazy DNA V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, będąca owocem moich badań.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki poszerzyły wiedzę podstawową z zakresu biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Natomiast uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski stanowią cenne wskazówki, które mogą być wykorzystane do projektowania innych wariantów fuzyjnych polimeraz DNA

10. Podsumowanie

Od wielu lat zespół dr hab. inż. Marcina Olszewskiego prof. uczelni prowadzi badania nad termostabilnymi polimerazami DNA oraz białkami oddziałyującymi z kwasami nukleinowymi. Dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej zespół ten otrzymał i scharakteryzował białko wiążące wszystkie formy DNA pochodzące z *Nanoarcheum equitans* (NeqSSB) i wykazał jego potencjalne znaczenie w rozwoju fuzyjnych form bakteryjnych polimeraz DNA.

Niniejsza praca dotyczyła badań nad fuzyjnymi formami archealnej polimerazy DNA, której głównym celem było zbadanie wpływu dodatkowych białek wiążących zarówno jedno- jak i dwuniciowe DNA na właściwości najbardziej komercyjnie znanej fuzyjnej polimerazy DNA, posiadającej jedno białko fuzyjne (Sso7d) na C-końcu. W toku badań zaprojektowano, wyprodukowano i scharakteryzowano trzy różne fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Dwie z nich posiadały fuzję z bardzo dobrze opisanym w literaturze białkiem Sso7d. Zbadano wpływ umiejscawiania białka wiążącego DNA na właściwości uzyskanych fuzyjnych form polimeraz DNA. Przeprowadzona analiza wykazała, iż obustronna eskorta polimerazy DNA (białko partnerskie na jej N- i C-końcu) w znaczny sposób wpływa na odporność na szeroki zakres inhibitorów często spotkanych w próbkach analizowanych przez laboratoria diagnostyczne. Ponadto oba białka fuzyjne cechują się zwiększoną czułością i aktywnością w porównaniu z referencyjną polimerazą DNA Ref1 Pfu-SSo7d. Wariant posiadający obustronną fuzję tego samego białka partnerskiego (V2 Sso7d-Pfu-Sso7d), wykazuje wysoką wydajność enzymatyczną i amplifikuje DNA praktycznie bez względu na zastosowane warunki reakcji PCR.

Trzeci wariant (V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d) fuzyjnej formy polimerazy DNA zawierający białka wiążące kwasy nukleinowe na obu końcach wykazywał się wyższą czułością, aktywnością oraz odpornością na inhibitory, takie jak krew pełna w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d.

Analiza porównawcza dwóch uzyskanych w niniejszej pracy wariantów wykazała lepsze właściwości dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d niż dla wariantu V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Analiza sekwencji aminokwasowej obu białek partnerskich wiążących DNA, czyli Sso7d i NeqSSB, ujawniła znaczące różnice, niemniej jednak ich struktury przestrzenne wykazują znaczące podobieństwo, zwłaszcza w rejonie odpowiedzialnym za

oddziaływanie z kwasami nukleinowymi. Zastosowanie podwójnej fuzji identycznych białek wiążących DNA na C- końcu polimerazy DNA (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d) wpłynęło negatywnie na jej aktywność i wszystkie badane parametry, a także spowodowało utratę odporności na inhibitory.

Uzyskane wyniki wykazują zasadność wykorzystania technik inżynierii genetycznej i zastosowania odpowiednio umiejscowionych białek partnerskich do opracowywania innowacyjnych enzymów o unikalnych właściwościach, w tym fuzyjnych polimeraz DNA.

11. Wykaz literatury

1. Coulther, T. A., Stern, H. R., & Beuning, P. J. (2019). Engineering Polymerases for New Functions. *Trends in biotechnology*, 37(10), 1091–1103.
2. Wolf, G. (2003). Friedrich Miescher, the man who discovered DNA. *Chemical Heritage*, 21(10-11), 37-41.
3. Dahm R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 122(6), 565–581.
4. Maga, G. (2013). DNA Polymerases. Reference Brenner's Encyclopedia of Genetics, 376-378
5. Czernecki, D., Nourisson, A., Legrand, P., & Delarue, M. (2023). Reclassification of family A DNA polymerases reveals novel functional subfamilies and distinctive structural features. *Nucleic acids research*, 51(9), 4488–4507.
6. Lamers, M. H., & O'Donnell, M. (2008). A consensus view of DNA binding by the C family of replicative DNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20565–20566.
7. Kazlauskas, D., Krupovic, M., & Venclovas, Č. (2016). The logic of DNA replication in double-stranded DNA viruses: insights from global analysis of viral genomes. *Nucleic acids research*, 44(10), 4551–4564.
8. Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325.
9. Yang W. (2014). An overview of Y-Family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase η . *Biochemistry*, 53(17), 2793–2803.
10. Farooqui, A. K., Ahmad, H., Rehmani, M. U., & Husain, A. (2023). Quick and easy method for extraction and purification of Pfu-Sso7d, a high processivity DNA polymerase. *Protein Expression and Purification*, 208–209, 106276.
11. Kim, Y., Eom, S. H., Wang, J., Lee, D. S., Suh, S. W., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature*, 376(6541), 612–616.
12. Rothwell, P. J., & Waksman, G. (2005). Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in protein chemistry*, 71, 401-440.

13. Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., & Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS microbiology reviews*, 36(6), 1105–1121.
14. Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Frontiers in microbiology*, 5, 465.
15. Akram, F., Shah, F. I., Ibrar, R., Fatima, T., Haq, I. U., Naseem, W., Gul, M. A., Tehreem, L., & Haider, G. (2023). Bacterial thermophilic DNA polymerases: A focus on prominent biotechnological applications. *Analytical biochemistry*, 671, 115150.
16. Rollan, C. H., Ehrmann, A., & Norholm, M. H. H. (2022). Neq2X7: a multi-purpose and open-source fusion DNA polymerase for advanced DNA engineering and diagnostics PCR. *bioRxiv*, 2022-03.
17. Hubscher, U., Spadari, S., Villani, G., Maga, G. (2010). DNA Polymerases: Discovery, Characterization, and Functions in Cellular DNA Transactions. *World Scientific Publishing*, 79-106.
18. Kim, S. W., Kim, D. U., Kim, J. K., Kang, L. W., & Cho, H. S. (2008). Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *International journal of biological macromolecules*, 42(4), 356–361.
19. Fisher, J.K., Bourniquel, A., Prentiss, M., Kleckner, N. (2011). DNA Replication, Recombination & Repair. *Biophys J.* 7, 394–738.
20. Wardle, J., Burgers, P. M., Cann, I. K., Darley, K., Heslop, P., Johansson, E., Lin, L. J., McGlynn, P., Sanvoisin, J., Stith, C. M., & Connolly, B. A. (2008). Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the archaea, not occurring with bacteria and eukarya. *Nucleic acids research*, 36(3), 705–711.
21. Redrejo-Rodríguez, M., Ordóñez, C. D., Berjón-Otero, M., Moreno-González, J., Aparicio-Maldonado, C., Forterre, P., Salas, M., & Krupovic, M. (2017). Primer-Independent DNA Synthesis by a Family B DNA Polymerase from Self-Replicating Mobile Genetic Elements. *Cell reports*, 21(6), 1574–1587.
22. Kazlauskas, D., Krupovic, M., & Venclovas, C. (2016). The logic of DNA replication in double-stranded DNA viruses: insights from global analysis of viral genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(10), 4551–4564.

