

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.193>

<https://orcid.org/0000-0001-6275-181X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Robertas

GALINIS

Mikrodalelių, susidedančių iš DNR ir  
magnio pirofosfato, sintezė ir jų  
panaudojimas *in vitro* baltymų  
ekspresijai

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
biochemija (N 004)

---

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2012–2017 metais studijuojant doktorantūroje Vilniaus Universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Prancūzijos ambasados stipendija, Šveicarijos valstybės Sciex-NMS<sup>ch</sup> stipendija, Nr. 13.014 ir Lietuvos-Šveicarijos bendradarbiavimo programa, projekto numeris CH-3-SMM-01/03.

**Disertacija ginama eksternu.**

**Mokslinis konsultantas – dr. Linas Mažutis** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Rolandas Meškys** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004).

Nariai:

**dr. Saulius Gražulis** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004);

**dr. Remigijus Skirgaila** (Thermo Fisher Scientific Baltic, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

**dr. Giedrius Vilkaitis** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

**dr. Algirdas Žiogas** (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. rugpjūčio mėn. 31 d. 12 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre ir/arba nuotoliniu būdu. Adresas: Saulėtekio al. 7, R-401, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4426; el. paštas [info@gmc.vu.lt](mailto:info@gmc.vu.lt) .

Disertaciją galima peržiūrėti VU bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Robertas  
GALINIS

SYNTHESIS OF DNA AND MAGNESIUM  
PYROPHOSPHATE PARTICLES AND  
THEIR USE FOR PROTEIN EXPRESSION  
*IN VITRO*

**DOCTORAL DISSERTATION**

Nature sciences,  
Biochemistry (N 004)

---

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2012 and 2017 while studying at Institute of Biotechnology, Vilnius University. The research was supported by French embassy scholarship, Swiss government Sciex-NMS<sup>ch</sup> scholarship, No. 13.014, and Lithuanian-Swiss cooperation grant, No. CH-3-SMM-01/03. **The dissertation is defended on an external basis.**

**Academic consultant – dr. Linas Mažutis** (Vilnius University, nature sciences, biochemistry, N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – prof. dr. Rolandas Meškys** (Vilnius University, nature sciences, biochemistry, N 004).

**Members:**

**Dr. Saulius Gražulis** (Vilnius University, nature sciences, biochemistry, N 004);

**Dr. Remigijus Skirgaila** (Thermo Fisher Scientific Baltic, nature sciences, biochemistry, N 004);

**Dr. Giedrius Vilkaitis** (Vilnius University, nature sciences, biochemistry, N 004);

**Dr. Algirdas Žiogas** (Centre for Innovative Medicine, nature sciences, biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12 hour on 31<sup>st</sup> of August 2021 in Room R-401 of the Vilnius University, Life Sciences Center or remotely.

Address: Saulėtekio Ave, 7, R-401, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 223 4426; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)



## TURINYS

TURINYS.....	5
SANTRUMPOS .....	7
ĮVADAS.....	9
MOKSLINIS NAUJUMAS .....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Pavienių DNR molekulių padauginimas .....	12
1.1.1. Pavienių DNR molekulių padauginimas PGR metodu .....	12
1.1.2. Pavienių DNR molekulių padauginimas izoterminiu metodu.....	14
1.2. In vitro baltymų sintezė.....	21
1.2.1. Šiuolaikinės in vitro baltymų sintezės sistemos komponentai .....	21
1.2.2. In vitro transkripcijos ir translacijos sistemų apžvalga .....	26
1.2.3. Kryptinga baltymų evoliucija panaudojant in vitro sistemas .....	33
1.3. Mikroskysčių technologija kryptingai evoliucijai.....	36
1.3.1. Mikroskysčių sistemos.....	36
1.3.2. Lašelių mikroskysčių sistemos moduliai .....	37
1.3.3. Mikroskysčių technologija in vitro evoliucijai.....	40
1.3.4. Darbe naudota mikroskysčių gardelė .....	41
1.4. DNR kondensacija į nano- ir mikrodaleles .....	43
1.4.1. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės .....	43
1.4.2. Neorganinės gėlės žiedlapį primenančios dalelės .....	46
1.4.3. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės dengtos baltymais .....	47
1.4.4. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės dengtos nukleorūgštimis .....	49
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	55
2.1. Medžiagos, priemonės ir prietaisai .....	55
2.1.1. Prietaisai.....	55
2.1.2. Priemonės.....	56
2.1.3. Reagentai.....	57
2.1.4. Komerciniai rinkiniai .....	58
2.1.5. Fermentai .....	58
2.1.6. Tirpalai .....	58
2.1.7. Nukleorūgštys .....	60
2.1.8. E. coli kamienai.....	60
2.2. Metodai .....	62
2.2.1. Terpės ruošimas ir ląstelių auginimas .....	62
2.2.2. Kompetentinių ląstelių ruošimas ir transformavimas.....	62
2.2.3. DNR gryninimas iš ląstelių kultūros .....	62
2.2.4. Glicerolio kultūros ruošimas .....	63
2.2.5. Restrikcinė analizė .....	63
2.2.6. DNR elektroforezė .....	63
2.2.7. DNR koncentracijos nustatymas .....	64

2.2.8. Mikrogardelių gamyba.....	64
2.2.9. DNR kiekio skaičiavimas naudojant Puasono skirstinį.....	66
2.2.10. DNR padauginimas lašeliuose .....	67
2.2.11. In vitro transkripcija ir transliacija.....	68
2.2.12. Reakcijos mišinio emulsifikavimas .....	70
2.2.13. Emulsijos įvertinimas fluorescenciniu mikroskopu .....	71
2.2.14. Lašelių dydžio įvertinimas.....	72
2.2.15. Fluorescuojančių lašelių kiekio įvertinimas.....	72
2.2.16. DNR dalelių gryninimas .....	74
2.2.17. Dalelių kiekio skaičiavimas .....	75
2.2.18. Dalelių dydžių analizė remiantis TEM nuotraukomis .....	75
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	77
3.1. Mikrogardelių pagaminimas ir testavimas .....	79
3.1. Pavienių DNR molekulių sintezė .....	79
3.2. Vienos DNR molekulės padauginimas ir DNR dalelių susidarymas .	83
3.2.1. Pradinės DNR padauginimo sąlygos.....	83
3.2.2. DNR dalelių susidarymo sąlygos.....	85
3.2.3. Nespecifinė adsorbicija .....	89
3.2.4. Kitos DNR padauginimo sąlygos.....	90
3.2.5. Inaktyvavimo karščiu įtaka .....	94
3.3. DNR dalelių gryninimas .....	97
3.3.1. DNR dalelių gryninimas iš agarozės.....	98
3.3.2. DNR dalelių gryninimas panaudojant REazę ir centrifugavimą.....	101
3.4. Baltymų sintezė in vitro nuo DNR dalelių.....	102
3.4.1. eGFP baltymo sintezė .....	103
3.4.2. LacZ baltymo sintezė .....	105
IŠVADOS.....	110
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	111
SUMMARY .....	128
Introduction .....	128
Scientific novelty.....	130
Methods.....	131
Results .....	137
Conclusions .....	159
Summary about PhD student.....	160
PADĖKA.....	161
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS .....	163

## SANTRUMPOS

(v/v) – *volume/volume* – koncentracija pagal tūrį / tūryje;  
(w/v) – *weight/volume* – koncentracija pagal masės dalį / tūryje;  
(w/w) – *weight/weight* – koncentracija pagal masės dalį / masėje;  
BSA – *bovine serum albumin* – jaučio serumo albuminas;  
CFPS – *cell-free protein synthesis* – belastelinė baltymų sintezė;  
CRISPR – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* –  
taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai;  
DLS – *dynamic light scattering* – dinaminis šviesos sklaidymo metodas;  
DTT – ditionitritolis;  
EF-G – *elongation factor G* – transliacijos ilginimo veiksnys G, dar  
vadinamas translokaze;  
EF-Ts – *elongation factor thermo stable* – termiškai stabilus transliacijos  
ilginimo veiksnys;  
EF-Tu – *elongation factor thermo unstable* – termiškai nestabilus  
transliacijos ilginimo veiksnys;  
EGTA – etilenglikolio-bis(β-aminoetileterio)-N,N,N',N'-tetraacto rūgštis;  
EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis;  
eGFP – *enhanced green fluorescent protein* – žaliai fluorescuojantis  
baltymas su pagerintu grandinės susisukimu 37°C;  
FACS – *fluorescence-activated cell sorting* – tėkmės citometrijos metodas,  
paprastai naudojamas išrūšiuoti ląsteles;  
FDG – fluoresceino-di-β-D-galaktopiranozidas;  
HeLa – nemirtinga gimdos kaklelio vėžinių ląstelių linija paimta iš Henrietos  
Laks (*angl. Henrietta Lacks*) 1951 m.;  
HIV – *human immunodeficiency virus* – žmogaus imunodeficito virusas;  
IF – *initiation factor* – transliacijos pradėties veiksnys;  
IVC – *in vitro compartmentalization* – *in vitro* kompartmentalizacija;  
IVTT – *in vitro* transkripcija ir transliacija;  
kbp – kilobazių poros;  
LacZ – fermentas β-galaktozidazė;  
LAMP – *loop mediated isothermal amplification* – izoterminis DNR  
padauginimo būdas pasitelkiant kilpas;  
MDA – *multiple displacement amplification* – amplifikacija / padauginimas  
daugybiniu nustūmimu;

Mg-PP<sub>i</sub> – magnio pirofosfatas;  
mpRCA – *multiply-primed rolling circle amplification* – riedančio rato padauginimo reakcija / amplifikacija, naudojant daug pradmenų;  
NAIMA – *NASBA implemented microarray analysis* – DNR mikrogardelių analizė paremta NASBA metodu;  
NASBA – *nucleic acid sequence based amplification* – nukleorūgščių seka paremtas padauginimas;  
NEB – įmonė New England Biolabs;  
NR – nukleorūgštis;  
PDMS – *polydimethylsiloxane* – polidimetilsiloksanas;  
PFO – 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanolis;  
phi29 – fagas phi29;  
Poloksameras 407 – nejoninis surfaktantas, kurio centrinė dalis sudaryta iš 56 propilenglikolio monomerų, o kraštinės dalys turi po 101 polietilenglikolio monomerą (12500 Da);  
PTFE – politetrafluoroetilenas;  
PTK7 – *protein tyrosine kinase 7* – 7-oji baltymų tirozino kinazė;  
RCA – *rolling circle amplification* – riedančio rato padauginimo reakcija / amplifikacija (dar žinoma RCR angl. *rolling circle replication*);  
RF – *release factor* – transliacijos baigties veiksnys;  
SEM – *scanning electron microscope* – skenuojantis elektroninis mikroskopas;  
SDS – sodium dodecyl sulfate – natrio dodecilsulfatas;  
S. F. V. – santykiniai fluorescencijos vienetai;  
Sgc8 – DNR aptameras, atrinktas pagal giminingumą CCRF-CEM leukemijos ląstelių linijai;  
T7 RNR polimerazė – fago T7 RNR polimerazė;  
TEM – *transmission electron microscope* – peršviečiamas elektroninis mikroskopas;  
Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)propano-1,3-diolis.

## ĮVADAS

Didelio našumo (*angl.* high throughput) metodai vis dažniau naudojami įvairioms mokslinėms problemoms spręsti, pavyzdžiui, naujų vaistų vystyme (Gupta ir kt., 2017), naujų fermentinių aktyvumų paieškai genominėse bibliotekose (Zapata-Pérez ir kt., 2016), optimalių augimo sąlygų suradimui (De Diego ir kt., 2017) ar naujų rūšių aptikimui mikrobiomos mėginiuose (Lynch ir Neufeld, 2016). Tačiau, net naudojant robotizuotas sistemas, tokio pobūdžio darbai užtrunka ilgai ir reikalauja nemažų išlaidų reagentams (Price ir Paegel, 2016). Vis dažniau didelės patikros reikalaujančių problemų sprendimui pasirenkama lašelių mikroskysčiuose technologija (*angl.* droplet microfluidics) – metodas, kuris nenusileidžia savo našumu roboto darbui, tačiau gali sumažinti išlaidas 8 kartais (Huang ir Densmore, 2014).

Mikroskysčių technologija yra pritaikoma įvairiose srityse: molekulių detektavimui, medicininiams ir fluorescenciniam vaizdinimui, vaistų pernešimui, diagnostikai bei ląstelių tyrimuose (Chou ir kt., 2015). Be jau išvardintų sričių, ši technologija yra pritaikoma ir kryptingai baltymų evoliucijai (Gielen ir kt., 2018, Obexer ir kt., 2016 ir Ryckelynck ir kt., 2015). Dažnai kryptingos evoliucijos darbai yra pradami genetinės medžiagos padauginimo žingsniu, nes, net naudojant kelių pikolitrų tūrio lašelius, vienos DNR molekulės nepakanka efektyviai baltymo sintezei (Fallah-Araghi ir kt., 2012 ir Stapleton ir Swartz, 2010).

Šio darbo metu siekėme sukurti metodą, kuris leistų viename mikroskopiniame lašelyje turėti daug tos pačios DNR molekulės kopijų. Taip pat buvo siekiama surasti tokias reakcijos sąlygas, kurios leistų patogiai surinkti ir išgryninti padaugintas DNR molekules ir, jų nesumaišius, panaudoti kitoms reakcijoms. Toks, sėkmingai išvystytas, metodas ateityje galėtų būti panaudotas ne tik kryptingai baltymų evoliucijai, bet ir ląstelių vizualizavimui ar priešvėžinio vaisto pernešimui (Zhu ir kt., 2013 ir Lee ir kt., 2012). Darbo metu buvo sukurtos DNR mikrodalės, kurios nekelia pavojaus aplinkai ir žmogui, nes jų sintezei yra naudojamos natūralios, gamtoje randamos medžiagos: magnis, pirofosfatas ir nukleorūgštys (Shopsowitz ir kt., 2014).

**Darbo tikslas:** pavienių DNR molekulių padauginimo ir kondensavimo į mikrodaleles paruošiamieji darbai, dalelių susidedančių iš DNR ir magnio pirofosfato gryninimas ir panaudojimas baltymų sintezei *in vitro*.

**Darbo uždaviniai:**

1. Atlikti pavienių DNR molekulių padauginimą lašeliuose;
2. Ištirti reakcijos sąlygas, turinčias įtakos DNR dalelių, susidedančių iš padaugintos DNR ir magnio pirofosfato kristalų, susidarymui lašeliuose;
3. Atskirti DNR daleles nuo kitų reakcijos komponentų ir laisvos DNR, kuri lieka tirpale;
4. Įvertinti DNR dalelių taikomumą *in vitro* transkripcijos ir translacijos reakcijoje.

## MOKSLINIS NAUJUMAS

Šio darbo metu buvo išvystytas izoterminis DNR padauginimo metodas leidžiantis pavienes, žiedines DNR molekules konvertuoti į DNR ir magnio pirofosfato mikrodaleles. DNR buvo amplifikuojama 4 pikolitru tūrio vandens lašeliuose naudojant phi29 DNR polimerazę ir kitus, DNR sintezei reikiamus reakcijos komponentus. Darbo metu buvo rastos sąlygos sumažinančios DNR praradimą dėl nespecifinės adsorbcijos mažų koncentracijų DNR tirpaluose (mažiau nei 100 pg/μl). Taip pat ištirta įvairių DNR padauginimo reakcijos komponentų įtaka mikrodalelių susidarymui. Parinktos tokios reakcijos sąlygos, kuriose susintetintas nukleorūgšties kiekis yra pakankamas, kad ji, kartu su magnio pirofosfatu, suformuotų mikrometro dydžio daleles. Nors panašaus tipo struktūros buvo gautos ankstesniuose darbuose matrica panaudojant DNR molekulių mišinį, tačiau šiame darbe pirmą kartą šios sudėtingos struktūros dalelės buvo gautos nuo pavienių DNR molekulių. Taip pat darbo metu buvo ištirta kokią įtaką dalelių susidarymui ir dalelių dydžių pasiskirstymui turi phi29 DNR polimerazės inaktyvavimas karščiu. Mūsų turimomis žiniomis, pirmą kartą šios DNR dalelės buvo gautos pasitelkiant riedančio rato DNR amplifikaciją, naudojančią nespecifinius, 3'→5' egzozonukleaziniam aktyvumui atsparius 6 nt pradmenis (*angl.* multiply-primed rolling circle amplification – mpRCA). Susintetinus mikrodaleles, susidedančias iš DNR ir magnio pirofosfato, buvo įvertintas jų išskyrimas iš reakcijos mišinio panaudojant centrifugavimą ir restrikcijos endonukleazes. Išgrynintos dalelės buvo panaudotos kaip matrica baltymų sintezei *in vitro*, sėkmingai susintetinant eGFP baltymą ir fermentą β-galaktozidazę.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, jog darbų metu buvo išvystytas metodas, leidžiantis padauginti pavienes DNR molekules ir sukondensuoti padaugintą DNR į mikrodaleles. Ateityje toks metodas galėtų pasitarnauti kuriant naują mikroskysčių *in vitro* evoliucijos technologiją.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Pavienių DNR molekulių padauginimas

Pavienių DNR molekulių padauginimas yra molekulinės biologijos metodas dažnai naudojamas DNR sekoskaitoje, pavienių ląstelių tyrimuose ar *in vitro* evoliucijos metoduose (Thompson ir Milos, 2011). Tačiau XX amžiaus 10-ojo dešimtmečio pabaigoje buvo pastebėta, kad bandyti padauginti pavienes DNR molekules atskiestuose reakcijos tirpaluose įprastos PGR pagalba yra neefektyvu (Kalinina ir kt., 1997). Problemą pradėta spręsti mažinant reakcijos tūrį ir taip didinant DNR koncentraciją. Šios idėjos praktinis įgyvendinimas pirmą kartą buvo atliktas mikrokapiliare (Kalinina ir kt., 1997). Vėliau atsiradusi mikroskysčių technologija pasiūlė daugiau ir įvairesnių būdų sumažinti reakcijos tūrį ir padidinti reakcijų našumą: mikroskysčių sklendinės sistemos, mikroskysčių šulinėliai ar monodispersiniai lašeliai (Quan ir kt., 2018).

