



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παραγωγή DNA Πολυμεράσης για Εργαστηριακή Χρήση

Ιωάννα Αναστασίου

Λεμεσός, 2020

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παραγωγή DNA Πολυμεράσης για Εργαστηριακή Χρήση

της

Ιωάννας Αναστασίου

Λεμεσός, Μάιος 2020

Έντυπο έγκρισης

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παραγωγή DNA Πολυμεράσης για Εργαστηριακή Χρήση

Παρουσιάστηκε από

Ιωάννα Αναστασίου

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Δημήτρης Τσάλτας

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάιος 2020

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ιωάννα Αναστασίου, 2020

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής εργασίας μου Δρ. Δημήτρη Τσάλτα του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου που με στήριζε και με ενθάρρυνε σε κάθε μου επιλογή και προσπάθεια για όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρακάτω βιβλιογραφική μελέτη παρουσιάζονται οι κύριες ιδιότητες των DNA πολυμερασών στις οποίες οφείλεται η συμμετοχή της πολυμεράσης στην *in vitro* DNA σύνθεση. Λόγω της συμμετοχής της στην διαδικασία σύνθεσης, διάφορες σύγχρονες μοριακές τεχνικές όπως PCR, τεχνολογίες αλληλούχισης, τεχνικές ισοθερμικής ενίσχυσης, δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών και DNA μικροσυστοιχιών δεν θα μπορούσαν να αναπτυχθούν.

DNA πολυμεράσες που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μικροοργανισμούς κυρίως από θερμοφιλά βακτήρια και αρχαία αποτελούν σήμερα ένα σχετικό φθινό και ταυτοχρόνως απαραίτητο μέσο γρήγορης αντιγραφής DNA. Η αντιγραφή αυτή χαρακτηρίζεται τις περισσότερες φορές ως υψηλής πιστότητας ή στην περίπτωση χρησιμοποίησης της πολυμεράσης σε πειράματα μεταλλαξιόγνεσης χαρακτηρίζεται αντιθέτως ως αντιγραφή χαμηλής πιστότητας.

Οι καλά διατηρημένες περιοχές τους όπως η περιοχή του αντίχειρα, της παλάμης και των δακτύλων βοηθούν στην σωστή τοποθέτηση του DNA και την μετέπειτα αντιγραφή του μέσω της επισύναψης dNTPs ακολούθως του εκκινήτη που επιμηκύνεται. Η αντιγραφή που πραγματοποιείται χαρακτηρίζεται από μεγάλη πιστότητα λόγω της proofreading λειτουργίας του ενζύμου.

Εκτός από τις σημαντικές ιδιότητες του ενζύμου, περιγράφεται ο τρόπος παραγωγής του, ο οποίος περιλαμβάνει την απομόνωση του γονιδίου ενδιαφέροντος της πολυμεράσης και την κλωνοποίηση του σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε κύτταρα *E.coli*.

Για την έκφραση και παραγωγή του ενζύμου από τα μετασχηματισμένα βακτήρια γίνεται επώαση υγρής καλλιέργειας, συλλογή των κυττάρων και λύσης τους για την απομόνωση του ενζύμου από το εκχύλισμα. Στοιχεία για τον καθαρισμό του ενζύμου καθώς και στοιχεία για την γενετική τροποποίηση του γονιδίου προς βελτίωση των χαρακτηριστικών του επίσης αναλύονται.

Τέλος η βιβλιογραφική αυτή ανασκόπηση κλείνει με μια σύντομη κοστολόγηση της γενικής διαδικασίας σύνθεσης που μπορεί να λαμβάνει μέρος σε ένα ερευνητικό εργαστήριο το οποίο κατέχει όλον τον κατάλληλο εξοπλισμό.

Λέξεις κλειδιά: DNA πολυμεράση, Taq DNA πολυμεράση, κόστος παραγωγής DNA πολυμεράσης, μεταλλαξιογένεση πολυμερασών, PCR, κλωνοποίηση, σύνθεση DNA πολυμεράση

ABSTRACT

In this literature review we are presenting the main properties of DNA polymerase to the participation *in vitro* DNA synthesis as well as the methodology to produce pure and active enzyme in laboratory settings for use in various research applications.

DNA polymerases that have been isolated and characterized by various microorganisms mainly from thermophilic bacteria and archaea and are a relatively cheap but at the same time necessary tool for the rapid replication of DNA in the laboratory environment. Their well-preserved areas such as the thumb, palm and fingers area help in the correct placement of DNA and its subsequent copying by attaching dNTPs to the elongated primer. Copying is characterized by high fidelity due to the proofreading function of the enzyme.

In addition to the biochemical properties of the enzyme, its synthesis is also described. This includes the isolation of the corresponding gene and its cloning in appropriate cloning and expression plasmid vector(s). Following the plasmid recombination the relevant plasmid is transformed in *E. coli*.

Production of recombinant DNA polymerase follows appropriate cell culture, cell lysis and enzyme purification. DNA polymerase gene mutations are also described as a tool for improved enzyme performance (higher nucleotide integration speed, better PCR performance and anti-fidelity through the cessation of its 3'-5' extracurricular activity).

Finally, in this bibliographic study, a brief reference is made to the costing of the general composition process that can take place in a research laboratory that owns all the appropriate equipment.

Keywords: DNA polymerase, Taq DNA polymerase, production of DNA polymerase cost, polymerase mutation, PCR, cloning, production of DNA polymerase