23. Kazlauskas, D., Krupovic, M., Guglielmini, J., Forterre, P., & Venclovas, Č. (2020). Diversity and evolution of B-family DNA polymerases. *Nucleic acids research*, 48(18), 10142–10156.
24. Greenough, L., Menin, J. F., Desai, N. S., Kelman, Z., & Gardner, A. F. (2014). Characterization of family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9°N. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 18(4), 653–664.
25. Yamtich, J., & Sweasy, J. B. (2010). DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(5), 1136–1150.
26. Nelson, D. L., Cox, M. M., Beginnen, K., Borsch-Supan (M.), & Glauner, F. (2001). *Lehninger biochemie* (pp. 680-681).
27. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491.
28. Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 226, 3–6.
29. Barnes W. M. (1992). The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene*, 112(1), 29–35.
30. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR methods and applications*, 2(4), 275–287.
31. Patel, P. H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A., & Loeb, L. A. (2001). Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection. *Journal of molecular biology*, 308(5), 823-837.
32. Eom, S. H., Wang, J., & Steitz, T. A. (1996). Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*, 382(6588), 278–281.
33. Dabrowski, S., & Kur, J. (1998). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein expression and purification*, 14(1), 131–138.
34. Cooper, C. D. O. (2018). Archaeal DNA polymerases: new frontiers in DNA replication and repair. *Emerging topics in life sciences*, 2(4), 503–516.

35. Wang, M., Cai, J., Chen, J., Liu, J., Geng, X., Yu, X., & Yang, J. (2023). PCR Techniques and Their Clinical Applications. IntechOpen.
36. Wages J. M., Jr. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science*, 243–250.
37. Steitz T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17395–17398.
38. Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y. J., & Yang, W. (2013). Mechanism of the nucleotidyl-transfer reaction in DNA polymerase revealed by time-resolved protein crystallography. *Biophysics (Nagoya-shi, Japan)*, 9, 31–36.
39. Johnson K. A. (2010). The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(5), 1041–1048.
40. Beese, L. S., & Steitz, T. A. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *The EMBO journal*, 10(1), 25–33.
41. Schrick, L., & Nitsche, A. (2016). Pitfalls in PCR troubleshooting: Expect the unexpected? *Biomolecular Detection and Quantification*, 6, 1–3.
42. da Costa Lima, M. S., Junior, Zorzenon, D. C. R., Dorval, M. E. C., Pontes, E. R. J. C., Oshiro, E. T., Cunha, R., Andreotti, R., & Matos, M. D. F. C. (2013). Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(1), 10–15.
43. Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). *Polymerase Chain Reaction. Molecular Biology*, 168–198
44. Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., & Zhang, C. (2010). MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC bioinformatics*, 11, 143.
45. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134.
46. Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), e3998.

47. Lo, Y. T., & Shaw, P. C. (2018). DNA barcoding in concentrated Chinese medicine granules using adaptor ligation-mediated polymerase chain reaction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *149*, 512–516.
48. Levitz R. E. (1998). Herpes simplex encephalitis: a review. *Heart & lung : the journal of critical care*, *27*(3), 209–212.
49. Baskaran, N., Kandpal, R. P., Bhargava, A. K., Glynn, M. W., Bale, A., & Weissman, S. M. (1996). Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome research*, *6*(7), 633–638.
50. Kang, J., Lee, M. S., & Gorenstein, D. G. (2005). The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *64*(2), 147–151.
51. Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., & Viljoen, H. J. (2008). A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational biology and chemistry*, *32*(6), 452–457.
52. Barnes W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(6), 2216–2220.
53. Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., & Imanaka, T. (2001). Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *Journal of biotechnology*, *88*(2), 141–149.
54. Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., & Agrawal, G. (2007). Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics*, *8*(4), 234–251.
55. Roux, G., Ravel, C., Varlet-Marie, E., Jendrowiak, R., Bastien, P., & Sterkers, Y. (2019). Inhibition of polymerase chain reaction: Pathogen-specific controls are better than human gene amplification. *PloS one*, *14*(9), e0219276.
56. Huggett, J. F., Novak, T., Garson, J. A., Green, C., Morris-Jones, S. D., Miller, R. F., & Zumla, A. (2008). Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC research notes*, *1*, 70.

57. Buckwalter, S. P., Sloan, L. M., Cunningham, S. A., Espy, M. J., Uhl, J. R., Jones, M. F., Vetter, E. A., Mandrekar, J., Cockerill, F. R., 3rd, Pritt, B. S., Patel, R., & Wengenack, N. L. (2014). Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: are they necessary for all specimen matrices?. *Journal of clinical microbiology*, 52(6), 2139–2143.
58. Acharya, K. R., Dhand, N. K., Whittington, R. J., & Plain, K. M. (2017). PCR inhibition of a quantitative PCR for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA in feces: diagnostic implications and potential solutions. *Frontiers in microbiology*, 8, 115.
59. Al-Soud, W. A., & Rådström, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 485–493.
60. Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(9), 2009–2023.
61. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014–1026.
62. Trombley Hall, A., McKay Zovanyi, A., Christensen, D. R., Koehler, J. W., & Devins Minogue, T. (2013). Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples. *PloS one*, 8(9), e73845.
63. Kuffel, A., Gray, A., & Daeid, N. N. (2021). Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. *International Journal of Legal Medicine*, 135(1), 63–72.
64. McCord, B., Pionzio, A., & Thompson, R. (2015). Analysis of the effect of a variety of PCR inhibitors on the amplification of DNA using real time PCR, melt curves and STR analysis. *US Department of Justice*, 317.
65. Coutlée, F., & Voyer, H. (1998). Effect of nonionic detergents on amplification of human papillomavirus DNA with consensus primers MY09 and MY11. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 1164.
66. Claveau, S., Sasseville, M., & Beaugard, M. (2004). Alcohol-mediated error-prone PCR. *DNA and cell biology*, 23(11), 789–795.