DNR padauginimo reakcijos tūris buvo mažinamas nuo nL (mikroskysčių sklendinės ar mikroskysčių besisukančių diskų sistemos) iki pl (atviri mikrošulinėliai, mikroskysčių ertmės ar lašeliai) (Quan ir kt., 2018) ar net fL (mikroskysčių lašeliai ar mikroreaktoriai) (Leman ir kt., 2015 ir Men ir kt., 2012). Yra net sukurtos lašelių sistemos, kurios panaudojo atolitrų tūrio lašelius ( $1 \times 10^{-18}$  litro)  $\beta$ -galaktozidazės ir šarminės fosfatazės fermentinių reakcijų stebėjimui (Ono ir kt., 2018). Mažo tūrio sistemos suteikia ne vieną pranašumą DNR padauginimo reakcijoms atlikti: mažesnės reagentų sąnaudos, mažesnis DNR padauginimo nuokrypis (angl. amplification bias) ir mažesnė svetimos DNR įtaka (Nishikawa ir kt., 2015). Tačiau šios sistemos turi ir silpnų vietų, pavyzdžiui, padauginti ilgesnius DNR fragmentus gali būti sudėtinga (Guttenberg ir kt., 2005).

### 1.1.1. Pavienių DNR molekulių padauginimas PGR metodu

Vieni pirmųjų bandymų padauginti pavienes DNR molekules mikroskysčių sistemose buvo atlikti pritaikant įprastą PGR. Pirmosios tokios sistemos naudojo sklendines mikroskysčių sistemas, kuriose reakcijos tūris būna keli šimtai pikolitrų ar keliolika nanolitrų. Pavyzdžiui, 450 pl tūrio mikroreaktoriuose pavyko padauginti 34 RNR molekules (Marcus ir kt., 2006) arba nanolitrų tūryje - <11 RNR molekulių (Toriello ir kt., 2006). Vykdamas kiekybinę PGR 33 nL tūrio reaktoriuose buvo nustatyta viena



kDNR molekulė (Morrison ir kt., 2006). Sklendinės mikroskysčių sistemos suteikia galimybę padauginti pavienes DNR molekules ir tai atlikti tuo pat metu keliuose atskiruose mikroreaktoriuose, esančiuose vienoje mikrogardelėje. Todėl šios sistemos vis dažniau pritaikomos įvairiuose analizės metoduose. Pavyzdžiui, yra sukurta mikroskysčių gardelė, kurioje yra atliekama pavienės ląstelės lizė, kDNR sintezė ir DNR padauginimas, po to sekantis mėginio išskirstymas į 20 mikroreaktorių bei skirtinga kPGR kiekviename mikroreaktoriuje (VanInsberghe ir kt., 2018). Ši sistema buvo sėkmingai išbandyta su K562 ir Ba/F3 vėžinių ląstelių linijomis.

Sklendinės mikroskysčių sistemos dažnai yra projektuojamos iš kelių skirtingų kamerų. Šis projektavimo principas leidžia vienoje mikrogardelėje atlikti kelis procesus vieną po kito, pavyzdžiui, analizuoti DNR iškart po padauginimo. Vykdamas pavienių DNR molekulių padauginimą kitose sistemose arba norint atlikti sudėtingesnę analizę tenka ieškoti būdų mažo DNR kiekio pernešimui. Vienas tokių metodų, lengvai perkelti padaugintą DNR į įvairius taikymus, yra PGR reakcijos vykdymas medžiagos paviršiuje. Vienos molekulės padauginimo produktai gali būti surenkami dalelės paviršiuje, kai vienas iš pradmenų yra įtvirtintas dalelės paviršiuje arba kai vienos molekulės padauginimas yra vykdomas atskirame mikroreaktoriuje, turinčiame tik vieną dalelę. Tokiose sistemose molekulių surinkimui yra naudojamos sefrozės (Kumaresan ir kt., 2008), polistireno (Sepp ir kt., 2002) ar magnetinės dalelės (Diehl ir kt., 2006). Po padauginimo dalelės yra surenkamos centrifuguojant arba naudojant magnetą ir gali būti panaudojamos tolesniuose analizės etapuose. Nors pirmosios sistemos galėjo padauginti tik nedidelius DNR fragmentus (<240 bp, Dressman ir kt., 2003), tačiau vėlesniuose darbuose pavyko pagerinti šį rezultatą iki 450 bp (Tiemann-Boege ir kt., 2009).

Koncentruoti vienoje erdvėje padaugintas DNR molekules galima ir gelio pagalba. Pradmuo naudotas PGR buvo įtvirtintas žemo lydymosi taško agarozėje, todėl padauginta DNR liko nanolitru tūrio gelinėje dalelėje (Leng ir Yang, 2013). Šis metodas, papildytas mikrošulinėlių matrica, buvo panaudotas absoliutaus DNR kiekio nustatymui (Li ir kt., 2018). DNR sekoskaitos ir FACS pagalba buvo patvirtinta, kad DNR esanti gelio dalelėse yra monokloninė, todėl gali būti panaudota vienos ląstelės genų ekspresijos tyrimams, aptamerų atrankai ar oligonukleotidų analizei.

Dar vienas metodas pavienių DNR molekulių padauginimui yra skaitmeninis PGR (*angl.* digital PCR). Šio metodo vystymo pradžia yra siejama su PGR, kuriame naudojami persidengiantys pradmenys, angliškai

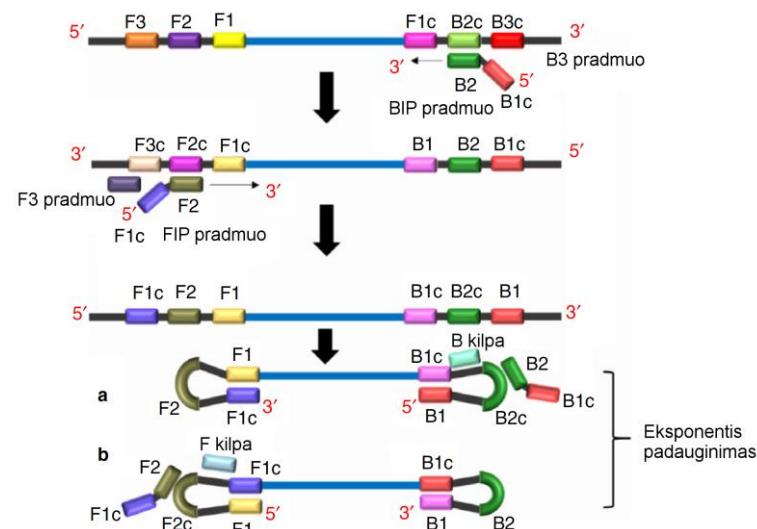
vadinamo *nested PCR* (Sykes ir kt., 1992). Vėliau PGR vykdymas buvo perkeltas į mažą tūrį kapiliaruose (Kalinina ir kt., 1997). Galiausiai metodas buvo atliekamas mikroplokšelių formate ir pavadintas skaitmeniniu PGR (Vogelstein ir Kinzler, 1999). Nors metodą ribojo mėginių skaičius, reikėjo įdėti daug rankų darbo ir sunaudoti nemažai reagentų, bet jis buvo panaudotas įvairioms problemoms spręsti: DNR molekulių kiekio nustatymas formalino biopsijos mėginiuose, vėžinių žymenų nustatymas onkologinėje terapijoje ar neinvazinis vaisiaus aneuploidijos nustatymas (McCaughan, 2009, Zimmermann ir kt., 2008). Vėliau skaitmeninis PGR buvo perkeltas į mikroskysčius. Šis sprendimas leido sumažinti reagentų sąnaudas, padidinti našumą ir automatizuoti metodą (Kelly ir Griffiths, 2007). Dabar skaitmeninis PGR dažnai yra lyginamas su kiekybiniu PGR metodu. Pirmasis yra mažiau jautrus fermentų slopikliams, nereikalauja kalibracinės kreivės, tiksliau nustato absoliutų molekulių skaičių, tačiau šio metodo atkartojamumas klinikiniuose tyrimuose dar nėra deramai patikrintas praktikoje (Quan ir kt., 2018).

#### 1.1.2. Pavienių DNR molekulių padauginimas izoterminiu metodu

Pavienių DNR molekulių padauginimo metodai naudoja ne tik PGR, bet ir DNR amplifikaciją pastovioje temperatūroje. Šiems metodams nėra būtinas temperatūros gradientas, todėl jų įgyvendinimas praktikoje yra paprastesnis. Izoterminiuose DNR padauginimo metoduose grandinių atskyrimas yra pasiekiamas naudojant polimerazę pasižyminčią grandinės nustūmimo aktyvumu.

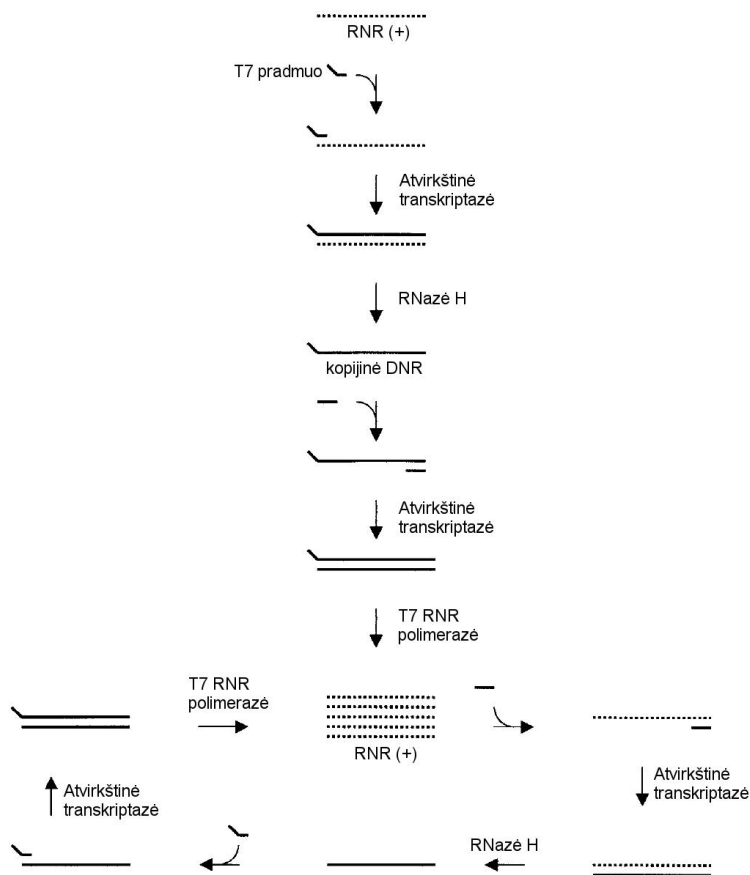
2000 m. buvo pirmą kartą aprašytas izoterminis DNR padauginimo būdas pasitelkiantis kilpas, angliškai dar vadinamas loop mediated isothermal amplification arba LAMP (Notomi ir kt., 2000). Be buferinio tirpalo ir DNR pradmens, šiam metodui reikia grandinės nustūmimo aktyvumą turinčios polimerazės (dažniausiai *Bst*), kaitinimo elemento ir specifinių pradmenų rinkinio (1.1. pav.). Pirmaisiais kartais, kai metodas buvo pritaikytas mikroskysčių gardelėse, sėkmingam padauginimui užteko 50 – 150 DNR kopijų (Lee ir kt., 2007). Metodas buvo vystomas toliau ir, gana greitai, buvo pasiekta galimybė padauginti vieną DNR molekulę (Lam ir kt., 2008). LAMP naudojančios mikroskysčių sistemos pasižymi dar ir tuo, kad DNR išgavimas, ląstelių lizė ir ląstelių detektavimas gali būti vykdomas tame pačiame mikroreaktoriuje. 66°C temperatūroje ląstelė žūsta (*E. coli*), jos DNR difunduoja iš ląstelės ir yra iškart panaudojama padauginimo žingsnyje (Safavieh ir kt., 2012). LAMP buvo pritaikytas HIV (Curtis ir kt., 2008) ir

salmonelių „prie ligoonio lovos“ (*angl.* point-of-care, Hsieh ir kt., 2012) nustatymui. Šis metodas taip pat buvo pritaikytas naudoti nešiojamame mikroskopsčių prietaise, skirtame elektrocheminiam hepatito B viruso nustatymui (Jayanath ir kt., 2018). Dėl savo paprastumo, šis metodas, vis dažniau yra panaudojamas lauko praktikoje (Lee, 2018).



**1.1. pav.** LAMP reakcijos schema. Schemoje pradmenų sekos yra pažymėtos spalvotais stačiakampiais bei šalia esančia raide su skaičiumi. Padauginamos sekos galuose yra po tris pradmenų sekas. Pirmuose DNR padauginimo etapuose naudojami FIP (*angl.* – Forward Inner Primer) ir BIP (*angl.* - Backward Inner Primer) pradmenys, kurie įveda F1c ir B1c sekas. Šios sekos yra komplementarios F1 ir B1 sekoms ir padeda sudaryti F ir B kilpas. Šioms kilpoms komplementarūs FIP ir BIP pradmenys toliau tarnauja sekančiame eksponentiniame padauginimo etape (Wong ir kt., 2017).

Dar vienas metodas skirtas DNR padauginimui yra vadinamas NASBA (*angl.* nucleic acid sequence based amplification) (1.2. pav.). Šis metodas nenaudoja matricai dvigrandės DNR, bet yra naudojama RNR seka. NASBA naudoja du RNR specifinius pradmenis ir tris fermentus: paukščių mieloblastų viruso atvirkštinę transkriptazę, T7 viruso nuo DNR priklausomą RNR polimerazę ir RNazę H. Padauginimas paprastai pradedamas nuo RNR antrinių struktūrų išlydymo 65°C. Tuomet reakcija perkeliama į 41°C ir pridedami fermentai. Naudojant vieną iš pradmenų (turintį T7 promotoriaus seką) ir atvirkštinę transkriptazę yra gaunama



**1.2. pav.** NASBA reakcijos schema. Reakcija pradeda nuo viengrandės RNR. Atvirkštinė transkriptazė susintetina pradinei RNR komplementarią kopijinę DNR, o RNazė H pašalina pradinę RNR grandinę. Viengrandė DNR kartu su kitu pradmeniu pasitarnauja matrica antrosios grandinės sintezei. Ši DNR seka yra panaudojama T7 RNR polimerazės susintetinti daug RNR molekulių kopijų, kurios yra komplementarios pradinei RNR molekulei. Procesas yra kartojamas nuo pradžių naudojant susintetintas RNR molekules (Jean ir kt., 2001).

hibridinė molekulė sudaryta iš RNR ir DNR sekų. Reakcijos mišinyje esanti RNazė H degradooja hibridinės molekulės RNR seką. Tuomet prie viengrandės DNR molekulės prisijungia antrasis pradmuo ir atvirkštinė transkriptazė susintetina antrąją DNR grandinę. Nauja, dvigrandė DNR molekulė, turinti T7 promotoriaus seką, yra panaudojama T7 RNR polimerazės linijiniam RNR molekulių padauginimui.

NASBA metodas buvo pirmą kartą pritaikytas mikroskysčiuose 2004 m., nustatant žmogaus papilomos viruso 16 bp seką (Gulliksen ir kt., 2004). Tačiau tik sujungus NASBA metodą su mikrogardelių technologija buvo sukurtas NAIMA metodas, galintis padauginti dvi DNR molekulių kopijas (Morisset ir kt., 2008). Šis metodas buvo pritaikytas nustatyti GMO maiste, sėklose ar pašaruose.

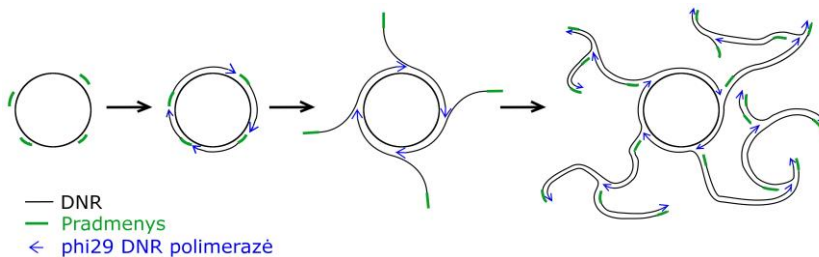
MDA (*angl.* multiple displacement amplification) – DNR padauginimas daugybiniu nustūmimu. Paprastai šioje reakcijoje matrica yra naudojama linijinė DNR molekulė ir nespecifiniai, 3'-5' egz nukleaziniams aktyvumui atsparūs 6 nt pradmenys. Pradmenys prisijungia skirtingose DNR grandinės vietose, nuo kurių inicijuojama DNR grandinės sintezė. Phi29 DNR polimerazei priartėjus prie vietos, kurioje matrica yra dvigrandė, antra grandinė yra nustumiama naudojant grandinės nustūmimo aktyvumą (Dean ir kt., 2002), ko pasekoje MDA reakcija yra vykdoma pastovioje temperatūroje.

MDA reakcijos metu yra labai paprasta padauginti net labai mažus DNR kiekius. Dėl to, vykdam šią reakciją mėgintuvėlyje, reakcijos produktai gali labai lengvai užsiteršti svetima DNR ir kaip parodyta kai kuriuose darbuose tik ~30 % gauto produkto turi tikslią seką (Marcy ir kt., 2007). Mažinant MDA reakcijos tūrį galima padidinti reakcijos specifiškumą (Hutchison ir kt., 2005). MDA gali būti naudojama vienos ląstelės sekvenavimui (Hosokawa ir kt., 2017), DNR molekulių kiekio nustatymui pavienėse vėžio ląstelėse (Kim ir kt., 2017), viso genomo padauginimui metagenominiuose tyrimuose (Hammond ir kt., 2016) ar žmogaus žiedinių RNR molekulių nustatymui (Wang ir kt., 2017).