67. Nagai, M., Yoshida, A., & Sato, N. (1998). Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochemistry and molecular biology international*, *44*(1), 157–163.
68. Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., & Ceccherini, I. (2006). Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, *8*(5), 544–550.
69. Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PloS one*, *5*(6), e11024.
70. Farrell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC research notes*, *5*, 257.
71. Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences*, *55*(1), 25–33.
72. Sutlović, D., Definis Gojanović, M., Anđelinović, S., Gugić, D., & Primorac, D. (2005). Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croatian medical journal*, *46*(4), 556–562.
73. Matsumura, S., Matsusue, A., Waters, B., Kashiwagi, M., Hara, K., & Kubo, S. I. (2018). Effects of PCR inhibitors on mRNA expression for human blood identification. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, *32*, 113–119.
74. Zhang, X., Guo, J., Song, B., & Zhang, F. (2022). Spatiotemporal Regulation of Metal Ions in the Polymerase Chain Reaction. *ACS omega*, *7*(37), 33530–33536.
75. Yang, Z., Shen, B., Yue, L., Miao, Y., Hu, Y., & Ouyang, R. (2022). Application of Nanomaterials to Enhance Polymerase Chain Reaction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(24), 8854.
76. Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, *197*, 130–143.
77. Bauer, H. M., Ting, Y., Greer, C. E., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., Chi-Mera, J., Reingold, A., & Manos, M. M. (1998). Letters to the Editor Effect of Nonionic Detergents on Amplification of Human Papillomavirus DNA with Consensus Primers MY09 and MY11. *Journal of clinical microbiology*, *36*(4).

78. Cunnington, J. H., Takamatsu, S., Lawrie, A. C., & Pascoe, I. G. (2003). Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Australasian Plant Pathology*, 32(3), 421–428.
79. Lu, Y. H., & Nègre, S. (1993). Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification. *Trends in genetics : TIG*, 9(9), 297.
80. Yang, Z. B., Eticha, D., Rotter, B., Rao, I. M., & Horst, W. J. (2011). Physiological and molecular analysis of polyethylene glycol-induced reduction of aluminium accumulation in the root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *The New phytologist*, 192(1), 99–113.
81. Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., & Ceccherini, I. (2006). Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 8(5), 544–550.
82. Zhang, Z., Kermekchiev, M. B., & Barnes, W. M. (2010). Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 12(2), 152–161.
83. Varadharajan, B., & Parani, M. (2021). DMSO and betaine significantly enhance the PCR amplification of ITS2 DNA barcodes from plants. *Genome*, 64(3), 165–171.
84. Baar, C., d'Abbadie, M., Vaisman, A., Arana, M. E., Hofreiter, M., Woodgate, R., ... & Holliger, P. (2011). Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 39(8), e51-e51.
85. Chevet, E., Lemaître, G., & Katinka, M. D. (1995). Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic acids research*, 23(16), 3343–3344.
86. Forbes, B. A., & Hicks, K. E. (1996). Substances interfering with direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2125–2128.
87. Kovárová, M., & Dráber, P. (2000). New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic acids research*, 28(13), E70.
88. Ahmad, S., Ali, S. F., Iftikhar, S., & Rashid, N. (2023). Engineering a DNA polymerase from *Pyrobaculum calidifontis* for improved activity, processivity and extension rate. *International journal of biological macromolecules*, 233, 123545.

89. Loeb, L. A., & Monnat, R. J., Jr (2008). DNA polymerases and human disease. *Nature reviews. Genetics*, 9(8), 594–604.
90. Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*, 17(1), 37–45.
91. Sovová, T., Křížová, B., DráBKová, L., & Ovesná, J. (2017). Detection of PCR inhibition in food and feed with a synthetic plasmid. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(2), 160-164.
92. Barnes, W. M., Zhang, Z., & Kermekchiev, M. B. (2021). A Single Amino Acid Change to Taq DNA Polymerase Enables Faster PCR, Reverse Transcription and Strand-Displacement. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 553474.
93. Olszewski, M., Śpibida, M., Bilek, M., & Krawczyk, B. (2017). Fusion of Taq DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of *Nanoarchaeum equitans*-Expression and characterization. *PloS one*, 12(9).
94. Śpibida, M., Krawczyk, B., Zalewska-Piątek, B., Piątek, R., Wysocka, M., & Olszewski, M. (2018). 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.
95. de Vega, M., Lázaro, J. M., Mencía, M., Blanco, L., & Salas, M. (2010). Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16506–16511.
96. Ocorbin, I. P., Wong, P. F., Boyarskikh, U. A., Khrapov, E. A., & Filipenko, M. L. (2020). The attachment of a DNA-binding Sso7d-like protein improves processivity and resistance to inhibitors of M-MuLV reverse transcriptase. *FEBS letters*, 594(24), 4338–4356.
97. Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., & Slesarev, A. I. (2012). Cooperation between catalytic and DNA binding domains enhances thermostability and supports DNA synthesis at higher temperatures by thermostable DNA polymerases. *Biochemistry*, 51(10), 2032–2043.
98. Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M., & Vander Horn, P. B. (2004). A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic acids research*, 32(3), 1197–1207.

99. Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., & Kur, J. (2017). Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of applied genetics*, *58*(1), 133–142.
100. Sundarrajan, S., Parambath, S., Suresh, S., Rao, S., & Padmanabhan, S. (2018). Novel properties of recombinant Sso7d-Taq DNA polymerase purified using aqueous two-phase extraction: Utilities of the enzyme in viral diagnosis. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, *19*.
101. Sun, S., Geng, L., & Shamoo, Y. (2006). Structure and enzymatic properties of a chimeric bacteriophage RB69 DNA polymerase and single-stranded DNA binding protein with increased processivity. *Proteins*, *65*(1), 231–238.
102. Wu, J., de Paz, A., Zamft, B. M., Marblestone, A. H., Boyden, E. S., Kording, K. P., & Tyo, K. E. J. (2017). DNA binding strength increases the processivity and activity of a Y-Family DNA polymerase. *Scientific reports*, *7*(1), 4756.
103. Choli, T., Henning, P., Wittmann-Liebold, B., & Reinhardt, R. (1988). Isolation, characterization and microsequence analysis of a small basic methylated DNA-binding protein from the Archaeobacterium, *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimica et biophysica acta*, *950*(2), 193–203.
104. Guagliardi, A., Cerchia, L., & Rossi, M. (2002). The Sso7d protein of *Sulfolobus solfataricus*: in vitro relationship among different activities. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, *1*(2), 87–93.
105. Gera, N., Hussain, M., Wright, R. C., & Rao, B. M. (2011). Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *Journal of molecular biology*, *409*(4), 601–616.
106. Kalichuk, V., Béhar, G., Renodon-Cornière, A., Danovski, G., Obal, G., Barbet, J., Mouratou, B., & Pecorari, F. (2016). The archaeal "7 kDa DNA-binding" proteins: extended characterization of an old gifted family. *Scientific reports*, *6*, 37274.
107. Guagliardi, A., Napoli, A., Rossi, M., & Ciaramella, M. (1997). Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein. *Journal of molecular biology*, *267*(4), 841–848.
108. López-García, P., Knapp, S., Ladenstein, R., & Forterre, P. (1998). In vitro DNA binding of the archaeal protein Sso7d induces negative supercoiling at temperatures typical for thermophilic growth. *Nucleic acids research*, *26*(10), 2322–2328.

109. Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., & Stetter, K. O. (2002). A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, *417*(6884), 63–67.
110. Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A., & Hattori, M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5797), 267.
111. Olszewski, M., Balsewicz, J., Nowak, M., Maciejewska, N., Cyranka-Czaja, A., Zalewska-Piątek, B., Piątek, R., & Kur, J. (2015). 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).
112. Greipel, J., Urbanke, C., & Maass, G. (1989). The single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli*: Physicochemical properties and biological functions. *Protein-Nucleic Acid Interaction*, 61-86.
113. Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D., & Kolodner, R. D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of molecular biology*, *227*(1), 54–71.
114. Lohman, T. M., & Overman, L. B. (1985). Two binding modes in *Escherichia coli* single strand binding protein-single stranded DNA complexes. Modulation by NaCl concentration. *The Journal of biological chemistry*, *260*(6), 3594–3603.
115. Shereda, R. D., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Cox, M. M., & Keck, J. L. (2008). SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *43*(5), 289–318.
116. Nowak, M., Olszewski, M., Śpibida, M., & Kur, J. (2014). Characterization of single-stranded DNA-binding proteins from the psychrophilic bacteria *Desulfotalea psychrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychromonas ingrahamii*, *Psychroflexus torquus*, and *Photobacterium profundum*. *BMC microbiology*, *14*, 91.
117. Kur, J., Olszewski, M., Długolecka, A., & Filipkowski, P. (2005). Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) -- sources and applications in molecular biology. *Acta biochimica Polonica*, *52*(3), 569–574.
118. Borjac-Natour, J. M., Petrov, V. M., & Karam, J. D. (2004). Divergence of the mRNA targets for the Ssb proteins of bacteriophages T4 and RB69. *Virology journal*, *1*, 4.

119. Evans D. A. (1989). Somaclonal variation--genetic basis and breeding applications. *Trends in genetics : TIG*, 5(2), 46–50.
120. Garcia-Diaz, M., & Bebenek, K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *Critical reviews in plant sciences*, 26(2), 105–122.
121. Holmberg, R. C., Henry, A. A., & Romesberg, F. E. (2005). Directed evolution of novel polymerases. *Biomolecular engineering*, 22(1-3), 39–49.
122. Matsukawa, H., Yamagami, T., Kawarabayasi, Y., Miyashita, Y., Takahashi, M., & Ishino, Y. (2009). A useful strategy to construct DNA polymerases with different properties by using genetic resources from environmental DNA. *Genes & genetic systems*, 84(1), 3–13.
123. Mendez, J., Blanco, L., Lazaro, J. M., and Salas, M. (1994) Primer-terminus stabilization at the ϕ 29 DNA polymerase active site. *J. Biol. Chem.* 269, 30030–30038.
124. Gill, P., & Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 27(3), 224–243.
125. Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports*, 5(8), 795–800.
126. Jeong, Y. J., Park, K., & Kim, D. E. (2009). Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cellular and molecular life sciences*, 66, 3325-3336.
127. Elshawadfy, A. M., Keith, B. J., Ee Ooi, H., Kinsman, T., Heslop, P., & Connolly, B. A. (2014). DNA polymerase hybrids derived from the family-B enzymes of *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis*: improving performance in the polymerase chain reaction. *Frontiers in microbiology*, 5, 224.
128. Lee, J. I., Cho, S. S., Kil, E. J., & Kwon, S. T. (2010). Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from *Thermococcus pacificus*. *Enzyme and microbial technology*, 47(4), 147-152.
129. Halley, G., & Prezioso, V. (2003). Eppendorf HotMaster—an innovative hot start/cold stop technology for better PCR* results. *Tech Notes (Eppendorff-HotMaster)*, 76-79.
130. Tveit, H., & Kristensen, T. (2001). Fluorescence-based DNA polymerase assay. *Analytical biochemistry*, 289(1), 96–98.

131. Driscoll, M. D., Rentergent, J., & Hay, S. (2014). A quantitative fluorescence-based steady-state assay of DNA polymerase. *The FEBS Journal*, 281(8), 2042-2050.
132. Ma, C., Tang, Z., Wang, K., Tan, W., Li, J., Li, W., Li, Z., Yang, X., Li, H., & Liu, L. (2006). Real-time monitoring of DNA polymerase activity using molecular beacon. *Analytical biochemistry*, 353(1), 141–143.
133. Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, 249(22), 7130–7139.
134. Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*, 65(10), 1357–1369.
135. Gibbs, M. D., Reeves, R. A., Mandelman, D., Mi, Q., Lee, J., & Bergquist, P. L. (2009). Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. *Extremophiles*, 13, 817-826.
136. Killelea, T., Ralec, C., Bossé, A., & Henneke, G. (2014). PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase. *Frontiers in microbiology*, 5, 195.
137. Cho, S. S., Kim, K. P., Lee, K. K., Youn, M. H., & Kwon, S. T. (2012). Characterization and PCR application of a new high-fidelity DNA polymerase from *Thermococcus waiotapuensis*. *Enzyme and microbial technology*, 51(6-7), 334–341.
138. Kim, Y. J., Lee, H. S., Bae, S. S., Jeon, J. H., Lim, J. K., Cho, Y., Nam, K. H., Kang, S. G., Kim, S. J., Kwon, S. T., & Lee, J. H. (2007). Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(7), 1090–1097.
139. Lee, J. I., Kil, E. J., Song, J. G., Kim, Y. J., Choi, J. J., Shim, H., & Kwon, S. T. (2009). Characterization and PCR optimization of the thermostable family B DNA polymerase from *Thermococcus guaymasensis*. *Enzyme and microbial technology*, 45(2), 103-111.
140. Terpe K. (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(24), 10243–10254.
141. Zhang, L., Kang, M., Xu, J., & Huang, Y. (2015). Archaeal DNA polymerases in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6585–6597.