RCA (*angl.* rolling circle amplification) – riedančio rato padauginimo reakcija irgi yra izoterminė DNR padauginimo reakcija, tik joje kaip matrica yra naudojama žiedinė DNR molekulė (Demidov, 2002). Žiedinė molekulė gali būti sudaryta sujungiant linijinės DNR molekulės galus į vientisą žiedą, naudojant pradmenį, komplementarų abiems galams. Toks konstruktas yra paveikiamas ligaze ir naudojamas RCA reakcijai. Po RCA reakcijos padauginta DNR yra viengrandė, linijinė molekulė, kurioje kartojasi matricos seka.

mpRCA – (*angl.* multiply-primed rolling circle amplification) riedančio rato padauginimo reakcija, naudojant nespecifinius, 3'-5' egz nukleaziniams aktyvumui atsparius, 6 nt ilgio pradmenis. Ši reakcija tarsi sujungia du DNR padauginimo mechanizmus: RCA ir MDA (Dean ir kt., 2001). DNR padauginimas yra vykdomas nuo žiedinės molekulės, naudojant atsitiktinės

sekos 6 nt pradmenis (1.3. pav.). Šios reakcijos metu DNR gali būti padauginata daugiau nei  $10^9$  kartų (Lizardi ir kt., 1998). Ši reakcija mokslinėje literatūroje vadinama ir kitais pavadinimais: hyperbranched RCA, exponential RCA (Dean ir kt., 2001).



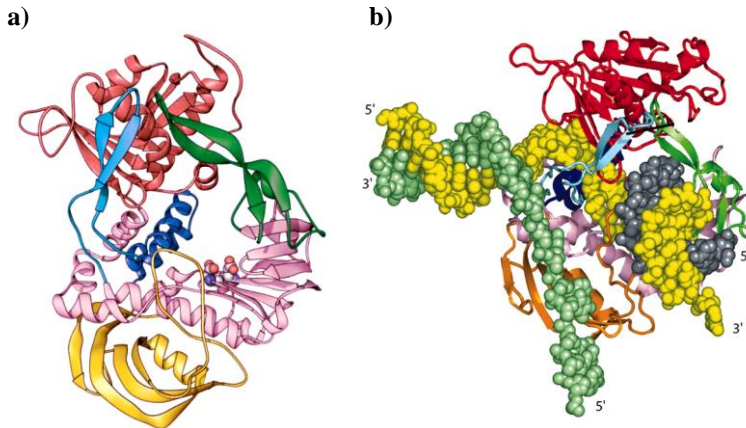
**1.3. pav.** mpRCA reakcijos schema. Žiūrint iš kairės į dešinę, pirmiausia prie DNR grandinės (juoda) prisitvirtina pradmenys (žali). Phi29 DNR polimerazė (mėlyna rodyklė) vykdo naujos DNR grandinės sintezę iki pasiekia dvigrandę vietą. Grandinės sintezė yra tęsiama, o komplementari grandinė yra nustumtama. Nustumtoje viengrandėje DNR yra naujų vietų pradmenims prisijungti. Prisijungus pradmenims, priartėja kitos phi29 DNR polimerazės molekulės ir toliau vyksta DNR sintezė.

Aukščiau minėtos DNR padauginimo reakcijos yra pritaikomos įvairiems molekuliniais metodams: mutacijų indentifikavimui ir pavienių molekulių skaičiavimui (Lizardi ir kt., 1998), nekultivuojamų virusų genomų tyrinėjimui (Johnė ir kt., 2009). RCA reakcija turi ne vieną įdomų pritaikymą. RCA reakciją sujungus su ligavimo reakcija buvo nustatytas vieno nukleotido polimorfizmas (Qi ir kt., 2001). Šiame metode yra padauginama tik tokia seka, kuri pilnai atitinka ligavimo pradmens seką. Panašus metodas, paremtas vienos bazės mutacijos nustatymu, gali detektuoti antibiotikams atsparią tuberkuliozės formą (Minero ir kt., 2020). Kitame metode RCA reakcijai panaudotas pradmuo, kovalentiniu ryšiu prijungtas prie antikūnio. Sukurtas molekulinis konstruktas buvo panaudotas ultrajautriam antigenų nustatymui (Schweitzer ir kt., 2000). RCA reakcija taip pat buvo panaudota ATP aptikimui (Cho ir kt., 2005). Pastarajame metode ligavimą atliko aptazimo molekulė, aktyvuojama ATP. Sujungus DNR molekulę į žiedą, galėjo vykti šios molekulės padauginimas ir detektavimas. Verta paminėti ir tai, jog sumažinus dNTP ir tRNR kieki, ši reakcija taip pat gali būti vykdoma kartu su *in vitro* transkripcija ir translacija (Sakatani ir kt., 2015).

### 1.1.2.1. *phi 29 DNR polimerazė DNR padauginimui izoterminiu metodu*

MDA, RCA ir mpRCA metoduose yra naudojama phi 29 DNR polimerazė. Phi29 yra *Bacillus subtilis* bakteriofagas, kurio tyrimai buvo pradėti daugiau nei prieš 50 metų. 1966 metais buvo paskelbta bakteriofago morfologija ir jo DNR dydis, nustatytas elektroniniu mikroskopu (Anderson ir kt., 1966). Kiek vėliau buvo nustatyta, kad bakteriofago replikacijai yra reikalingi du baltymai: p3 ir p2 (Blanco ir Salas, 1985). P3 yra 266 amino rūgščių baltymas, kuris jungiasi prie DNR terminalinio adenino per diesterinę jungtį su 232 serinu ir atlieka pradmens funkciją. Todėl šis baltymas yra vadinamas terminaliu baltymu. Tuo metu buvo sužinota, kad p2, 66 kDa baltymas, pasižymi polimeraziniu ir 3'–5' egz nukleaziniu aktyvumais. Dabar šis baltymas yra geriau žinomas kaip phi29 DNR polimerazė. 1985 m. taip pat buvo parodyta, kad šių dviejų baltymų užtenka, kad būtų galima gauti pilno ilgio phi29 fago DNR sintezę (Blanco ir Salas, 1985). Praėjus keleriems metams buvo sužinota, kad phi29 DNR polimerazė pasižymi dideliu procesyvumu ir gali susintetinti DNR grandines, kurių ilgis yra didesnis nei 70 kbp (Blanco ir kt., 1989). Šiuo darbu taip pat buvo sužinota, kad ši polimerazė pasižymi grandinės nustūmimo aktyvumu. Vykstant fago DNR replikacijai p3 baltymas prisijunia prie phi29 DNR polimerazės. Susidaręs kompleksas yra svarbus proceso iniciacijai. DNR grandinės sintezės metu, prijungus 6-9 nukleotidus, polimerazėje vyksta struktūriniai pokyčiai ir, įjungus 10-ą nukleotidą, fermentas pilnai disocijuoja nuo p3 baltymo (Mendez ir kt., 1997). Šiek tiek vėliau buvo pirmą kartą nustatyta phi29 DNR polimerazės kristalinė struktūra (1.4. pav.) (Kamtekar ir kt., 2004).

Lyginant su kitomis B šeimos polimerazėmis, phi29 – turi du papildomus subdomenus: TPR1 ir TPR2. Šie subdomenai yra konservatyvūs polimerazėse, kurios prisijungimui prie DNR naudoja papildomą baltymą. TPR2 subdomeno pašalinimas susilpnina DNR surišimą, sumažina procesyvumą ir visiškai panaikina grandinės nustūmimo aktyvumą (Rodríguez ir kt., 2005). Kiti subdomenai yra įprasti B šeimos polimerazėms. Delno subdomene yra katalizinę funkciją atliekančios ir su DNR sąveikaujančios aminorūgščių liekanos. Pirštų subdomenas sąveikauja su įeinančiais dNTP, o nykščio – su DNR, stabilizuodamas dalį prisijungusią pradmenį.



**1.4. pav.** Phi29 DNR polimerazės baltymo struktūra. a) paveikslėlyje pavaizduota polimerazė be DNR, o b) – su DNR.

Baltymo struktūra abiejuose paveikslėliuose pavaizduota juostomis (*angl.* ribbons). Raudona spalva pažymėtas **egzonukleazinis** domenas, **delno** subdomenas – rožine, **TPR1** – geltona, **TPR2** – žydra, **pirštų** – mėlyna ir **nykščio** – žalia.

DNR molekulė, b) paveikslėlyje, pavaizduota erdvę užpildančiu modeliu (*angl.* space-filling). Geltona spalva žymi **koduojančią** grandinę, pilka – **sintetinamą**, o žalia – **nekoduojančią** grandinę (Kamtekar ir kt., 2004).

Delno, nykščio, TRP2 ir TRP1 subdomenai formuoja į žiedą panašią struktūrą, apgaubiančią sintetinamą DNR grandinę (Berman ir kt., 2007). Ši struktūra yra svarbi fermento procesyvimui (Rodríguez ir kt., 2005).

DNR sintezės metu yra naudojami deoksinukleotidai. Jų skilimo metu yra gaunama daug energijos, kurios dalis yra panaudojama įjungti naują nukleotidą į sintetinamą grandinę. Yra manoma, kad kita dalis gautos energijos yra panaudojama DNR išvyniojimui (Alberts ir Sternglanz, 1997). Sintezės metu polimerazė yra stumiamą į priekį ir grandinės nustumimo aktyvumas yra sukuriamas TRP2, delno ir nykščio subdomenų kartu su egzonukleaziniu domenu. Jie apgaubia koduojančią grandinę ir sudaro siaurą, ~10 Å, tunelį, talpinantį tik vieną grandinę (Berman ir kt., 2007). Šis tunelis, būdamas per siauras dvigrandei DNR, tarsi pleištas atskiria nekoduojančią grandinę.

Egzonukleazinis domenas yra sudarytas iš EgzoI, EgzoII ir Egzo III subdomenų. Šis domenas veikia polimerazei įterpus nukleotidą, kuris nėra komplementarus koduojančiai grandinei (Garmendia ir kt., 1992). Domene esantys du divalencio metalo jonai gali pašalinti 3' gale esančius



nukleotidus 500 nt/s greičiu (Esteban ir kt., 1994). Inaktyvavus šį domeną, polimerazė pasiekia tokius pačius sintezės greičius esant 350 kartų mažesnei dNTP koncentracijai (Garmendia ir kt., 1992). Phi29 DNR polimerazės klaidų dažnis yra  $1 \times 10^{-6}$ – $10^{-7}$  klaidų/bp (Esteban ir kt., 1993). Šios polimerazės klaidų dažnis yra palyginamas su kitų didelio tikslumo polimerazių klaidų dažniu, pavyzdžiui, PfuI polimerazės jis yra lygus  $7 \times 10^{-7}$  klaidų/bp (Reagin ir kt., 2003).

Literatūroje yra dažnai minima, kad phi29 DNR polimerazė pasižymi dideliu procesyvumu. Ji gali įjungti 70000 nukleotidų vieno prisijungimo metu, 50 nukleotidų per sekundę greičiu (Blanco ir kt., 1989).

Dėl aukščiau aptartų savybių ir dėl to, kad ši polimerazė gali naudoti atsitiktinius pradmenis, ji yra dažnai naudojama viso genomo padauginimo reakcijose (*angl.* whole genome amplification), riedančio rato amplifikacijoje (*angl.* rolling circle amplification).

### 1.2. *In vitro* baltymų sintezė

Baltymai yra viena svarbesnių funkcinių ir struktūrinių biomolekulių. Paprastai jie yra sintetinami ląstelių, tačiau apie 50-us metus pasirodė pirmieji darbai parodantys, kad baltymus galima sintetinti ir mėgintuvėlyje (Hoagland ir kt., 1958, Nirenberg ir Matthaei, 1961). Ankstyvą logaritminę augimo fazę pasiekusios W3100 *E. coli* ląstelės buvo malamos ir centrifuguojamos skirtingomis sąlygomis. Surinktos frakcijos: S-30, S-100 ir W-Rib, buvo papildomos druskomis, aminorūgštimis ir RNR. Nuo to laiko, *in vitro* baltymų sintezės sistemos tapo daug geriau išstobulintos ir šiuo metu yra naudojamos kuriant naujas genetines sistemas (Shin ir Noireaux, 2012), naujus transkripcijos faktorius (de los Santos ir kt., 2016), įterpti į baltymus nestandartines aminorūgštis (Hong ir kt. 2014), sintetinti žmonių baltymus (Oza ir kt., 2015), kurti biosensorius ar *in vitro* evoliucijos metodus (Dodevski ir kt., 2015) bei nustatyti antiCRISP baltymus (Wandera ir kt., 2020). Visos šios sistemos remiasi galimybe sintetinti baltymus *in vitro*.

#### 1.2.1. Šiuolaikinės *in vitro* baltymų sintezės sistemos komponentai

Pirmosios stabilios *in vitro* baltymų sintezės sistemos buvo sudarytos iš *E. coli* ekstrakto, ATP ir ATP regeneruojančios sistemos, pridėtinių aminorūgščių ir RNR (Nirenberg ir Matthaei, 1961). Metų bėgyje ne vienas sistemos komponentas buvo tobulinamas.

*In vitro* baltymų sintezės sistema dar gali būti vadinama beląsteline baltymų sintezės sistema (CFPS, *angl.* cell-free protein synthesis system)

(Hillebrecht ir Chong, 2008) arba *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistema (IVTT, *angl. in vitro* transcription-translation system) (Kumar ir Chernaya, 2009). Abu šie pavadinimai reiškia tą patį ir gali būti vartojami kaip sinonimai.

Paprastai IVTT sistema susideda iš trijų sisteminių komponentų: 1) DNR, koduojančios dominantį baltymą, 2) energijos perdirbimo sistemos, reikalingos regeneruoti ATP ir mažas biomolekules ir 3) *in vitro* transkripcijai, translacijai ir metabolizmui reikalingų ląstelės komponentų.

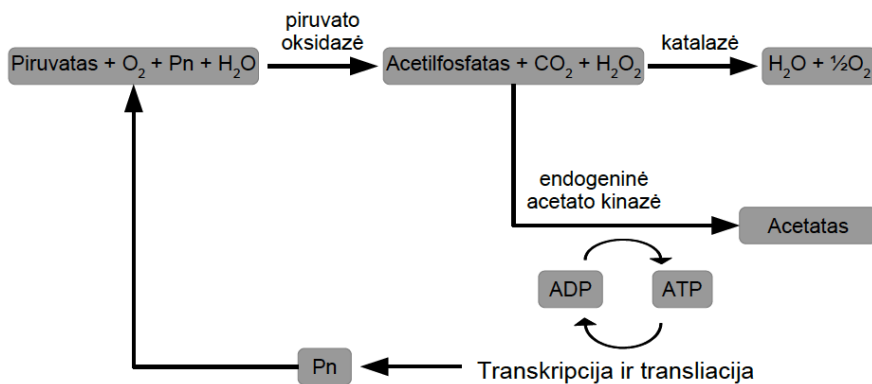
IVTT reakcijai galima naudoti linijinę DNR arba superspiralizuotą plazmidinę DNR. Didžiausios baltymo išėigos yra pasiekiamos naudojant superspiralizuotą plazmidę (Invitrogen, 2011). Manoma, kad linijiniai DNR substratai yra mažiau stabilūs dėl reakcijos mišinyje likusių citoplazminių egz nukleazų (Sun ir kt., 2014). Tačiau tokius substratus galima lengvai ir greitai pasiruošti PGR reakcijos pagalba, taip išvengiant klonavimo procedūros. Todėl renkantis linijinį DNR substratą dažnai yra imamas papildomų priemonių: naudojami nukleazų inhibitoriai, DNR seka yra dirbtinai ilginama, DNR padauginama su pradmenimis, turinčiais fosfotionato grupes, ar naudojami stabilizuojantys baltymai, surišantys DNR ir ją apsaugantys nuo nukleazų poveikio.

Energijos perdirbimo sistema yra svarbi *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistemos dalis (Calhoun ir Swartz, 2007). Baltymo sintezė IVTT sistemose baigiasi dėl to, kad yra išnaudojamas visas turimas ATP rezervas (Kim ir Swartz, 2000). Sėkmingam energijos perdirbimo sistemos darbui gali tekti apsvarstyti daugybės įvairių komponentų regeneravimą: kalio ir magnio jonų, glutamato, fermentų kofaktorių, didžiaenergių fosforo donorų, tRNR, nukleotidų trifosfatų ar kitų molekulių. 3-fosfogliceratas, fosfoenolpiruvatas ir kreatino fosfatas buvo naudojami kaip didžiaenergiai fosforo donorai. Taip pat buvo išbandyti ir ekonomiškai patrauklesni metodai, naudojantys gliukozę, piruvatą ar fruktozės 1,6-difosfatą.

Vienas pirmųjų ir paprasčiausių metodų padidinti IVTT reakcijos energijos atsargas ir taip prailginti pačią reakciją buvo atliktas Kim ir Swartz 2000 m. (Kim ir Swartz, 2000). Baltymų sintezės reakcija periodiškai buvo papildoma fosfoenolpiruvatu, kuris piruvato kinazės yra verčiamas į piruvatą, kad būtų susintetinta viena ATP molekulė. Šis metodas leido baltymų sintezės laiką pailginti nuo 20 iki 80 minučių. Tačiau tokia sistema turėjo keletą trūkumų. Fosfoenolpiruvatas buvo sunaudojamas ne tik ATP sintezei, bet ir kitų fermentų likusių ląstelių ekstrakto. Kitas sistemos trūkumas buvo reakcijos mišinyje besikaupiantis neorganinis fosforas, kuris

chelatavo magnį ir taip mažino jo aktyvią koncentraciją. Todėl fosfoenolpiruvatas buvo pakeistas kreatino fosfatu ir į reakcijos mišinį buvo periodiškai įdedama magnio. Baltymo sintezės reakcija galėjo vykti ilgiau nei 2 h ir buvo pasiekta 1,3 mg/ml baltymo išeiga (Kim ir Kim, 2009).