142. Saghatelyan, A., Panosyan, H., Trchounian, A., & Birkeland, N. K. (2021). Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *MicrobiologyOpen*, 10(1).
143. Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., & Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108(1), 1–6.
144. Kelman, Z., Hurwitz, J., & O'Donnell, M. (1998). Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure (London, England : 1993)*, 6(2), 121–125.
145. Zheng, W., Wang, Q., & Bi, Q. (2016). Construction, Expression, and Characterization of Recombinant Pfu DNA Polymerase in *Escherichia coli*. *The protein journal*, 35(2), 145–153.
146. Erlich, H. A., Gelfand, D., & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5013), 1643–1651.
147. Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., & Ishino, Y. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Frontiers in microbiology*, 5, 461.
148. Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422.
149. Samman, N., Al-Muhalhil, K., & Nehdi, A. (2023). A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography. *Journal of King Saud University - Science*, 35(3), 102565.
150. Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., & Slesarev, A. I. (2004). Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends in biotechnology*, 22(5), 253–260.
151. Ignatov, K., Kramarov, V., & Billingham, S. (2009). Chimeric DNA polymerase. *U.S. Patent Application No. 11/658,610*, US20090209005A1.

12. Wykaz rysunków

Rysunek 1. Najważniejsze wydarzenia prowadzące do odkrycia polimerazy DNA oraz rozwoju reakcji PCR innych metod amplifikacji DNA [Grafika stworzona z wykorzystaniem platformy BioRender Joanna Nowicka 2023] [11][12][6][9][13].	26
Rysunek 2. Struktura krystalograficzna polimerazy DNA Taq [opracowanie na podstawie: [11].	32
Rysunek 3. Struktura krystalograficzna polimerazy DNA Pfu [18] [14].	34
Rysunek 4. Mechanizm aktywacji polimerazy DNA przez jony magnezu Mg^{2+} podczas reakcji PCR [38].	37
Rysunek 5. Analiza sekwencji aminokwasowej homologów Sac7d. A porównanie sekwencji aminokwasowej homologów z rodziny Sul7d4. B Dwie orientacje struktury Sac7d (kod pdb 1AZP) reprezentujące identyczne reszty wśród trzynastu białek (zielony), te które nie są konserwowane (czerwony) i Thr17 (niebieski). Łańcuchy boczne reszt, które biorą udział w interakcji DNA, są przedstawione jako zielone pałeczki. [106]. ...	50
Rysunek 6. Strategie inżynierii genetycznej stosowane do projektowania nowych polimeraz DNA [opracowanie własne]	52
Rysunek 7. Przykładowe dziedziny nauki zależne od polimeraz DNA [Grafika stworzona przy wykorzystaniu platformy BioRender Joanna Nowicka 2023]	56
Rysunek 8. Markery wielkości DNA [rysunek producenta]	66
Rysunek 9. Marker masy cząsteczkowej białek [rysunek producenta]	68
Rysunek 10. Wykres zależności fluorescencji barwnika EvaGreen od czasu prowadzenia amplifikacji	89
Rysunek 11. Sekwencja oraz struktura białek Sso7d z <i>Sulfolobus solfataricus</i> oraz NeqSSB z <i>Nanoarchaeum equitans</i> . A Sekwencja Sso7d. Struktury drugorzędowe są wskazane pod sekwencją kolorami niebieskim, zielonym oraz różowym. Dziewięć pogrubionych i podkreślonych aminokwasów wskazuje zmienność aminokwasową. B Struktura białka Sso7d z domenami oznaczonymi kolorami (PDB ID 1BNZ). C Wymodelowana struktura białka NeqSSB wraz z wskazaniem rejonu oddziałującego w DNA.	104
Rysunek 12. Schemat przedstawiający otrzymane warianty fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, z uwzględnieniem wykorzystanych starterów [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3	

NeqSSB-Pfu-Sso7d, natomiast Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d 105

Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA i białka referencyjnego otrzymanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, gdzie V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d..... 106

Rysunek 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR genów kodujących fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.1.5]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza NeqSSB-Pfu-Sso7d; 107

Rysunek 15. Schemat klonowania techniką Gibsona na podstawie wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d [opracowanie własne z wykorzystaniem platformy BioRender, Joanna Nowicka 2023] 108

Rysunek 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego reakcji PCR kolonijnej przeprowadzonej z wykorzystaniem jako źródła matrycy DNA kolonii bakteryjnych [Met. 7.3]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; 109

Rysunek 17. Porównanie sekwencji genu kodującego referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d uzyskanej po złożeniu dostępnych sekwencji z bazy NCBI wraz z sekwencją uzyskaną w dzięki sekwencjonowaniu DNA plazmidu ekspresyjnego pET30-Pfu-Sso7d. Sekwencja oznaczona skrótem „sekwRef1” jest wynikiem otrzymanym po sekwencjonowaniu, natomiast jako „Pfu_Sso7d” oznaczono sekwencję planowaną do uzyskania dla konstruktów DNA kodujących polimerazę referencyjną 112

Rysunek 18. Wynik rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Met. 7.5.1] przedstawiający nadprodukcję fuzyjnych form polimerazy DNA [Met. 7.4.1]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; rozdziel w 12% żelu poliakrylamidowym czas rozdziału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1]; X – V1 Pfu-Sso7d-Sso7d lub V2 Sso7d-Pfu-Sso7d lub V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d 113

Rysunek 19. Wynik rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Met. 7.5.1] przedstawiający nadprodukcję referencyjnej fuzyjnej polimerazy DNA [Met. 7.4.1], gdzie Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; rozdziel w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdziału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1];