Tačiau kreatino fosfato ir magnio papildymo metodas turėjo savo trūkumų. Papildomas reagentų pridėjimas ne visuomet yra galimas, o susidaręs magnio pirofosfatas gali turėti inhibicinį poveikį baltymų sintezei. Todėl buvo ieškoma alternatyvių metodų ATP regeneravimui. Buvo pasiūlyta energijos perdavimo sistemos alternatyva panaudojanti piruvato oksidazę. Papildomai pridėjus šio fermento, jis sunaudoja neorganinį fosfatą acetilfosfato sintezei (1.5. pav.). Gauti reakcijos produktai yra sunaudojami fermentų, jau esančių ekstrakto: vandenilio peroksidas suskaldomas katalazės, o acetilfosfatas yra acetato kinazės panaudojamas ATP sintezei. Be fosfato sunaudojimo, ši sistema turėjo dar vieną pranašumą prieš fosfoenolpiruvatą ar kreatino fosfatą: piruvatas yra pigesnis substratas. Tačiau papildomos išlaidos pridėtinei piruvato oksidazei mažino šį pranašumą. Be jau išvardintų pranašumų, naujoji energijos perdavimo sistema turėjo ir naują trūkumą. Piruvato oksidacijai reikėjo deguonies. Reakciją vykdant mažame tūryje, tai nebuvo problema, tačiau bandant didinti reakcijos tūrį, gali reikėti papildomos deguonies tiekimo ir paskirstymo sistemos.



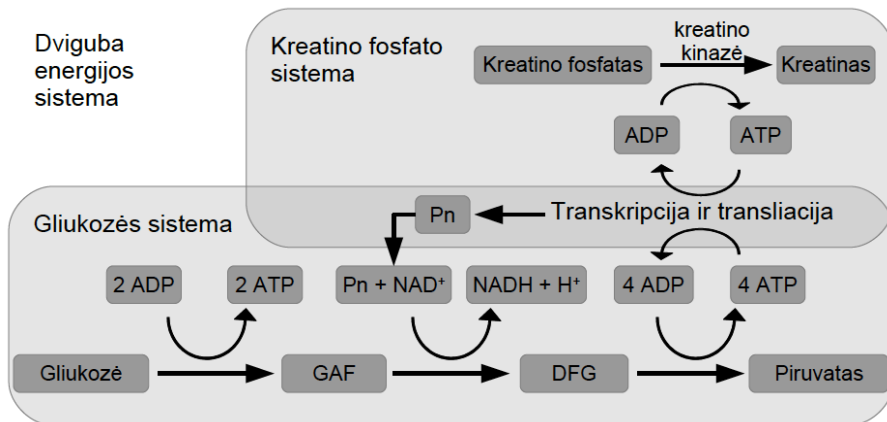
**1.5. pav.** Piruvato oksidazės sistemos principinė schema. Energija IVTT reakcijai yra suteikiama panaudojant piruvatą ir piruvato oksidazę. ATP - adenzintrifosfatas; ADP – adenzindifosfatas; Pn - neorganinis fosfatas.

Energijos perdirbimo sistemos tobulinimas buvo tęsiamas. Papildomo fermento pridėjimo problema buvo sprendžiama efektyvesniu esamų fermentų panaudojimu. IVTT reakcijos mišinys buvo papildytas NAD ir CoA kofaktoriais, ko pasekoje ekstrakte esanti piruvato dehidrogenazė vertė piruvatą acetil-CoA. Pastarasis junginys buvo verčiamas acetilfosfatu endogeninės fosfotransacetilazės. Šią sistemą galima buvo sujungti su fosfoenolpiruvato sistema, kurioje piruvatas buvo galutinis ir nepanaudotas produktas (Kim ir Swartz, 2001).

Energijos perdirbimo sistema, galinti panaudoti ekstrakte jau esančius fermentus, atrodė, kaip patraukli alternatyva. Todėl buvo stengiamasi rasti naujų būdų, kaip panaudoti endogeninius glikolizės fermentus ir pigius substratus ATP regeneravimui. Pirmieji bandymai panaudoti gliukozę, kaip energijos šaltinį buvo nesėkmingi, nes reakcijos mišinio pH greitai mažėdavo ir baltymų sintezės reakcija sustodavo. Problema buvo išspręsta pakeitus buferinę sistemą (Calhoun ir Swartz, 2005). Pagrindinis privalumas naudoti gliukozę yra mažesnė IVTT reakcijos kaina. Tačiau glikolizės proceso inicijavimui reikėjo papildomo ATP. Todėl norint gauti efektyvią energijos perdirbimo sistemą, naudojančią gliukozę, reikėjo papildomai naudoti jau gerai žinomą kreatino fosfato energijos perdirbimo sistemą (1.6. pav., Kim ir kt., 2007). Taip buvo sukurta dviguba energijos perdirbimo sistema, kurioje pavyko ne tik sumažinti neorganinio fosfato kaupimąsi, bet ir prailginti baltymų sintezės trukmę iki 3 h.

Bandant prailginti baltymų sintezės laiką, buvo sukurta kita dviguba energijos perdirbimo sistema. Gliukozė buvo pakeista maltoze ir maltodekstriniais, o glikolizės proceso inicijavimui reikalinga energija buvo gauta iš 3-fosfoglicerato. Naudojant šią energijos perdirbimo sistemą buvo pasiekta didelė baltymų išeiga nedializuojamoje reakcijoje – 2,3 mg/ml, o IVTT reakcijos laikas prasitęsė iki 10 h (Caschera ir Noireaux, 2014).

Energijos perdirbimui yra svarbu regeneruoti mažas biomolekules. Be aukščiau aptartų būdų, šios problemos sprendimui taip pat buvo pasitelkta dializė (Kim ir Choi, 1996). Paruošta baltymo sintezės reakcija yra patalpinama į didesnę tūrį „maitinimo“ tirpalo. „Maitinimo“ tirpalas savo sudėtimi yra panašus į baltymo sintezės reakciją, t.y. jame yra nukleotidų, druskų, energijos perdirbimo sistemos komponentų. Tačiau į „maitinimo“ tirpalą nėra dedami ląstelių ekstraktas, T7 RNR polimerazė, DNR ir tRNR mišinys. Baltymo sintezės reakcija ir „maitinimo“ tirpalas yra atskirti dializės membrana, per kurią vyksta pasyvi mažų molekulių difuzija. Būtent dėl šios molekulių difuzijos, baltymo sintezės reakcija yra papildoma



**1.6. pav.** Dvigubos energijos sistemos principinė schema. IVTT reakcijos metu susidaręs neorganinis fosfatas yra panaudojamas glikolizės procese. GAF - gliceraldehido-3-fosfatas; DFG - 1,3-difosfogliceratas; NAD - nikotinamido adenindinukleotidas; NADH - redukuotas nikotinamido adenindinukleotidas; ATP - adenozintrifosfatas; ADP – adenozindifosfatas; Pn - neorganinis fosfatas.

trūkstamais substratais, kartu pašalinant susidariusius medžiagų apykaitos produktus. Dializuojant IVTT reakciją galima prailginti jos trukmę ir susintetinti 19 kartų daugiau norimo baltymo (Peñalber-Johnstone ir kt., 2017). Dabartinės dializuojamos sistemos gali sintetinti net membraninius baltymus (Zhou ir Takeda, 2020).

Trečiasis *in vitro* transkripcijai ir transliacijai svarbus komponentas yra gaunamas iš ląstelių. Tai fermentai, kofaktoriai, ribosomos ir kitos biomolekulės, vykdančios reakciją. Šie komponentai išgaunami arba lizuojant ląsteles ir naudojant ekstraktą, arba kiekvienas komponentas yra išgryninamas atskirai. Paprastai ekstrakto ruošimas pradamas nuo ląstelių auginimo, kol jos pasiekia eksponentinę augimo stadiją (Failmezger ir kt., 2017). Tuomet ląstelės yra ardamos naudojant didelio slėgio homogenizatorius, ultragarsą ar kitus mechaninius ar cheminius ląstelių lizavimo metodus. Ląstelių nuolaužos yra pašalinamos centrifuguojant, o gautas ekstraktas naudojamas *in vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijai. Sistemos, kuriose kiekvienas komponentas yra išgryninamas atskirai, angliškai yra vadinamos PURE (*angl.* protein synthesis using recombinant elements) (Shimizu ir kt., 2001).

*In vitro* baltymų sintezė yra svarbi technologija, turinti savų privalumų lyginant su baltymų sinteze pasitelkiant ląsteles. Du svarbiausi privalumai

yra: 1) galimybė sintetinti baltymus, kurie yra toksiški gyvoms ląstelėms, 2) galimybė keisti sintezės sąlygas, keičiant atskirus IVTT sistemos komponentus (pridedant šaperonus, radioaktyvias žymes (Cancedda ir Schlesinger, 1974), nanodiskus (Ritchie ir kt., 2009) ar mikrosomas (Sachse ir kt., 2013)).

### 1.2.2. *In vitro* transkripcijos ir translacijos sistemų apžvalga

Vienos pirmųjų IVTT sistemų buvo sukurtos naudojant *E. coli* transkripcijos ir translacijos ekstraktą. Dažnai šių sistemų tobulinimas buvo nukreiptas į sintetinamo baltymo išėigos didinimą, tačiau mažai dėmesio buvo skiriama sudėtingų baltymų sintezei, pavyzdžiui, turinčių potransliacines modifikacijas. Bandant spręsti šias problemas, atsirado poreikis turėti IVTT sistemas, kurios naudotų ne tik *E. coli* baltymų sintezės aparatą. Dabar yra žinomos įvairios *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistemos, paruoštos iš archėjų, pirmuonių, kviečių gemalo, tabako, mielių, vabzdžių, triušio retikulocitų, kinų žiurkėno kiaušidžių ir žmogaus ląstelių ekstraktų (Zemella ir kt., 2015).

#### 1.2.2.1. Prokariotinės IVTT sistemos

##### **Ekstraktinės sistemos**

Pirmosios beląstelinės baltymų sintezės sistemos buvo naudojamos suprasti, kaip aminorūgštys yra įterpiamos į baltymą. 1961 m. buvo atliktas pirmasis darbas, kuris susiejo nukleorūgščių tripletus su jų koduojamomis aminorūgštimis (Nirenberg ir Matthaei, 1961). Pirmosios IVTT sistemos naudojo ekstrakte esančią iRNR baltymų sintezei, todėl didžioji dalis susintetintų baltymų buvo endogeniniai. Tik po to, kai Nirenberg ir Matthaei papildė *in vitro* transkripcijos ir translacijos reakciją 20 aminorūgščių ir ATP regeneravimo komponentais, baltymų sintezė pradėjo efektyviai vykti nuo įdėtos iRNR. Taip gimė pirmoji *E. coli* ekstraktu paremta IVTT sistema.

Svarbus žingsnis šių sistemų tobulinime įvyko 1973 m., kai ekstraktas buvo papildytas *E. coli* RNR polimeraze (Zubay, 1973). Tokioje sistemoje galima buvo naudoti DNR ir tokią sistemą jau buvo galima vadinti *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistema. Žinoma, vėliau *E. coli* RNR polimerazė buvo pakeista efektyvesnėmis polimerazėmis iš fagų (SP6 ar T7) (Krieg ir Melton, 1987 ir Craig ir kt., 1992).

Padidėjus reakcijos efektyvumui, buvo atkreiptas dėmesys į šalutinius reakcijos produktus. Vykdamas reakciją mėgintuvėlyje buvo neįmanoma

išvengti jų kaupimosi ir inhibicinio poveikio. Todėl Spirin pasiūlė vykdyti baltymų sintezę nepertraukiamai (*angl.* continuous cell-free translation system) (Spirin ir kt., 1988). Tokiomis sąlygomis buvo atstatomos sunaudotos mažos biomolekulės (aminorūgštys, ATP, GTP) ir pašalinami šalutiniai reakcijos produktai (fosfatai). Molekulių mainai buvo vykdomi pasitelkiant dializės principą, ko pasekoje baltymų išeigos padidėjo nuo  $\mu\text{g/ml}$  iki  $\text{mg/ml}$  (Chong, 2014).

Kitas *E. coli* IVTT sistemos patobulinimas buvo pasiektas dirbant su ląstelių linijomis, iš kurių ruošiamas ekstraktas. Buvo žinoma, kad ekstraktai turi RNazių ir DNazių, kurios degraduoja nukleorūgštis ir taip mažina baltymų išeigą. Todėl buvo sukurtos *E. coli* ląstelių linijos, kurios neturi RNazės I (*rna*) (MRE600) ir egzonukleazės V (A19) (Gesteland, 1966 ir Yang ir kt., 1980). Taip pat 2004 m. *E. coli* genomą buvo modifikuotas stabilizuojant arginino, triptofano bei serino aminorūgštis ir tai prisidėjo prie baltymo išeigos didinimo (Michel-Reydellet ir kt., 2004). Siekiant dar labiau padidinti reakcijos išeigas dar daugiau, buvo nuspręsta pasitelkti natūralią ląstelės metabolizmo ir oksidacinio fosforilinimo sistemą, kurios dalis lieka ekstraktoje. Ląstelės buvo auginamos ir ekstraktas ruošiamas taip, kad IVTT reakcijos mišinio sudėtis būtų kuo panašesnė į citoplazmos sudėtį (Jewett ir Swartz, 2004 ir Jewett ir kt., 2008). Šis tikslas buvo pasiektas sėkmingai ir vienoje reakcijoje buvo vykdoma baltymų sintezė, centrinis ląstelės metabolizmas ir oksidacinis fosforilinimas.

2014 m. buvo aprašytas metodas, leidžiantis supaprastinti IVTT sistemų saugojimą ir transportavimą. Anksčiau ląstelių ekstraktą buvo rekomenduojama laikyti užšaldytą gilaus šaldymo šaldikliuose. Autoriai pasiūlė būdą, kaip paprastai liofilizuoti ląstelių ekstraktą ir paruošti kitus reakcijos komponentus sausoje formoje (Smith ir kt., 2014). Taip paruoštas ekstraktas lieka aktyvus metus laiko ir baltymo išeigos nesiskiria nuo gaunamų naudojant užšaldytą ekstraktą (Salehi ir kt., 2016 ir Hunt ir kt., 2017).

Šiuo metu viena didžiausių pasiektų baltymų sintezės išeigų, naudojant *E. coli* IVTT sistemą, yra  $2,3 \text{ mg/ml}$  (Caschera ir Noireaux, 2014). Šis rezultatas gautas naudojant nedializuojamą reakciją.

Ruošiant bakterinį ekstraktą dažniausiai yra naudojamos *E. coli* ląstelių linijos, tačiau yra žinomos sintezės sistemos, kurios naudoja *B. subtilis* (Kelwick ir kt., 2016) ar *Streptomyces* (Li ir kt., 2017) ląsteles.

Pirmosios archėjų ekstraktinės IVTT sistemos buvo kuriamos tam, kad tyrinėti antibiotikų poveikį jų transliacijos sistemai (Elhardt ir Bock, 1982). Dažnai kuriamoms *in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistemoms yra pasirenkamos termofilinės ląstelės: *Sulfolobus solfataricus* (Ruggero ir kt., 1993), *Thermococcus kodakaraensis* (Endoh ir kt., 2006) ar *Thermus thermophilus* (Uzawa ir kt., 1993). Tokia IVTT sistema gali būti panaudota termostabilių baltymų atrankai *in vitro* evoliucijos darbuose ar antrines struktūras turinčios RNR sintezei. Taip pat yra sukurta *T. thermophilus in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistema, kurios kiekvienas komponentas yra išgrynintas atskirai (Zhou ir kt., 2012). Tokia sistema turi mažiau proteazių ir endonukleazių priemaišų, taip pat leidžia tyrinėti, koks yra minimalus komponentų kiekis, reikalingas baltymų sintezei aukštose temperatūrose. Archėjinių IVTT sistemų išeigos nėra labai didelės: 100 µg/ml (Endoh ir kt., 2007).

Anksčiau prokariotinės IVTT sistemos nusileisdavo eukariotinėms, nes tik pastarosios galėdavo sintetinti “sudėtingus” baltymus. Baltymai, kurių pilnam aktyvumui reikia disulfitinių jungčių, prijungtų oligosacharidų ar įterpimo į membraną, buvo neįveikiama užduotis prokariotinėms IVTT sistemoms. Tačiau dabartiniai bakteriniai ekstraktai gali daug daugiau. Baltymų, turinčių disulfitinių jungčių, sintezė buvo atlikta IVTT sistemoje susintetinant granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių (*angl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), kuris turi net kelias tokias jungtis (Zawada ir kt., 2011). Baltymų posttransliacinė modifikacija oligosacharidais buvo pasiekta susintetinus oligosachariltransferazes bakterinėje *in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistemoje (Schoborg ir kt., 2017). Norint atlikti membraninių baltymų sintezę, prokariotinę IVTT sistema reikia papildyti nanodiskais (Dondapati ir kt., 2018).

Dabartiniai bakteriniai IVTT rinkiniai yra naudojami izotopais žymėtų baltymų sintezėje didelio našumo automatizuotose sistemose (Aoki ir kt., 2009), baltymų mikrogardelių gamyboje (Miersch ir LaBaer, 2011), nestandartinių aminorūgščių įterpimui į peptido grandinę (Hipolito ir Suga, 2012), kryptingai baltymų evoliucijai (Holstein ir kt., 2021) ar dirbtinės ląstelės kūrimui sintetinės biologijos tikslams (Noireaux ir kt., 2011).



## Išgrynintos sistemos

*In vitro* transkripcijos ir translacijos sistemoje katalizinę funkciją atlieka ląstelių ekstrakte esančios nukleorūgštys ir baltymai. Ruošiant ekstraktą yra atliekamas dalinis grynimasis po ląstelių lizės, kurio metu yra pašalinama dalis ląstelės nuolaužų. Likusi dalis yra vadinama ekstraktu ir naudojama IVTT reakcijai. Šiame tirpale lieka ne tik tie ląstelės komponentai, kurie yra reikalingi vykdyti transkripciją ir translaciją, tačiau ir kitos molekulės, kurios trukdo reakcijai: nukleazės ir proteazės (Li ir kt., 2017). Todėl mokslininkų grupė iš Japonijos išgrynino kiekvieną komponentą, reikalingą *in vitro* transkripcijai ir translacijai ir paruošė vieną reakcijos mišinį, paremtą prokariotine baltymų sintezės sistema. Šį mišinį sudaro 32 rūšių biomolekulės: trys translacijos iniciacijos veiksniai (IF1, IF2 ir IF3), trys translacijos elongacijos veiksniai (EF-G, EF-Tu ir EF-Ts), du translacijos baigties veiksniai (RF1 ir RF3), ribosomas perdirbantis veiksnys (RRF), dvidešimt aminoacil-tRNR sintetazių, metionil-tRNR transformilazė, T7 RNR polimerazė ir ribosomos. Be šių komponentų, IVTT sistema dar buvo papildyta tRNR, NTP, kreatinino fosfatu, 10-formil-5,6,7,8-tetrahidrofolio rūgštimi, dvidešimčia aminorūgščių, kreatino kinaze, miokinaze, nukleozid-difosfato kinaze ir pirofosfataze. Šios sistemos sukūrimo metu jos išeiga siekė 160 µg/ml/h (Shimizu ir kt., 2001). *E. coli* ekstraktinės sistemos išeiga tuo metu buvo ~ 400 µg/ml/h (Kim ir kt., 1996).