.....	114
Rysunek 20. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS-PAGE przedstawiający efekty oczyszczania badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na kolumnie chromatograficznej zawierającej złożę His-Trap [Mat. 6.12.2, Met. 7.6]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; rozdział w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdzału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1]; X– V1 Pfu-Sso7d-Sso7d lub V2 Sso7d-Pfu-Sso7d lub V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; Y – bufor B (40 mM imidazol) dla V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, bufor C (100 mM imidazol) dla V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz NeqSSB-Pfu-Sso7d.....	115
Rysunek 21. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS-PAGE przedstawiający efekty oczyszczania badanej fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d na kolumnie chromatograficznej His-Trap [Mat. 6.12.2, Met. 7.6]. Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; rozdział w 12% żelu poliakrylamidowym, czas rozdzału: 60 min, napięcie: 160 V [Mat. 6.12.1, Met. 7.5.1];	116
Rysunek 22. Wynik rozdzału elektroforetycznego przedstawiający obecność pozostałości genomowego DNA <i>E. coli</i> przed oraz po trawieniu saltonazą [Met.7.7, 7.8.1]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];.....	117
Rysunek 23. Wynik rozdzału elektroforetycznego produktów PCR powstałych podczas amplifikacji polimorficznego regionu 16S-23S operonu rDNA z <i>E. coli</i> [Mat. 6.9.2, Met. 7.8.1]. 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzału: 35 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];.....	118
Rysunek 24. Wynik rozdzału elektroforetycznego dla produktów PCR amplifikowanych z wykorzystaniem badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d oraz Ref1 Pfu-Sso7d przy użyciu 4 różnych komercyjnie dostępnych buforów reakcyjnych: 1 – 4 5x bufor GC Phusion, 5 – 8 5x bufor HF Phusion, 9–12 5x bufor Q5, 13 – 16 5x bufor OneTaq Standard [Mat. 6.10, Met. 7.8.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdzału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3];	121
Rysunek 25. Wykresy przedstawiające zmiany wydajności amplifikacji DNA dla	

fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA pod wpływem dodatku $MgCl_2$, KCl , oraz $(NH_4)_2SO_4$. Wyniki dla wariantów V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d odnoszone są do wyników uzyskanych dla Ref1 Pfu-Sso7d. Wartości aktywności fuzyjnych form polimerazy DNA w analizowanych warunkach zostały oznaczone przy pomocy densytometrii z wykorzystaniem programu GelAnalyzer [Met. 7.11] na podstawie rozdziału elektroforetycznego produktów PCR w 2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]. Pomarańczowe znaczniki odnoszą się do wyników referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, natomiast niebieskie do pozostałych wariantów uzyskanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d [Met. 7.8.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d 122

Rysunek 26. Wykresy zależności fluorescencji stosowanego barwnika EvaGreen [Mat.6.15] od czasu trwania amplifikacji DNA dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Obok wykresu kolorami określono rozcieńczenia fuzyjnych form polimerazy DNA. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d 127

Rysunek 27. Wykres zależności fluorescencji stosowanego barwnika EvaGreen [Mat.6.15] od czasu trwania amplifikacji DNA dla wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA. Obok wykresu kolorami określono stosowane rozcieńczenia fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d 128

Rysunek 28. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający minimalną ilość jednostek fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA potrzebnych do wydajnej amplifikacji DNA [Met. 7.15.1]. Wartości od 1 do 0,00049 są liczbą jednostek fuzyjnych form polimerazy DNA [U] dodawanej do reakcji PCR. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu to 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11.] 130

Rysunek 29. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA podczas inkubacji przez określony czas zarówno w

95°C jak i 99°C. Uzyskane wyniki porównywano do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Czerwony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 99°C natomiast niebieski określa zmiany dla pozostałych wariantów, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Pomarańczowy kolor przedstawia natomiast wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 95°C. Kolor niebieski podobnie jak w przypadku ustalania aktywności dla 99°C, oznacza wyniki otrzymane dla wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA. Aktywność określono z wykorzystaniem reakcji real-time PCR przy użyciu barwnika EvaGreen [Mat.6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu o określonej temperaturze topnienia w zależności od czasu inkubacji w wybranych temperaturach fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d 131

Rysunek 30. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności w trakcie inkubacji w zarówno w 95°C jak i 99°C w czasie do 3 h. Analizę przeprowadzono dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Czerwony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 99°C natomiast niebieski określa zmiany dla wariantu V2 tj. Sso7d-Pfu-Sso7d. Pomarańczowy kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d w 95°C. Kolor niebieski podobnie jak w przypadku ustalania dla 99°C, oznacza wyniki otrzymane dla wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. Aktywność określono z wykorzystaniem reakcji real-time PCR z udziałem barwnika EvaGreen [Mat. 6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu PCR o określonej temperaturze topnienia (T_m) w zależności od czasu inkubacji w określonych temperaturach [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d 132

Rysunek 31. Wykresy przedstawiające zmiany aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA po pozostawieniu ich w temperaturze pokojowej (próbki pobrano po 24 h i 72 h). Uzyskane wyniki porównywano do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. Zielony kolor przedstawia wyniki uzyskane dla referencyjnej

polimerazy DNA, natomiast niebieski określa zmiany aktywności dla pozostałych wariantów, tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Aktywność, podobnie jak w przypadku termostabilności w temperaturach 99°C oraz 95°C, ustalono z wykorzystaniem reakcji real-time PCR przy użyciu barwnika EvaGreen [Mat. 6.15], który pozwolił na oszacowanie różnic w wydajności powstawania produktu PCR o określonej temperaturze topnienia [Met. 7.9.2]. W reakcji real-time PCR wykorzystano startery DM2 F/DM2 R [Mat. 6.9.2], temperatura topnienia dla uzyskanego produktu wynosiła 85°C. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d..... 133

Rysunek 32. Wykresy przedstawiające analizę porównawczą temperatur topnienia dla fragmentów DNA powstałych wskutek prowadzonej izotermicznej reakcji wydłużania przez badane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA tj. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d. W górnej części wykresu oznaczono liczbę nukleotydów, o które zostało wydłużone DNA matrycowe. Kolorem pomarańczowym została oznaczona krzywa topnienia odpowiadająca próbkom pobranym w czasie $t = 0$ min tj. przed zainicjowaniem reakcji (obserwujemy krzywą dla dimeru starter-matryca DNA), kolorem granatowym po czasie 30 s od zainicjowania reakcji, kolorem fioletowym po 1 min od zainicjowania reakcji, kolorem zielonym po 2 minutach od zainicjowania reakcji, natomiast kolorem niebieskim po 5 min od zainicjowanej reakcji. Inkubacja po zainicjowaniu reakcji była prowadzona w 72°C [Met. 7.9.3]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d 137

Rysunek 33. Wyniki rozdziłu elektroforetycznego produktów PCR o określonej wielkości (300 pz, 500 pz, 1000 pz) uzyskanych przy wykorzystaniu fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami zostały określone zastosowane czasy elongacji dla przeprowadzonych reakcji PCR [Met. 7.9.4]. W reakcji PCR wykorzystano startery: VPS13B F/VPS13B R, oczekiwana wielkość produktu 300 pz; HEMA1 F/HEMA1 R, oczekiwana wielkość produktu 500 pz oraz pET F/pET R, oczekiwana wielkość produktu 1000 pz. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziłu: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat.