Išgrynintos IVTT sistemos buvo tobulinamos ir toliau. Nustatyta, kad molekuliniai šaperonai pagerina baltymų susiklostymą tokiose sistemose (Shimizu ir kt., 2005). Pridėtos liposomos leidžia sintetinti membraninius baltymus (Kuruma ir Ueda, 2015). Galima vykdyti disulfidines jungtis turinčių baltymų sintezę (Nagumo ir kt., 2016). Yra sukurta sistema, kurios komponentai yra išgryninti ne iš *E. coli*, bet iš *Thermus thermophilus* (Zhou ir kt., 2012). Pastaroji sistema leidžia vykdyti baltymų sintezę ne tik 37°C, bet ir 65°C temperatūroje.

### 1.2.2.2. Eukariotinės vienaląsčių IVTT sistemos

Pirmuonių IVTT sistemos pradėtos kurti anksti, kaip ir *E. coli* sistemos – septintajame dvidešimtojo amžiaus dešimtmetyje (Zemella ir kt., 2015). Šios sistemos yra pigesnės, ląstelės lengviau auginamos, o baltymai pasižymi didesniu tirpumu. Taip pat *Leishmania tarentolae* pagrįsta *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistema buvo praturtinta nuo rūšies nepriklausoma translacijos seka (*angl.* species-independent translational

sequences), kuri pagerina IVTT reakciją, išvengdama pirmųjų transliacijos iniciacijos veiksnių naudojimo (Mureev ir kt., 2009). Ląstelinio ekstrakto ruošimo metu galima pridėti specifinės sekos oligonukleotidą, kuris slopins vidinių iRNR transliaciją ir taip paskatins įdėtos iRNR sekos sintezę (LeBowitz ir kt., 1993). Nepaisant šių privalumų, apie pirmuonių IVTT sistemų posttransliacines modifikacijas yra žinoma labai nedaug. Šiuo metu yra naudojamos iš *Tetrahymena pyriformis* (Mager ir Lipmann, 1958), *Crithidia oncopelti* (Chesters, 1968), *Paramecium aurelia* (Reisner ir Macindoe, 1967), *Entamoeba histolytica* (Carter ir kt., 1967) ir *Leishmania tarentolae* (Kovtun ir kt., 2010) ląstelių paruoštos IVTT sistemos. Baltymo išeiga gali siekti 300 µg/ml (Mureev ir kt., 2009).

Mielių IVTT sistemų kūrimas prasidėjo 1970-iais (Sissons, 1974). Pirmųjų darbų tikslas buvo suprasti eukariotų transliacijos iniciaciją. Vėliau šios sistemos buvo tobulinamos: ekstrakto paruošimo žingsnis (Hodgman ir Jewett, 2013), ląstelių auginimo sąlygos (Choudhury ir kt., 2014), koduojanti seka (Hodgman ir Jewett, 2014), baltymo žymės prijungimas (Ojima-Kato ir kt., 2017), substrato atnaujinimas ir šalutinių produktų pašalinimas (Schoborg ir kt., 2014). Taip pat nemažai darbo buvo įdėta į energijos regeneravimo sistemos tobulinimą: įprastos *E. coli* sistemos (fosfoenolpiruvatas, kreatino fosfatas) inhibavo mielių IVTT reakciją. Todėl buvo pasiūlyta gana paprasta alternatyva – gliukozė (Anderson ir kt., 2015). Ši sistema ne tik padidino baltymo išeigą, bet ir sumažino mielių IVTT kainą. Paskutiniai sistemos patobulinimai naudojo išveiklintas (*angl.* knockout) mielių ląstelių linijas ir pasiekė 20 µg/ml išeigą (Schoborg ir kt., 2016).

### 1.2.2.3. Augalų IVTT sistemos

Augalų IVTT sistemos kūrimas prasidėjo nuo kviečių gemalo ekstrakto panaudojimo (Roberts ir Paterson, 1973). Šiuo metu tai yra daugiausiai pažengusi eukariotinė *in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistema, kuri net buvo pritaikyta vakcinų kūrimui skirtų maliarijos baltymų sintezei (Arumugam ir kt., 2014). Ši sistema taip pat pasižymi labai gera išeiga (lyginant su kitomis eukariotinėmis sistemomis): nedializuojamoje reakcijoje gali siekti 1,6 mg/ml, o dializuojamoje net 20 mg/ml (Harbers, 2014).

Kaip ir galima tikėtis, kuriant kviečių gemalo IVTT sistemą teko įveikti nemažai iššūkių. Kviečių gemalo endosperme yra didelis kiekis nukleazų ir proteazų. Siekiant jas pašalinti, kviečių gemalo ląsteles tenka plauti keletą kartų (Madin ir kt., 2000). Plovimų metu pašalinami ne tik nepageidaujami

baltymai, bet ir mažos biomolekulės (Harbers, 2014). Pavyzdžiui, sintetinant desaturazę funkcionalaus komplekso susirinkimui reikia geležies. Po visų plovimų, geležies kiekis IVTT sistemoje yra 50 kartų mažesnis negu reikia reakcijai vykti (Goren ir Fox, 2008). Ekstrakto paruošimo metu taip pat yra pašalinamas endoplazminis tinklas, todėl negalima vykdyti visų posttransliacinių modifikacijų. Tačiau šią problemą galima išspręsti kviečių gemalo IVTT sistemą praturtinant mikrosomomis, gautomis iš šunų kasos (Shields ir Blobel, 1977). Disulfidinių jungčių susidarymas taip pat vyksta įdėjus baltymų disulfido izomerazę ir sumažinus DTT kiekį reakcijos tirpale (Kawasaki ir kt., 2003) arba IVTT reakciją papildant redukuotu ir oksiduotu glutationu (Zawada ir kt., 2011).

Kita augalų IVTT sistema yra paremta tabako BY-2 ląstelių ekstraktu (Buntru ir kt., 2015). Ši sistema pasižymi tuo, kad leidžia sintetinti aktyvius baltymus turinčius disulfidinius ryšius ar glikozilinti baltymus (jei jiems reikia tokios posttransliacinės modifikacijos). Ekstrakto kviečių gemalo IVTT sistemos paruošimas gali užtrukti iki penkių dienų, kai tabako ląstelių ekstraktas gali būti paruoštas per ~5 valandas. Šioje sistemoje galima pasiekti iki 400 µg/ml baltymo išėigą dializuojamoje reakcijoje (Buntru ir kt., 2014).

#### 1.2.2.4. Vabzdžių IVTT sistemos

Kukurūzinio dykrinuko (*lot.* Spodoptera frugiperda) Sf21 ląstelės yra naudojamos ruošiant ekstraktą IVTT reakcijoms (Kubick ir kt., 2009). Ekstrakto paruošimo procedūra yra švelnesnė, nei naudojama kviečių gemalo ląstelėms, todėl yra išsaugojama dalis endoplazminio tinklo. Šios pūslelės natūraliai susirenka į mikrosomas (Sachse ir kt., 2013) ir sukuria sistemą, kurioje yra galimos įvairios posttransliacinės modifikacijos: peptido skėlimas (Zampatis ir kt., 2012), lipido prijungimas (Shaklee ir kt., 2010), glikozilinimas (Tarui ir kt., 2001) ir disulfidinio ryšio formavimas (Merk ir kt., 2012). Tam, kad baltymas būtų perneštas į mikrosomas, prie jo sekos galima prijungti signalinę seką iš bičių melitino (*angl.* melittin) (Stech ir kt., 2013). Mikrosomas galima lengvai surinkti centrifuguojant. Jos gali būti arba suardytos naudojant švelnius detergentus (Stech ir kt., 2014), arba gali būti sulietos į milžiniškąsias vienasluoksnes pūsleles (*angl.* giant unilamellar vesicles) (Shaklee ir kt., 2010) ir panaudotos kaip modelis membranų tyrimuose (Wesołowska ir kt., 2009).

Vabzdžių IVTT sistemose transkripciją ir transliaciją galima vykdyti vienoje reakcijoje arba atskirai. Vykiant abi reakcijas kartu viename

mėgintuvėlyje, darbas užtrunka trumpiau ir yra paprastesnis. Atskyrus transkripciją nuo translacijos, galima gauti didesnes išeigas. Tai yra ypač svarbu, nes nedializuojamose reakcijose baltymo išeiga nesiekia keleto mikrogramų mililitre (Katzen ir kt., 2005). Dializuojant baltymų sintezės reakciją ir taip pašalinant šalutinius produktus, baltymo išeiga gali pasiekti 60 µg/ml (Stech ir kt., 2014).

#### 1.2.2.5. Žinduolių IVTT sistemos

Viena senesnių žinduolių IVTT sistemų yra ruošiama iš triušių retikulocitų ekstrakto. Pirmieji darbai pradėti 1960-aisiais (Zemella ir kt., 2015). Ši sistema dažnai yra pasirenkama tiems atvejams, kai norima sintetinti tik savo tikslinį baltymą. Ruošiant ekstraktą, yra pridodama mikrokokų nukleazės, kuri degraduoja visas retikulocitų ląstelėse esamas iRNR (Pelham ir Jackson, 1976). Prieš ekstrakto naudojimą nukleazė yra inaktyvuojama pridodant EGTA, kuris suriša  $Ca^{2+}$  jonus. Triušių retikulocitų *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistema neturi mikrosomų. Norint sintetinti baltymą, kurio aktyvumui yra reikalingos posttransliacinės modifikacijos, šią IVTT sistemą reikia papildyti mikrosominėmis membranomis (panašiai kaip kviečių gemalo ekstrakto atveju). Baltymų išeigos yra mažos ~500 ng/ml (Wang ir kt. 2011). Net padidinat išeigą 10 kartų naudojant virusų sekas (Anastasina ir kt., 2014), ši sistema stipriai nusileidžia kviečių gemalo ar vabzdžių IVTT sistemoms.

Kinų žiurkėnas yra dažnai naudojamas sintetinti sudėtingus baltymus *in vivo*, todėl visai neseniai buvo sukurta IVTT sistema, naudojanti šio gyvūno ląstelių ekstraktą (Kim ir kt., 2012). Ląstelių ekstraktas ruošiamas naudojant švelnius metodus, todėl, kaip ir kukurūzinio dykrinuko IVTT sistemoje, yra išsaugoma dalis endoplazminio tinklo, susirenkančio į mikrosomas (Brödel ir kt., 2015). Tai leidžia turėti paprasčiau paruošiamą sistemą, kuri gali atlikti baltymų posttransliacines modifikacijas. Kinų žiurkėno beląstelinė baltymų sintezė yra vykdoma kartu su iRNR sinteze, t.y. negalima šių reakcijų atskirti. Vykdamas reakcijas kartu, tenka parinkti tarpines sąlygas, kurios tiktų ir transkripcijai, ir translacijai, o tai mažina baltymo išeigas. Tačiau naudojant vidinę ribosomų prisijungimo vietą (*angl.* internal ribosome entry site) iš svirplį paralyžiuojančio viruso (*angl.* cricket paralysis virus), išeigą galima padidinti iki 53 µg/ml (Brödel ir kt., 2013). Tačiau geriausias baltymų išeigos rezultatas yra pasiektas dializuojamoje kinų žiurkėno IVTT reakcijoje: 980 µg/ml (Thoring ir kt., 2017).

*In vitro* transkripcijos ir translacijos sistemos paruoštos iš žmogaus ląstelių yra panašios į kinų žiurkėno IVTT sistemas. Ekstrakto ruošimo metu yra išsaugomos mikrosomos, todėl yra galimos įvairios posttranslacinės modifikacijos, kurios yra svarbios daugybei komercinių terapinių baltymų (Picanco-Castro ir kt., 2013). Šių sistemų išeiga, kaip ir kitų eukariotinių sistemų, nėra didelė: 20 µg/ml (Brödel ir kt., 2015). Tačiau yra darbų, kuriuose ieškoma būdų, kaip šį klausimą išspręsti. Vienas iš taikomų metodų yra eukariotinio translacijos ilginimo veiksnio eIF2α fosforilinimo stabdymas. Galima ekstraktą papildyti K3L, kuris suriša eIF2α kinazės (Mikami ir kt., 2010), arba GADD34, kuris skatina eIF2α defosforilinimą (Mikami ir kt., 2006). Išeigą taip pat galima gerinti naudojant vidinę ribosomų prisijungimo vietą (*angl.* internal ribosome entry site). Didžiausias žmogiškųjų IVTT privalumas yra naudojami natūralūs kodonai, kurių dėka galima susintetinti didelės molekulinės masės žmonių baltymus (Mikami ir kt., 2008) ar net visą virusą (Kobayashi ir kt., 2014). HeLa ląstelių linija pagrįsta sistema yra komerciškai prieinama (1-Step Human Coupled IVT Kit, ThermoFisher Scientific), o išeiga gali siekti net iki 750 µg/ml (Chong, 2014).

### 1.2.3. Kryptinga baltymų evoliucija panaudojant *in vitro* sistemas

Viena iš perspektyvių *in vitro* baltymų sintezės pritaikymų sričių yra kryptinga baltymų evoliucija. Kryptinga baltymų evoliucija (*angl.* directed protein evolution) yra baltymų inžinerijos metodas, kuris atkartoja gamtoje vykstačios natūralios atrankos procesą. Baltymų molekulės gamtoje atlieka svarbią biologinę funkciją: vykdo įvairias chemines reakcijas, svarbias organizmams, ir tą atlieka labai efektyviai: kai kurių fermentų reakcijos greitį riboja tik molekulių difuzija (Berg ir kt., 2002). Pavyzdžiui, β laktamazė, atsakinga už *Azospirillum lipoferum* atsparumą β laktaminiams antibiotikams (Boggio ir Roveri, 2003). Tačiau tokį reakcijos greitį pasiekia ne visi fermentai. Priešingai, nemaža dalis gamtoje randamų fermentų pasižymi “vidutinėmis” katalizinėmis savybėmis, t. y.  $k_{cat}/K_M$  konstanta, nusakanti fermentų katalizinį efektyvumą, yra apie  $10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Molekulių difuzijos sąlygojama  $k_{cat}/K_M$  konstanta galėtų būti 10 000 kartų didesnė, t. y. galėtų siekti  $10^8\text{-}10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Koenig ir Brown, 1972). Yra manoma, kad gamtoje randamų fermentų katalizinis efektyvumas yra natūralios evoliucijos pagalba atrinktas ir pritaikytas ląstelių gyvybinėms funkcijoms palaikyti, ir nebūtinai yra maksimalus. Todėl didžiosios dalies gamtoje randamų

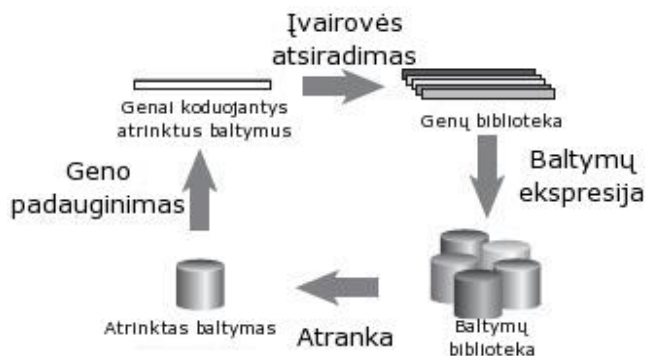
fermentų katalizinis efektyvumas gali būti pagerintas natūralios ar laboratorinės evoliucijos būdu (Bar-Even ir kt., 2011).

Šiuo metu jau yra sukurtas ne vienas metodas, skirtas kryptingai baltymų evoliucijai *in vitro*. Kai kurie metodai naudoja ląsteles ar virusus, t. y. turi *in vivo* žingsnį, kuris supaprastina mutacijas turinčio baltymo ir jį koduojančios DNR susiejimą. Tačiau laboratorinės evoliucijos metodas, turintis *in vivo* žingsnį, gali patikrinti mažesnę mutantų biblioteką, negali evoliucionuoti baltymų tokiose sąlygose, kurios yra toksiškos ląstelėms. Evoliucijos metodai, neturintys *in vivo* žingsnio, neturi šių apribojimų, tačiau tokiuose metoduose reikia ieškoti būdo, kaip susieti genotipą su fenotipu. Tai gali būti atlikta susiejant iRNR su jos koduojamu baltymu per puromiciną (Roberts ir Szostak, 1997) ar per ribosomas (Mattheakis ir kt., 1994). Taip pat galima ekspresuoti kiekvieną baltymą atskirai, pavyzdžiui, 96 šulinėlių mikroplokštelėje (Lanio ir kt., 2000) arba viename mikroskysčių lašelyje (Mažutis ir kt., 2009).

Laboratorijoje procesas pradedamas nuo genetinės medžiagos padauginimo ir mutantų bibliotekos sukūrimo. Biblioteka yra panaudojama baltymų sintezei, t.y. genotipas yra verčiamas fenotipu. Fenotipai yra atrenkami pagal pageidaujamą bruožą, kartu atrenkant ir jų genotipus. Atrinkta genetinė medžiaga yra pakartotinai naudojama padauginimo, baltymų sintezės ir atrankos cikluose (1.7. pav.) (Smith, 1985). Baltymo sintezė yra vykdoma pasitelkiant *in vivo* arba *in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistemas.

Vienas iš uždavinių *in vitro* evoliucijos procese yra susieti genotipą su fenotipu. Naudojant ląsteles, genotipas su fenotipu yra susiejamas per pačią ląstelę: genetinė medžiaga yra saugoma ląstelės viduje, o baltymas būna ląstelės išorėje (Freudl ir kt., 1986). Tačiau ląsteles naudoti ne visada patogu, todėl yra daugybė metodų, kurie genotipą susieja su fenotipu pasitelkdami kitus metodus. Tarp tokių metodų yra baltymo ekspozicija ant ribosomų (Mattheakis ir kt., 1994), ekspozicija ant iRNR (Roberts ir Szostak, 1997), ekspozicija ant savo DNR sekos (Odegrip ir kt., 2014) arba *in vitro* kompartmentalizacija (Tawfik ir Griffiths, 1998). Lyginant su minėtais ekspozicijos metodais, *in vitro* kompartmentalizacija pasižymi unikaliu privalumu. Sukurti atskiri lašeliai suteikia daugiau galimybių daryti įtaką reakcijai vykstančiai viduje. Atskiri lašeliai gali būti papildyti reagentais (Abate ir kt., 2010) arba gali būti atrinkti iš visos lašelių populiacijos, jei juose įvyko reakcija (Fallah-Araghi ir kt., 2012). Tolesniame skyrelyje bus

pristatomi metodai, susiję su kryptinga baltymų evoliucija naudojant *in vitro* kompartmentalizaciją (*angl. in vitro compartmentalization - IVC*).



**1.7. pav.** Bendra kryptingos evoliucijos schema. Pasirinkto baltymo genas yra padauginamas, įterpiant mutacijas ir taip sukuriama genų biblioteka. Biblioteka yra panaudojama baltymų sintezei. Iš skirtingų baltymų yra atrenkamas vienas ar grupė baltymų, pasižyminčių pageidaujama savybe. Pasirinktus baltymus koduojanti genetinė medžiaga gali būti panaudota pakartotinai *in vitro* evoliucijos cikle (Matsuura ir Yomo, 2006).

### 1.2.3.1. Ankstyvieji IVC metodai

*In vitro* kompartmentalizaciją kryptingai baltymų evoliucijai pirmą kartą pritaikė Dan Tawfik ir Andrew Griffiths (Tawfik ir Griffiths, 1998). Jie bandė pakartoti gamtoje vykstančio proceso principus ir panaudoti juos baltymų inžinerijoje. Tačiau pirmieji darbai tiko tik NR modifikuojantiems fermentams (Griffiths ir Tawfik, 2006) arba tekdavo dėti papildomų pastangų norint išsaugoti genotipo ir fenotipo ryšį.

Šios sistemos leido lašelių turinį papildyti cheminėmis medžiagomis, tačiau tai nebuvo patogiu ir procesą buvo sunku kontroliuoti. Paprastai buvo galima pristatyti tik medžiagas, tirpstančias emulsijos alyvoje (Griffiths ir Tawfik, 2003). Norint esamų lašelių turinį papildyti vandenyje tirpiomis molekulėmis, tekdavo naudoti nanolašelius ar micles (Bernath ir kt., 2005).

Emulsijos buvo ruošiamos naudojant magnetinį maišytuvą, todėl natūralu, kad lašeliai šiose sistemose buvo polidispersiški. Todėl kiekvienas fermentas buvo tikrinamas ne tomis pačiomis sąlygomis. Tuo metu buvo ieškoma metodų, kaip gauti monodispersiškesnes emulsijas. Buvo siūloma emulsiją ruošti kelis kartus spaudžiant per tarp dviejų švirksčių sumontuotą

filtrą (Mastrobattista ir kt., 2005) ar naudoti homogenizatorių (Miller ir kt., 2006). Vienas geriausių rezultatų buvo gautas naudojant mikroskysčių sistemas, kuriose gautos emulsijos buvo monodispersiškos (Srinivasan ir kt., 2004).

### 1.3. Mikroskysčių technologija kryptingai evoliucijai

#### 1.3.1. Mikroskysčių sistemos

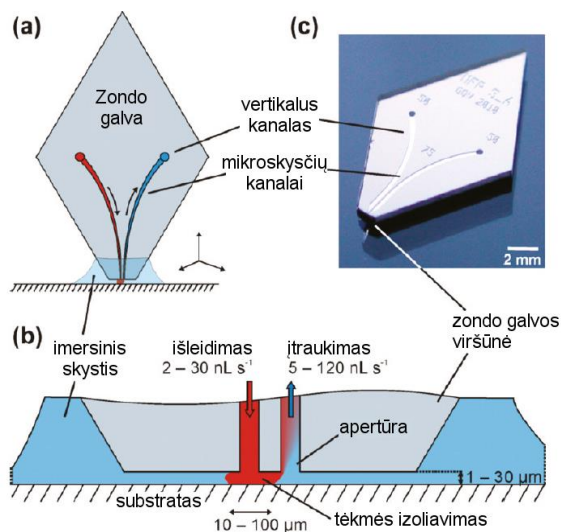
Mikroskysčių technologijos atsiradimo pradžia yra siejama su tranzistorių sukūrimu, o pirmąją, mikroskysčiais paremta analizės sistema yra laikomas 1979 m. sukurtas dujų chromatografijos prietaisas (Terry ir kt., 1979). Ši technologija buvo vystoma toliau ir šiuo metu plačiau yra naudojamos šios mikroskysčių sistemos: popierinės, atviros, organus imituojančios ir lašelių sistemos.

Popierinės mikroskysčių sistemos atsirado siekiant padaryti technologiją pigesne. Vieno tokio mikroskysčių prietaiso kaina gali būti tik 0,10 \$ (Chin ir kt., 2011). Šiose sistemose skystis savaime teka popieriuje esančiais kapiliarais ir pompos tampa nebereikalingos. Popierinė mikroskysčių technologija pradėjo populiarėti po to, kai buvo parodyta, kad ji gali būti panaudota kelių analizių nustatymui vienu metu (Martinez ir kt., 2007). Nuo to laiko buvo sukurta ne viena popierinė mikroskysčių diagnostikos sistema, pavyzdžiui, galvijų infekcinių reprodukcinę ligų nustatymui (Yang ir kt., 2018), maliarijos nustatymui – DNR yra nustatoma ir ekstrahuojama iš kraujo viename mikroskysčių prietaise (Xu ir kt., 2016) arba miokardo infarkto biomarkerių nustatymui (Li ir kt., 2020).

Atviras mikroskysčių sistemas gerai pristato mikroskysčių zondas, sukurtas David Juncker (Juncker ir kt., 2005). Zondas vienu metu išleidžia ir įtraukia skystį taip sukurdamas srovę tarp dviejų apertūrų (1.8. pav.). Šis hidrodinaminis skysčio srautas leidžia lokaliai paskleisti reagentus. Taip yra išvengiama uždarytų kanalų naudojimo, galimo jų užsikimšimo ar oro burbulų įterpimo bei padidinamas prietaiso jautrumas (Kaigala ir kt., 2011).

Organus imituojančios mikroskysčių sistemos turi gyvas ląsteles išdėstytas taip, kad simuliuotų gyvą organą. Šiose sistemose taip pat bandoma atkartoti organuose esančių ląstelių patiriamus mechaninius impulsus bei supaprastinti biologinės medžiagos paėmimą tyrimams. Skysčio tekėjimas tokioje mikroskysčių sistemoje imituoja kraujo tekėjimą organuose ir pastovią ląstelių perfuziją terpe. Pirmosiose organus imituojančiose sistemose buvo naudojamos tik vieno tipo ląstelės, tačiau





**1.8. pav.** Atvira mikroskysčių sistema. (a) yra pavaizduota bendra atviros mikroskysčių sistemos schema, (c) – tokios sistemos nuotrauka, o (b) – zondo galvos viršūnės schema ir veikimas, su įprastais tekėjimo greičiais ir atstumais, reikalingais lokaliai izoliuoti tėkmę (Kaigala ir kt., 2011).

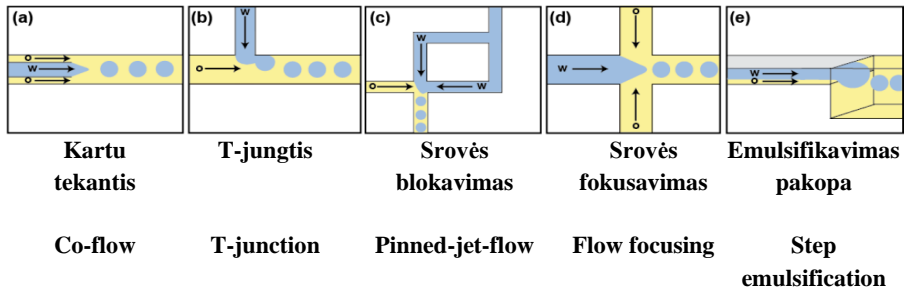
dabar yra moduliai, turintys vienu metu kelių tipų ląsteles. Šiose sistemose galima tyrinėti kaip ląstelės reaguoja į koncentracijų gradientą, galima imituoti ciklinį mechaninį stresą ląstelių patiriamą kraujagyslėse arba plaučiuose, galima įterpti elektrodus neuronų tyrimams ar kitus sensorius ląstelių stebėjimui (Convery ir Gadegaard, 2019).

Lašelių mikroskysčių sistemoje reakcijos yra vykdomos atskiruose kompartmentuose. Į mikrogardelę įleidžiama reakcijos mišinio vandeningė fazė yra emulsifikuojama į atskirus lašelius pasitelkiant alyvą. Kiekvienas mikrolašelis funkcionuoja kaip nepriklausoma reakcija. Didelis lašelių kiekis suteikia privalumą įvairiuose taikymuose: aukso nanodalelių sintezėje (Abalde-Cela ir kt., 2018), pavienių ląstelių antikūnių atrankoje (Shembekar ir kt., 2018) ar BK viruso nustatyme šlapime (Xu ir kt., 2021).

### 1.3.2. Lašelių mikroskysčių sistemos moduliai

Lašelių generavimas mikroskysčių sistemoje gali būti atliekamas disperguojant vandens fazę nesimaišančioje su vandeniu alyvoje. Šio proceso metu yra naudojamos paviršiaus aktyviosios medžiagos, stabilizuojančios padarytus lašelius. Lašelių generavimas yra vykdomas

skirtingų geometrijų mikrokanalėlių sistemose, kuriuose susitinka skirtingos fazės: vandeninė ir su vandeniu nesimaišanti (1.9. pav.).



**1.9. pav.** Pagrindinės kanalėlių geometrijos, naudojamos mikrolašelių generavimui. Rodyklės žymi skysčio tekėjimo kryptį, „o“ raidė ir geltona spalva žymi alyvos fazę, o „w“ raidė ir mėlyna spalva žymi vandeninę fazę. (a) ir (e) geometrijos yra trimatės, (b) – (d) geometrijos yra plokščios. (Autour ir Ryckelynck, 2017).

Kartu tekanti kanalėlių geometrija (*angl.* co-flow) yra pasiūlyta dar 2000 m. (1.9. pav. a) (Umbanhowar ir kt., 2000). Taip disperguojama vandens fazė teka kapiliaru, patalpintu tekančioje alyvoje. Šis kanalėlių išdėstymas netapo populiarus dėl sudėtingesnio praktinio įgyvendinimo gaminant mikroskysčių gardeles. Daug dažniau lašelių gamybai buvo pasirenkamas plokštuminis kanalėlių išdėstymas, naudojantis šlyties jėgą (1.9. pav. b – d). T-jungties geometrija yra dažniau pasirenkama, kai yra norima daryti didesnius lašelius (Garstecki ir kt., 2006), o srovės fokusavimo – norint gauti mažesnius lašelius didesniais greičiais (Anna ir kt., 2003). Emulsifikavimas pakopa yra paremtas staigiu slėgio pokyčiu kanalėlyje. Ši geometrija yra naudojama, kai tenka dirbti su labai skirtingos klampos skysčiais (Chan ir kt., 2005) arba reikia gauti femtolitrų tūrio lašelius (Malloggi ir kt., 2010).

Lašelių generavimo modulius galima apibūdinti keliais svarbiais parametrais: pasiekiamas lašelių dydis, lašelių generavimo greitis ir lašelių dydžių pasiskirstymas, matuojamas kovariacijos koeficientu. Pavyzdžiui, grupė iš Anglijos, naudodama srovės fokusavimo geometriją, patvirtino, kad generavo  $1,3 \times 10^6$  lašelių per sekundę, kurių dydis yra mažesnis nei 10 fl (Shim ir kt., 2013). Tikėtina, kad jų naudojamas mikroskysčių modulis pasiekė net 1,1 fl tūrio lašelių generavimą  $9,8 \times 10^6$  lašelių per sekundę greičiu, tačiau turima optinė įranga neleido patvirtinti šio rezultato. Paprastai, lašeliai paruošti naudojant srovės fokusavimo geometriją yra monodispersiški (kovariacijos koeficientas = 2 %) (Price ir Paegel, 2016).

Emulsifikuojant pakopa (1.9. pav. e.), Leman su kolegomis pasiekė 75 fl lašelių generavimą  $1,1 \times 10^4$  lašelių per sekundę greičiu (Leman ir kt., 2015). Nors gauti didesni lašeliai ir mažesnis jų generavimo greitis nei Shim darbe, tačiau lašelių tūrio kovariacijos koeficientas buvo <2%. Leman atliktame darbe buvo pasiūlytas ne tik femtolitų tūrio lašelių generavimo modulis, bet ir visi pagrindiniai mikroskysčių moduliai, reikalingi darbui su tokiais mažais lašeliais: pakartotinas suleidimas į mikrogardelę (*angl.* reinjection), lašelių skėlimas (*angl.* splitting), suliejimas (*angl.* coalescence) ir rūšiavimas (*angl.* sorting). Dideli lašelių generavimo greičiai taip pat pasiekiami paralelizuojant procesą, pavyzdžiui, naudojant modulį, kuriame lašeliai susidaro keliose kanalėlių susijungimuose tuo pačiu metu. Grupė iš Jungtinių Amerikos Valstijų naudojo modulį, turintį 1000 srovės fokusavimo geometrijos purkštukų viename modulyje (Jeong ir kt., 2015). Jie pasiekė  $8,7 \times 10^6$  lašelių generavimą per sekundę. Lašeliai buvo pikolitų eilės (48 pl), o jų diametro kovariacijos koeficientas buvo lygus 6,6 %.

*In vitro* evoliucijos procesui yra svarbūs ir kiti mikroskysčių moduliai. Kartais baltymo sintezės sąlygos yra nesuderinamos su sąlygomis, reikalingomis baltymo aktyvumui ir tenka imtis priemonių, leidžiančių pakeisti tirpalo sudėtį lašelyje ar pridėti papildomų medžiagų į jį. Tam tikrose situacijose galima panaudoti ne mikroskysčių metodus. Pavyzdžiui, pritvirtinus fermento substratą prie mikrorutuliukų, substratą laikančią jungtį galima suskaidyti naudojant UV šviesą po baltymo sintezės (Price ir kt., 2016). Taip pat galima naudoti specifinius mikroskysčių modulius, kurie sulieja kelis lašelius. Skirtingos sudėties lašeliams priartėjus vienas prie kito, suliejimas gali vykti pasyviai dėl stabilizuojančio surfaktanto trūkumo (Mazutis ir Griffiths, 2012) ar slėgio sumažinimo (Bremond ir kt., 2008). Taip pat yra žinomi ir aktyvūs lašelių suliejimo metodai, naudojantys pakaitinimą lazeriu (Baroud ir kt., 2007), lašelių elektrostatinę įkrovimą (2006), elektrosuliejimą (Chabert ir kt., 2005) ar pikoinjekciją (*angl.* picoinjection). Grupė, kūrusi pastarąjį metodą, galėjo papildyti jau paruoštus lašelius 0,1 – 3 pl skysčio  $1 \times 10^4$  lašelių per sekundę greičiu (Abate ir kt., 2010).

Paskutinis mikroskysčių etapas kryptingos evoliucijos darbo eigoje yra lašelių analizė ir rūšiavimas. Lašelių turinys gali būti analizuojamas pasitelkiant Ramano spektroskopiją, masių spektrometriją, elektrocheminę analizę ar optinius metodus (Zhu ir Fang, 2013). Šiuo metu plačiausiai naudojami yra optiniai metodai, paremti fluorescencija. Atlikus lašelio

turinio analizę, pasirinktus lašelius reikia atskirti nuo visos lašelių populiacijos. Rūšiavimas gali būti atliekamas naudojant lazeriu indukuotą termoforezę (Baroud ir kt., 2007), pjezoelektriko mechaninį judėjimą (Shemesh ir kt., 2010), membranineį sklendę (Abate ir kt., 2010), garso bangas (Schmid ir kt., 2014), lašeliams suteiktą skirtingą elektrostatinę krūvį (Ahn ir kt., 2011) ar naudojant dielektroforezę (Ahn ir kt., 2006). Pastarasis metodas yra naudojamas dažniausiai. Naudojant šiuos metodus paprastai galima pasiekti  $2-3 \times 10^3$  lašelių rūšiavimą per sekundę (Mazutis ir kt., 2013 ir Schmid ir kt., 2014), nors yra pranešimų ir apie didesnius rūšiavimo greičius:  $3 \times 10^4$  lašelių per sekundę (Sciambi ir Abate, 2015).

Norint pasiekti dar didesnius lašelių rūšiavimo greičius, dažniausiai tenka naudoti FACS (*angl.* fluorescence-activated cell sorting) metodą. Šis metodas yra skirtas darbui su vandeniniais tirpalais, o mikroskysčių emulsija paprastai būna alyvoje. Norint panaudoti FACS metodą mikroskysčių lašelių rūšiavimui, tenka ruošti vandens fazės emulsiją alyvoje, pakartotinai emulsifikuotą vandenyje (*angl.* water-in-oil-in-water) (Bernath ir kt., 2004). Tokios, dvigubos, emulsijos paruošimo procesas reikalauja papildomų pastangų ir ne visuomet yra paprastas, tačiau yra naudojamas ir tobulinamas toliau. Naujesniuose darbuose šiuo metodu pasiekiamas  $1,5 \times 10^4$  lašelių per sekundę rūšiavimo greitis ir monodispersiškos emulsijos, kurių kovariacijos koeficientas yra lygus 2,5 % (Zinchenko ir kt., 2014). Yra ir kitų būdų pritaikyti mikroskysčių emulsijas FACS'o prietaisui. Galima naudoti polielektrolitą, kuris padengs mikrolašelio turinį geliniu kiautu ir neleis didelėms molekulėms difunduoti suardžius emulsiją. Gauti geliniai lašeliai gali būti išrūšiuoti, o pakeitus pH suardytas polielektrolito apvalkalas (Fischlechner ir kt., 2014).