6.11] 138

Rysunek 34. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające analizę czułości fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami oznaczono wykorzystane w reakcji PCR rozcieńczenia genomowego DNA [Met. 7.9.5]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 140

Rysunek 35. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające zdolność amplifikacji matrycy bogatej w pary GC przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami oznaczono liczbę jednostek aktywności [U] fuzyjnej formy polimerazy DNA dodawanej do reakcji PCR [Met. 7.9.6]. W reakcji PCR wykorzystano startery MC15 F/ MC15 R, oczekiwana wielkość produktu 300 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 141

Rysunek 36. Wyniki rozdziału elektroforetycznego umożliwiające porównanie wpływu stosowanych inhibitorów: heparyny oraz krwi psiej na wydajność amplifikacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenia dla każdego z wykorzystywanych inhibitorów [Met. 7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz oraz WFFS F/ WFFS R o oczekiwanej wielkości produktu 284 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 143

Rysunek 37. Wyniki rozdziału elektroforetycznego umożliwiające porównanie wpływu krwi pełnej EDTA jako matrycy (jednocześnie inhibitor i źródło matrycy) w reakcji PCR na wydajność amplifikacji przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanej krwi pełnej EDTA do mieszaniny reakcyjnej [Met.7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R,

oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 144

Rysunek 38. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku ampicyliny na wydajność amplifikacji DNA przez otrzymane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego antybiotyku do mieszaniny reakcyjnej [Met. 7.9.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat.6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 146

Rysunek 39. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku 100% izopropanolu oraz 70% etanolu na wydajność amplifikacji DNA przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego inhibitora do mieszaniny reakcyjnej. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]..... 147

Rysunek 40. Wyniki rozdziału elektroforetycznego porównujące wpływ dodatku kwasu humusowego na wydajność amplifikacji DNA przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Nad studzienkami umieszczono stężenie dodawanego inhibitora do mieszaniny reakcyjnej [Met. 7.15.7]. W reakcji PCR wykorzystano startery DM2 F/ DM2 R, oczekiwana wielkość produktu 294 pz [Mat. 6.9.2]. V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11]..... 148

Rysunek 41. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające wpływ zmiennej temperatury hybrydyzacji starterów na amplifikację genu *SOD1* przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA [Met. 7.9.8]. Wykorzystane w reakcji PCR startery to

DM2 F/DM2 R, a oczekiwana wielkość produktu to 294 pz. Nad studzienkami umieszczono temperatury, które zastosowano podczas hybrydyzacji starterów w reakcji PCR. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3], M – marker wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Mat. 6.11] 150

Rysunek 42. Wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawiające rezultaty testu EMSA w obecności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA z ssDNA oraz dsDNA [Met. 7.9.9]. V1 oznacza V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 oznacza V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 oznacza V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d, a Ref1 oznacza Ref1 Pfu-Sso7d; 2% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny [Mat. 6.11]; czas rozdziału: 25 min; napięcie: 100 V [Met. 7.1.3]; Mieszanina nakładana na żel zawierała 10 pmol fluorescencyjnie znakowanego oligonukleotydu d(T)₇₆ [Mat. 6.15] oraz 2,5 pmol produktu PCR o długości 191 pz . 152

13. Wykaz tabel

Tabela 1. Subdomeny oraz domeny wchodzące w skład polimerazy DNA oraz ich funkcje.....	28
Tabela 2. Tabelaryczne zestawienie informacji dotyczących klasyfikacji polimeraz DNA i RNA.....	29
Tabela 3. Porównanie polimerazy DNA Taq oraz Pfu.....	34
Tabela 4. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy dla reakcji PCR.....	36
Tabela 5. Tabelaryczne zestawienie inhibitorów wraz z potencjalnym mechanizmem inhibicji.....	41
Tabela 6. Lista popularnych wzmacniaczy wraz z pełnionymi funkcjami w reakcji PCR.....	42
Tabela 7. Tabelaryczne zestawienie najpopularniejszych modyfikacji polimeraz DNA Taq oraz Pfu stosowanych w reakcjach PCR.....	48
Tabela 8. Spis enzymów restrykcyjnych wykorzystywanych w reakcjach trawienia.....	59
Tabela 9. Startery wykorzystywane do otrzymania zaprojektowanych fuzyjnych form polimerazy DNA.....	60
Tabela 10. Startery wykorzystywane podczas testów otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA.....	61
Tabela 11. Startery wykorzystywane do oznaczania procesywności – ustalenie temperatury topnienia produktów markerowych.....	63
Tabela 12. Bufory reakcyjne testowane w prowadzonych reakcjach PCR.....	64
Tabela 13. Skład stosowanych żeli poliakrylamidowych do rozdzielania białek metodą SDS-PAGE.....	66
Tabela 14. Skład pierwszej mieszaniny reakcyjnej PCR – insert 1.....	75
Tabela 15. Profil temperaturowo-czasowy – insert 1.....	75
Tabela 16. Skład drugiej mieszaniny reakcyjnej PCR – insert 2.....	75
Tabela 17. Profil temperaturowo-czasowy – insert 2.....	75
Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia enzymami restrykcyjnymi.....	76
Tabela 19. Przeliczanie ilości składników do reakcji Gibsona na przykładzie wariantu V2 Sso7d-Pfu-Sso7d fuzyjnej formy polimerazy DNA.....	77