### 1.3.3. Mikroskysčių technologija *in vitro* evoliucijai

Mikroskysčių lašelių pritaikymas kryptingai baltymų evoliucijai buvo pademonstruotas su geležies hidrogenazėmis (Stapleton ir Swartz, 2010). Grupė iš Stenfordo Universiteto kūrė metodą, kuris galėtų sumažinti šių fermentų jautrumą deguoniui. Darbas pradedamas nuo DNR padauginimo ir pritvirtinimo prie mikrorutuliukų. Pastarieji yra panaudojami beląstelinei baltymų sintezei mikroskysčių lašeliuose, o susintetinta hidrogenazė prisitvirtina prie to paties mikrorutuliuko per antikūnį. Suardžius emulsiją, hidrogenazės yra paveikiamos deguonimi ir, dar kartą emulsifikavus, yra tikrinamas jų aktyvumas su  $C_{12}$ -resazurinu. Fermentai, likę aktyvūs po

poveikio deguonimi, redukuos substratą, o gautas fluorescencinis produktas pasitarnaus mikrolašelių rūšiavimui FACS prietaisu. Nors šis metodas nebuvo praktiškai pritaikytas kryptingai hidrogenazių evoliucijai, tačiau metodo veiksmingumas buvo pademonstruotas atrenkant aktyvias geležies hidrogenazes nuo chlorampfenikolio acetiltransferazių.

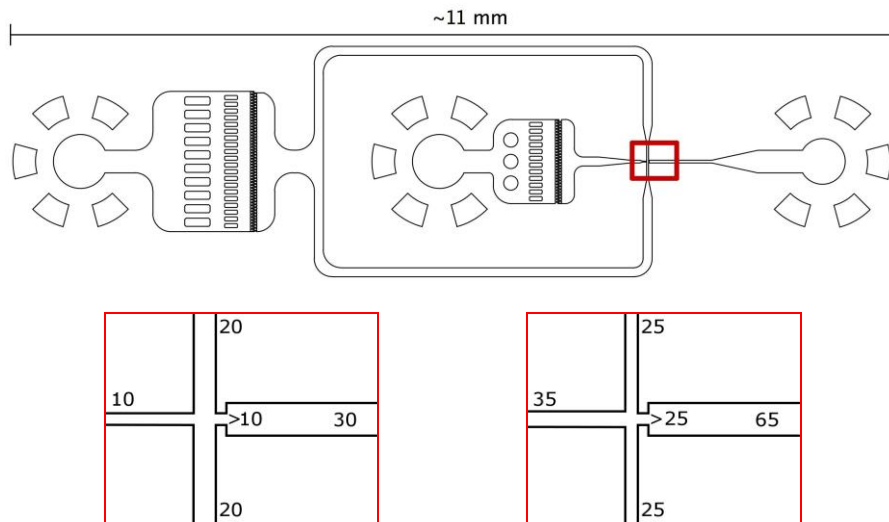
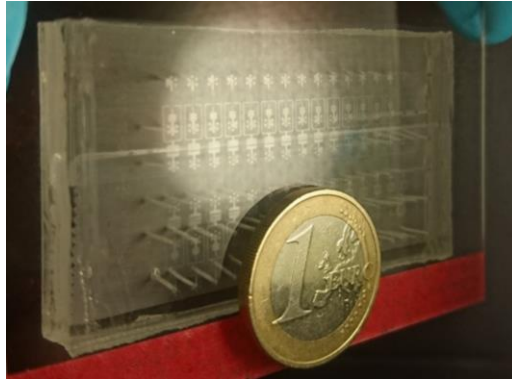
Panašaus principo *in vitro* evoliucijos schema buvo pasiūlyta krienų peroksidazėms (Zhu ir kt., 2015). Tačiau ir šis metodas praktiškai nebuvo pritaikytas, nes autoriams nepavyko surasti sąlygų, kuriose sėkmingai vyktų emulsijų PGR (DNR fragmentas buvo per didelis). Šio metodo veiksmingumas buvo parodytas atrenkant aktyvius fermentus iš aktyvių ir neaktyvių krienų peroksidazių mišinio, kuriame jos buvo sumaišytos santykiu 1 su 100.

Viena iš kryptingos evoliucijos sistemų, naudojanti mikroskysčius, buvo sukurta profesoriaus Andrew Griffiths laboratorijoje (Fallah-Araghi ir kt., 2012). Darbą jie pradėjo nuo pavienių DNR molekulių padauginimo mikroskysčių lašeliuose. Tuomet šie lašeliai buvo sulieti su IVTT lašeliais, naudojant elektrinio lauko sąlygojamą lašelių suliejimo metodą. Po  $\beta$ -galaktozidazės baltymo sintezės lašeliai buvo iš naujo įleisti į rūšiavimui skirtą mikroskysčių modulį. Šiame darbe buvo pasiektas  $2 \times 10^3$  lašelių per sekundę rūšiavimo greitis. Testuojant šį metodą su mutantų biblioteka, sudaryta iš aktyvaus ir neveiklaus baltymo, įvykdžius vieną ciklą pavyko gauti ~500 kartų praturtinimą.

#### 1.3.4. Darbe naudota mikroskysčių gardelė

Šiame darbe naudota mikroskysčių gardelė (1.10. pav.) yra skirta mišinio emulsifikavimui. Kairysis modulio kanalas yra skirtas alyvos, o vidurinis kanalas yra skirtas vandens fazės įleidimui (3.2. pav.). Šalia abiejų kanalų esančios erdvios sritys (kvadratai apvaliais kampais) turi smulkių struktūrų – stulpelių. Jie neleidžia didelei erdvei sukaupti ir veikia kaip filtras, kuris sulaiko mažus nešvarumus, taip apsaugodamas emulsifikavimo jungtį (pažymėta raudonu kvadratu 1.10. pav.) nuo užkimšimo. Emulsifikavimo jungtyje vandeninės fazės tolygų tekėjimą pertraukia iš kraštų atitekanti alyva. Šis procesas yra kartojamas daug kartų taip suardant vandeninę fazę į daugybę atskirų lašelių (3.2. pav.).

Darbe naudota mikrogardelė yra skirta vieno reakcijos mišinio emulsifikavimui. Tokia gardelė gali būti panaudojama skaitmeniniam lašelių PGR ar LAMP lašeliuose. Be šios gardelės Mikrotechnologijų sektoriaus



**1.10. pav.** Darbe naudota lašelių generavimo mikrogardelė.

**Viršuje** mikrogardelės su daug modulių nuotrauka.

**Viduryje** yra vieno modulio bendras kanalų išdėstymas. Vienas įėjimo kanalas alyvos fazei – modulio kairėje, vienas įėjimo kanalas reakcijos mišino vandeninei fazei – modulio centre bei vienas emulsijos surinkimo kanalas – modulio dešinėje. Raudonas kvadratas žymi jungtį, kurioje susijungia alyvos ir vandens fazės ir vyksta emulsijos susidarymas.

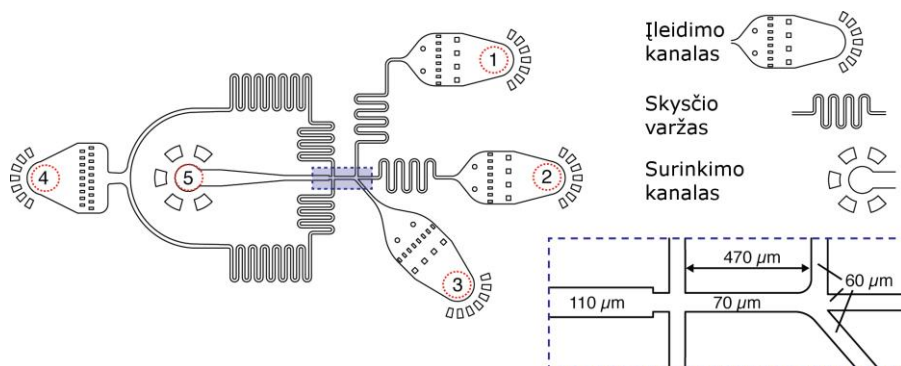
**Žemiau kairėje:** 11  $\mu\text{m}$  aukščio kanalų plotis, ties fazių susiliejimo jungtimi.

**Žemiau dešinėje:** 19  $\mu\text{m}$  aukščio kanalų plotis, ties fazių susiliejimo jungtimi.

Dimensijos apatiniuose brėžiniuose nurodytos mikrometrais.

grupėje yra naudojamos ir kitos gardelės. Pavyzdžiui, pavienių lašelių barkodavime ir sekoskaitoje buvo naudojama gardelė turinti daugiau funkcinių elementų (1.11. pav.). Šioje gardelėje yra trys skysčio įleidimo kanalėliai. Šis funkcionalumas leidžia sumaišyti skirtingus skysčius

mikrogardelėje iškart prieš juos emulsifikuojant. Tekėjimo linijos turi skysčio varžą. Šio elemento sukurtas pasipriešinimas skysčio tekėjimui kompensuoja pulsuojantį skysčio judėjimą, kuris susidaro dėl mechaninio skysčio pompų darbo. Linijose už varžo yra sukuriamas tolydus skysčio tekėjimas. Emulsifikavimo jungties kanalai yra didesni, nei šiame darbe naudotos gardelės, todėl skiriasi gaunamų lašelių dydis.



**1.11. pav.** Pavienių lašelių barkodavime ir sekoskaitoje naudota lašelių generavimo mikrogardelė. Kairėje pusėje pavaizduota bendra gardelės schema. Dešinėje pusėje viršuje yra funkcinių gardelės elementų legenda. O dešinėje apačioje (apvesta punktyru) yra emulsifikavimo jungtis su kanalėlių išmatavimais. Gardelė turi tris kanalėlius skysčio įleidimui (1), (2) ir (3), taip pat vieną kanalėlį skirtą alyvos įleidimui (4). Lašeliai išteka iš mikrogardelės per ištekėjimo kanalą (5) (Zilionis ir kt., 2017).

## 1.4. DNR kondensacija į nano- ir mikrodaleles

### 1.4.1. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės

Skirtingos organizacijos apibrėžia nanodaleles nevienodai. Tarptautinis ISO standartas apibrėžia nanodaleles kaip daleles, kurių viena ar daugiau kraštinių yra mažesnės nei  $100 \text{ nm}^1$ . ASTM (*angl.* American Society of Testing and Materials) laiko, kad nanodalelė – dalelė, kurios dvi ar trys dimensijos yra tarp 1 ir 100 nm. Britų standartų institucija BSI ir valstybinis vokiečių darbo apsaugos ir sveikatos institutas (*vok.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin – BAuA) mano, kad nanodalelė – dalelė,

<sup>1</sup> <https://www.iso.org/committee/381983.html>

kurios visos dimensijos arba diametras yra nanoskalėje (Horikoshi ir Serpone, 2013).

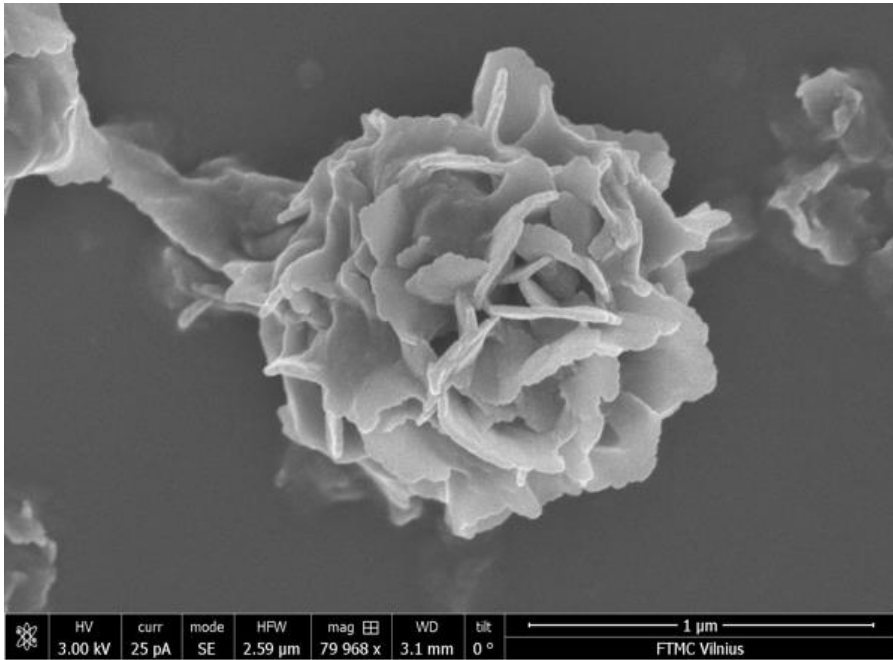
Nanodalelės gali būti iš vienos medžiagos ar kelių skirtingų medžiagų. Jei dalelę sudaranti medžiaga yra metalas ar puslaidininkis, tai tokios dalelės dažniausiai yra kietos. Jei nanodalelę sudaranti medžiaga yra skysta kambario temperatūroje, pavyzdžiui, lipidai, tai gauta dalelė yra minkštos, gelinės konsistencijos, pavyzdžiui, liposoma. Nanodalelės sudarytos iš vienos medžiagos yra dažniau naudojamos praktikoje, tačiau dalelės iš skirtingų medžiagų gali turėti įdomesnę ir įvairesnę pritaikymą. Pavyzdžiui, Janus dalelės, kurių paviršius sudarytas iš hidrofobinio ir hidrofiliųjų paviršių, yra panaudojamos laivų dažų gamyboje, kurie apsaugo laivo korpusą nuo apaugimo (Kirillova ir kt., 2016). Neorganinės branduolio apvalkalo nanodalelės fluorescuoja platesniame bangų ruože nei vienos medžiagos kvantiniai taškai, o tai yra svarbu biomediciniame pritaikyme (Xu ir kt., 2016). Nanodalelės, kurias tikimasi panaudoti vaistų pernešimo sistemose, dažnai turi neorganinį dalelės branduolį ir organinį dalelės apvalkalą (Lee ir kt., 2015).

Nanodalelės taip pat dažnai pasižymi skirtinga morfologija. Pagal tai dalelės skirstomos į nanosferas (Agam ir Guo, 2007), nanovamzdelius (Choy ir kt., 2004), nanorifus (Choy ir kt., 2004), nanodėžutes (Sun ir Xia, 2002), nanograndines (Kralj ir Makovec, 2015) ar nanogėles (Lee ir kt., 2015).

Nanogėlėmis (*angl.* nanoflowers) vadinamos dalelės, pasižyminčios specifiška morfologija, primenančia gėlės žiedlapį (1.12. pav.). Šios dalelės yra ypatingai įdomios tuo, kad palyginus su tokio paties dydžio sferinėmis dalelėmis, paviršiaus plotas yra žymiai didesnis. Ši savybė yra svarbi tokiuose taikymuose, kur yra svarbus didelis paviršiaus plotas, pavyzdžiui, kai dalelė yra naudojama kaip vaisto ar fermento nešiklis. Reikia pripažinti, kad nors šios dalelės literatūroje yra vadinamos nanogėlėmis, tačiau pavadinimas nėra labai tikslus. Labai dažnai šių dalelių, ypač turinčių organinę dalį, dydis yra mikrometrų ruože: 1 – 27 μm (Zubaite ir kt., 2017, Lee ir kt., 2015). Neorganinių dalelių dydis dažniau prasideda nanometrų ruože, t.y. 200-500 nm (Chen ir kt., 2017, Cao ir kt., 2016).

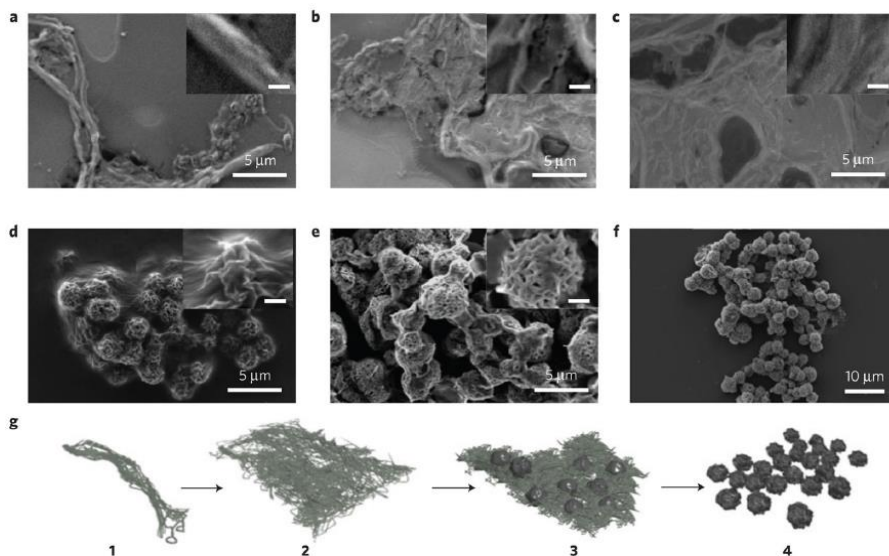
Gėlės žiedlapį primenančių dalelių susidarymas yra aprašytas tokiomis reakcijos sąlygomis, kuomet vienu metu vyksta nukleorūgšties sintezė ir dalelės susidarymas. Pradiniuose sintezės etapuose, didėja NR koncentracija ir formuojasi vijos (1.13. pav., a). Reakcijai vykstant toliau SEM nuotraukose yra matomos lakštinių struktūrų atsiradimas ir jų storėjimas





**1.12. pav.** Gėlės žiedlapį primenanti dalelė, sudaryta iš magnio pirofosfato ir DNR. SEM nuotrauka daryta Vaidoto Kiseliovo (Zubaitė ir kt., 2017).