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji Gibsona.	77
Tabela 21. Mieszanina reakcyjna PCR.....	80
Tabela 22. Profil temperaturowo-czasowy	80
Tabela 23. Przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej PCR	84
Tabela 24. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy wykorzystywany w reakcjach PCR.....	84
Tabela 25. Mieszanina reakcyjna PCR.....	85
Tabela 26. Profil temperaturowo-czasowy	86
Tabela 27. Mieszanina reakcyjna PCR – wybór optymalnego buforu.	87
Tabela 28. Profil temperaturowo-czasowy	87
Tabela 29. Skład mieszaniny reakcyjnej	88
Tabela 30. Profil temperaturowo-czasowy stosowanej reakcji izotermicznej ...	88
Tabela 31. Mieszanina reakcyjna PCR.....	90
Tabela 32. Profil temperaturowo-czasowy	90
Tabela 33. Mieszanina reakcyjna PCR.....	91
Tabela 34. Profil temperaturowo-czasowy	92
Tabela 35. Mieszanina reakcyjna PCR.....	93
Tabela 36. Profil temperaturowo-czasowy	93
Tabela 37. Profil temperaturowo-czasowy	93
Tabela 38. Zestawienie temperatur topnienia produktów markerowych.	94
Tabela 39. Mieszanina reakcyjna PCR.....	95
Tabela 40. Profil temperaturowo-czasowy	95
Tabela 41. Mieszanina reakcyjna PCR.....	96
Tabela 42 Profil temperaturowo-czasowy	96
Tabela 43. Mieszanina reakcyjna PCR.....	97
Tabela 44. Profil temperaturowo-czasowy	97
Tabela 45. Mieszanina reakcyjna PCR.....	98
Tabela 46. Profil temperaturowo-czasowy	98
Tabela 47. Mieszanina reakcyjna PCR.....	99
Tabela 48. Profil temperaturowo-czasowy	100
Tabela 49. Mieszanina reakcyjna PCR.....	100
Tabela 50. Profil temperaturowo-czasowy	101
Tabela 51. Obliczeniowa masa molekularna badanych białek na podstawie	

ProtParam	113
Tabela 52. Wydajność otrzymywania fuzyjnych polimeraz DNA z 1 l hodowli bakteryjnej	119
Tabela 53. Zakresy optymalnych warunków działania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	123
Tabela 54. Zestawienie wyników reakcji PCR przeprowadzonych w różnych buforach reakcyjnych, w których testowano działanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (+ działa bez względu na stosowane testy diagnostyczne [Mat. 6.9.2], +/- działa tylko w wybranych warunkach reakcyjnych, - nie działa).....	124
Tabela 55. Zestawienie optymalnych zakresów pH buforów reakcyjnych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	125
Tabela 56. Skład optymalnych buforów reakcyjnych dla fuzyjnych form archealnej polimerazy polimeraz DNA. A - bufor dla wariantów Ref1 Pfu-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d; B- bufor dla wariantu V1 Pfu-Sso7d-Sso7d	125
Tabela 57. Ilość jednostek aktywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d	129
Tabela 58. Zestawienie aktywności specyficznej fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	129
Tabela 59. Zestawienie wyznaczonych minimalnych liczb jednostek dla każdej z fuzyjnych form polimerazy DNA umożliwiających amplifikację DNA.....	130
Tabela 60 Zestawienie wyników czasu półtrwania fuzyjnych form polimerazy DNA w temperaturach: 95°C, 99°C oraz w T_{pok}	134
Tabela 61. Porównanie procesywności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na podstawie określonej temperatury topnienia w odniesieniu do produktów markerowych.....	136
Tabela 62. Zestawienie uzyskanych wyników dla szybkości elongacji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d	139
Tabela 63. Wyniki przedstawiające czułość badanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA	140
Tabela 64. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń wykorzystywanych inhibitorów w próbce mieszaniny reakcyjnej przez fuzyjne formy archealnej polimerazy	

DNA.....	144
Tabela 65. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń krwi pełnej EDTA wykorzystanej w mieszaninie reakcyjnej przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA.....	145
Tabela 66. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń ampicyliny w mieszaninie reakcyjnej przez warianty fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA .	146
Tabela 67. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń 100% izopropanolu oraz 70% etanolu wykorzystanych w mieszaninie reakcyjnej przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA.....	148
Tabela 68. Zestawienie maksymalnych tolerowanych stężeń kwasu humusowego w mieszaninie reakcyjnej przez wybrane fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA	149
Tabela 69. Zestawienie zbadanych cech fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA.....	154
Tabela 70. Porównanie odporności na inhibitory fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA w odniesieniu do referencyjnej polimerazy DNA	154

14. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

1. Pleńkowska, J., Gabig-Cimińska, M., Mozolewski, P. (2020). Oxidative stress as an important contributor to the pathogenesis of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6206.

2. Bocheńska, K., Moskot, M., Malinowska, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Szczerkowska-Dobosz, A., Purzycka-Bohdan, D., **Pleńkowska, J.**, Słomiński, B., Gabig-Cimińska, M. (2019). Lysosome alterations in the human epithelial cell line HaCaT and skin specimens: relevance to psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2255.

Doniesienia konferencyjne

1. Pleńkowska, J., Bocheńska, K., Moskot, M., Gabig-Cimińska, M. (2020). Quantity of LAMP1 in Models Mimicking Psoriatic Inflammation, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 126 (Suppl.2), 13378

Uczestnictwo w konferencjach krajowych i międzynarodowych

1. International Conference on Biotechnology and Bioengineering (9th ICBB 2019), September 25-28, 2019 Poznan

Quantity of LAMP1 in Models Mimicking Psoriatic Inflammation, **Joanna Pleńkowska**, Katarzyna Bocheńska, Marta Moskot, Magdalena Gabig-Cimińska

2. III Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 25-28 czerwca 2019, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Analiza organelli należących do przedziału endosomalno-lizosomalnego w hodowli linii keratynocytów HaCaT, mimikujących łuszczycowy stan zapalny, **Joanna Pleńkowska**, Katarzyna Bocheńska, Marta Moskot, Magdalena Gabig-Cimińska

3. IX Kongres Technologii Chemicznej TECHEM 2018, 3-7 września 2018, Politechnika Gdańska

Wpływ fungicydów z grupy azoli na występowanie porażek klinicznych podczas leczenia zakażeń grzybiczych *Aspergillus fumigatus*, Martyna Mroczyńska, **Joanna Pleńkowska**, Anna Brillowska-Dąbrowska

Projekty

1. Kierownik Wydziałowego Projektu Młodych Naukowców pt. „Fuzyjna polimeraza DNA z białkami wiążącymi jedno- i dwuniciowe DNA – produkcja, charakterystyka i zastosowanie w trudnych reakcjach PCR.”, nr projektu 539-D000-B954-22, 2022

2. Kierownik Wydziałowego Projektu Młodych Naukowców pt. „Oznaczenie aktywności wybranych enzymów lizosomalnych w hodowli unieśmiertelnionej linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT) oraz keratynocytów pierwotnych (KC), w warunkach naśladujących łuszczycowy stan zapalny.”, nr projektu 539-D130-B438-20, 2020

3. Członek zespołu realizującego grant naukowy OPUS14 UMO-2017/27/B/NZ3/02212 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, „Poznanie molekularnych podstaw regulacji aktywności lizosomu, potencjalnego celu interwencji terapeutycznej w chorobach zapalnych skóry, na przykładzie łuszczycy” (od października 2018 do marca 2021)