(1.13. pav., b ir c). Didėjant NR kiekiui, molekulės klostosi tankiau ir lakšte pastebimos pirmosios dalelių formavimosi užuominos – raukšlėtos, dalinai sferinės struktūros (1.13. pav., d). Šios struktūros palaipsniui įgauna sferinės dalelės formą (1.13. pav., e), tačiau dar kurį laiką lieka tarpusavyje susijungusios RNR vijomis. Dalelėms augant toliau, jos atsijungia nuo bendros RNR matricos sudarydamos atskiras gėlės žiedlapį primenančias daleles (1.13. pav., f). Remiantis SEM nuotraukomis buvo pasiūlytas principinis NR kondensacijos į šias daleles mechanizmas (1.13. pav., g), kuris prasideda nuo vijų formavimosi, tuomet lakšto susidarymas, dalelių užuomazgos NR matricoje ir, galiausiai, atsipumpuravusios atskiros dalelės. Šios dalelės pasižymi didesniu temperatūriniu stabilumu, nei yra būdinga NR komplementarių bazių sąveikos atveju (150-170°C), bei dvejopu šviesos laužimo kampu, būdingu kristalams. Todėl yra manoma, kad NR dalelėje yra kristalinėje būsenoje (Lee ir kt., 2012, Zhu ir kt., 2013). Šias išvadas papildomai patvirtina ir žinomas faktas, kad pasiekus dideles koncentracijas, NR yra linkusios kristalizuotis (Strzelecka ir kt., 1988).



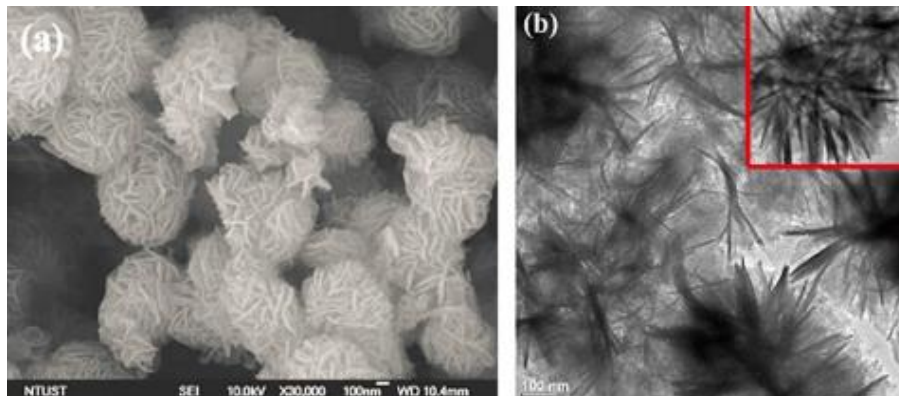
**1.13. pav.** Gėlės žiedlapį primenančių dalelių iš magnio pirofosfato ir RNR formavimasis. RNR sintezė buvo vykdoma T7 RNR polimerazės pradmeniu naudojant žiedinę DNR molekulę. Reakcijos produktai buvo įvertinti SEM po 1 h (a), 4 h (b), 8 h (c), 12 h (d) 16 h (e) ir 20 h (f). Remiantis SEM nuotraukomis buvo pasiūlyta dalelių kondensacijos principinė schema (g). Reakcijos metu didėjant RNR koncentracijai pradžioje yra matomos molekulių vijos (g, 1), kurios pradeda formuoti RNR pluoštą (g, 2). RNR pluoštui storėjant, jo paviršiuje pradeda formuotis raukšlėtos, dalinai sferinės struktūros (g, 3). Tęsiant sintezę, šios struktūros atsipumpuoja nuo RNR matricos, suformuodamos atskiras, sferines daleles (g, 4) (Lee ir kt., 2012).

#### 1.4.2. Neorganinės gėlės žiedlapį primenančios dalelės

Neorganinės gėlės žiedlapį primenančios dalelės dažnai sintetamos tam, kad būtų naudojamos reakcijų katalizei, jutiklių ar ličio elementų kūrime. Neorganinės dalelės paprastai yra pavadinamos pagal metalo joną, kuris sudaro dalelę. Šiame skyrelyje pateikiama keletas tokių dalelių pavyzdžių.

Gėlės žiedlapį primenančios dalelės, turinčios vario ( $\text{Cu}^+$  ir  $\text{Cu}^{2+}$ ) ir mangano ( $\text{CuMnOS}$ ), buvo susintetintos maišant tioacetaminą su vario nitratu ir mangano chloridu (1.14. pav., Chen ir kt., 2017). Keičiant hidrazino kiekį dalelių sintezės metu buvo gautos dvi skirtingos dalelių rūšys: turinčios mažai  $\text{Cu}^+$  ir turinčios daug  $\text{Cu}^+$ . Daug  $\text{Cu}^+$  turinčios dalelės buvo panaudotos metanolio sintezei iš anglies dioksido ir vandens, o mažai

Cu<sup>+</sup> turinčios dalelės – vandenilio sintezei iš metanolio ir vandens. Šios reakcijos vyko vandeninėje terpėje, kambario temperatūros sąlygomis be papildomos energijos ar reagentų. Tokia sistema atlieka pilną CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH redukavimo-oksidavimo ciklą.



**1.14. pav.** Gėlės žiedlapį primenančių dalelių iš vario ir mangano SEM (a) ir TEM (b) mikroskopijos nuotraukos (Chen ir kt., 2017).

Iš vario ir platinos lydinio pagamintos gėlės žiedlapį primenančios dalelės buvo panaudotos amonio borano hidrolizei (Zhou ir kt., 2017). Kaip ir galima buvo tikėtis, šios dalelės gerokai pralenkė kitus platinos ir vario katalizatorius savo pradinės reakcijos greičiu, pasiekdamos 108 mol H<sub>2</sub>/min/mol Pt.

Magnio oksido dalelėmis buvo padengtas bismuto elektrodas. Toks jutiklis buvo panaudotas švino (Pb<sup>2+</sup>) ir kadmio (Cd<sup>2+</sup>) nustatyme ir pasiekė žemas detektavimo ribas: 2,1 pM ir 81 pM (Wei ir kt., 2012).

#### 1.4.3. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės dengtos baltymais

Gėlės žiedlapį primenančios dalelės, kurios yra sudarytos ne tik iš neorganinės dalies, bet turi ir organinę dalį, yra siūloma duoti pavadinimus pagal tai, koks metalas ir kokia organinė medžiaga sudaro dalelę (Lee ir kt., 2015). Keli klasifikavimo pavyzdžiai yra pateikti 1.1 lentelėje.

##### 1.4.3.1. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš vario ir baltymų

Ge ir bendraautorai susintetino keturias skirtingas gėlės žiedlapį primenančių dalelių rūšis. Visų branduolį sudarė vario jonai (Cu<sup>2+</sup>), tačiau

*1.1. lentelė. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės klasifikavimo pavyzdžiai*

<b>Metalo jonas</b>	<b>Organinė medžiaga</b>	<b>Literatūros šaltinis</b>
Varis	$\alpha$ -laktalbuminas lakazė karboanhidrazė lipazė gliukozės oksidazė ir krienių peroksidazė	Ge ir kt., 2012 Sun ir kt., 2014
Kalcis	$\alpha$ -amilazė chitozanas	Wang ir kt., 2013 Wang ir kt., 2014
Manganas	imunoglobulinas G jaučio serumo albuminas raktopamino antikūnis	Zhang ir kt., 2015
Magnis	RNR DNR	Lee ir kt., 2012 Shopsowitz ir kt., 2014 Drmanac ir kt., 2009 Zhu ir kt., 2013 Lee ir kt., 2012

skyrėsi panaudota baltyminė medžiaga:  $\alpha$ -laktalbuminas, lakazė, karboanhidrazė ar lipazė. Įdomu tai, kad baltymų aktyvumas dalelėje nesumažėjo, net padidėjo (90-650 %) lyginant su neimobilizuoto fermento aktyvumu (Ge ir kt., 2012). Fermento aktyvumo padidėjimas yra aiškinamas dideliu dalelės paviršiaus plotu, kuris netrukdo medžiagų judėjimui, fermento molekulių tarpusavio sąveika ar metalo ir fermento sąveika (vario jonai didina lakazės aktyvumą).

Kitame pavyzdyje vario jonų pagrindu paruoštos dalelės buvo dekoruotos iškart dviem fermentais: gliukozės oksidaze ir krienių peroksidaze. Šios dalelės buvo panaudotos gliukozės detektavimo sistemoje. Gliukozės oksidazė oksiduodama gliukozę išskyrė  $H_2O_2$ , kuris krienių peroksidazės buvo panaudotas 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino oksidacijai (Sun ir kt., 2014). Skaidrus tirpalas nusidažydavo mėlyna spalva. Šis darbas yra įdomus dar ir dėl to, kad nanodalelė tapo efektyviu būdu vieną šalia kito pozicionuoti du kaskadinių reakcijų fermentus.

*1.4.3.2. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš kalcio ir baltymų*

Mokslininkų grupė iš Kinijos susintetino daleles kalcio jonų pagrindu. Šios dalelės buvo padengtos  $\alpha$ -amilaze, fermentu hidrolizuojančiu alfa ryšį

dideliuose polisachariduose (krakmole, glikogene) (Stedman, 2000). Fermentas, susintetintose dalelėse pasižymėjo didesniu fermentiniu aktyvumu, nei būdamas laisvas, tirpale, be to išliko aktyvus ilgesnį laiką (Wang ir kt., 2013).

Kalcio ir  $\alpha$ -amilazės dalelėse buvo lengva paviršių padengti baltymu, nes kalcis yra alosterinis  $\alpha$ -amilazės aktyvatorius. Tačiau ne visada yra lengva gėlės žiedlapį primenančias daleles dekoruoti baltymu. Todėl kita mokslininkų grupė pasiūlė alternatyvų dalelių ruošimo mechanizmą. Chitozanas ir trifosfatas yra inkubuojami kartu, kol sudaro gelio pavidalo mišinį. Šis mišinys yra maišomas su kristalais, paruoštais iš kalcio ir trifosfato, kad susidarytų dalelės. Susidariusios gėlės žiedlapį primenančios dalelės yra inkubuojamos su norimu baltymu, kuris įsijungia į daleles. Nors dalelės turėjo sąlyginai mažą baltymo kiekį (5 mg/g), tačiau baltymas išlaikė ~85 % savo fermentinio aktyvumo, o sukurta sistema leidžia daug lengviau pasirinkti norimą baltymą nanodalelėms paruošti (Wang ir kt., 2014).

#### *1.4.3.3. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš mangano ir baltymų*

Manganas irgi buvo panaudotas dalelių ruošime. Zhang ir kt. 2015 m. paskelbė straipsnį apie tris skirtingas nanodalelių rūšis, kurios buvo dengtos imunoglobulinu G, jaučio serumo albuminu ir raktopamino antikūniu. Šios dalelės buvo panaudotos elektrocheminiame biosensoriuje, skirtame nustatyti raktopaminą – gyvulinio maisto priedą, skatinantį galvijų liesėjimą. Šio priedo naudojimas yra reguliuojamas. Sukurtų biosensorių detekcijos ribos buvo 4,6, 9,3 ir 26 pg/ml (su imunoglobulinu G, raktopamino antikūniu ir jaučio serumo albuminu paruoštuose jutikliuose). Toks detektorius yra apie 1000 kartų jautresnis nei kiti elektrocheminiai jutikliai (Duan ir kt., 2013).

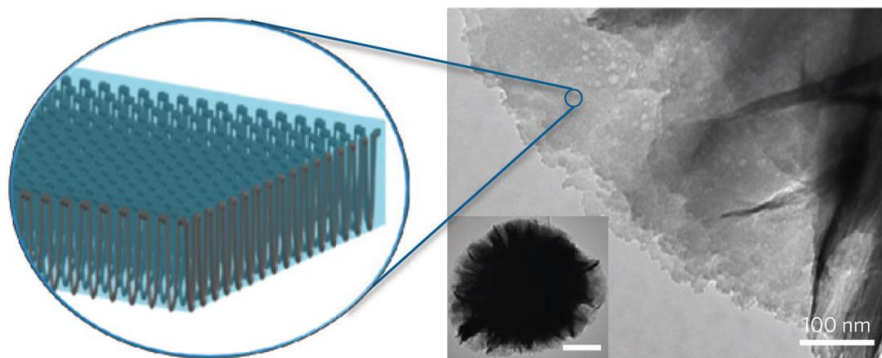
#### 1.4.4. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės dengtos nukleorūgštimis

Baltymais dengtos dalelės dažniausiai yra ruošiamos maišant baltyminių tirpalą su druskų tirpalais. Nanodalelės susidaro baltymams kristalizuojantis kartu su druskomis. Neorganinės nanodalelės, dengtos nukleorūgštimis, irgi gali būti ruošiamos maišant nukleorūgščių tirpalą su druskų tirpalu (nepublikuoti dr. Vaidoto Kiseliovo duomenys). Tačiau literatūroje taip pat yra pavyzdžių, kai RNR ar DNR sintezė ir gėlės žiedlapį primenančios dalelės kristalizavimas vyksta tuo pačiu metu.

#### 1.4.4.1. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš magnio ir RNR

Mokslininkų grupė iš Kinijos paruošė magnio ir RNR daleles (Lee ir kt., 2012). Šių dalelių ruošimas buvo pradėtas nuo viengrandės DNR molekulės, kurios galai buvo komplementarūs pradmeniui, turinčiam T7 RNR polimerazės promotoriaus seką. Prilydant pradmenį, DNR molekulė buvo sulenkta į žiedą ir sujungta panaudojant T4 DNR ligazę. Šis kompleksas, žiedinė DNR molekulė su pradmeniu, buvo panaudota kaip matrica T7 RNR polimerazei. Susintetintos viengrandės RNR molekulės kondensavosi kartu su magnio pirofosfatu į gėlės žiedlapį primenančias daleles.

Optinės poliarizacijos mikroskopijos pagalba buvo nustatyta, kad gautos dalelės pasižymi dveju šviešos laužimu (*angl.* birefringence). Ši savybė yra būdinga kristalams. Taip pat buvo nustatyta, kad šios dalelės yra stabilios iki 150°C. Remiantis šiais įrodymais, buvo padaryta išvada, kad dalelėje esanti RNR turėtų būti kristalinėje formoje (1.15. pav.). Viena gėlės žiedlapį primenanti dalelė gali turėti iki  $1 \times 10^5$  siRNR kopijų. Šios dalelės buvo sumaišytos su polietileniminu, suteikiančiu dalelėms teigiamą krūvį, ir įšvirkštos į pelės vėžinį audinį, ekspresuojantį jonvabalio liuciferazę. Po keturių dienų jonvabalio liuciferazės raiška buvo žymiai sumažinta dėl RNR interferencijos.



**1.15. pav.** Gėlės žiedlapį primenančių dalelių iš magnio RNR TEM nuotrauka ir schematinis atvaizdavimas galimos RNR kristalinės struktūros. Skalė įklijoje lygi 500 nm. (Lee ir kt., 2012)

Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš RNR ir magnio gali būti ruošiamos atliekant RNR sintezę nuo žiedinės DNR. T7 RNR polimerazė vykdo grandinės sintezės reakciją, kurios šalutinis produktas yra pirofosfatas. Jis

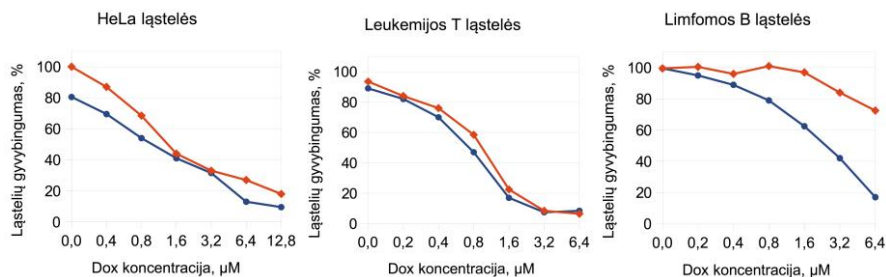
kristalizuojasi kartu su magniu ir sudaro  $Mg_2P_2O_7 \times 3,5H_2O$  ir RNR kompleksą. Nukleorūgštis sudaro ~15 – 21 % (w/w) dalelės masės. Remiantis anglies išsidėstymu, buvo nustatyta, kad RNR dalelėje yra išsidėščiusi magnio pirofosfato lakštų paviršiuje. Šios dalelės taip pat buvo sumaišytos su linijiniu polietileniminu ir panaudotos ląstelių transfekcijai. siRNR seka slopino eGFP baltymo ekspresiją (Shopsowitz ir kt., 2014).

#### *1.4.4.2. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš magnio ir DNR*

Magnio pirofosfato dalelės dengtos DNR įvairiose studijose vadinamos skirtingai. 2010 m. publikuotas darbas šias daleles vadina DNR nanorutuliuokais (*angl.* DNA nanoballs). Literatūroje aprašytame darbe DNR dalelės buvo ruošiamos atliekant RCA reakciją, dar žinomą kaip riedančio rato padauginimo reakcija. Tačiau prieš vykdant šią reakciją, DNR buvo liguojama 9 kartus ir įterpiamos 4 komplementarios sekos. Buvo manoma, kad DNR grandinė turi turėti komplementarias sekas dalelių susidarymui. Taip paruoštos dalelės buvo išrikiuojamos minkštosios litografijos pagalba paruoštoje mikrogardėlėje. Šiuo metodu paruoštų dalelių dydis buvo ~300 nm (Drmanac ir kt., 2010).

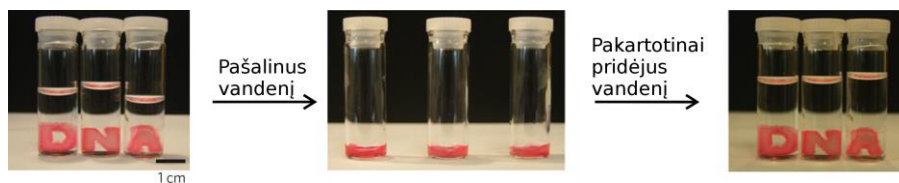
Kitos grupės ruošė gėlės žiedlapį primenančias daleles iš DNR naudojamos tą pačią RCA reakciją, tačiau jų DNR neturėjo specialiai įterptų palindrominių sekų. Dalelės susidarydavo ir be papildomų komplementarių sekų įterpimo. Sekos įtaka dalelių susidarymui buvo papildomai tiriama pakeičiant visus galimus nukleotidus į deoksiadenoziną. Nuo šios sekos gautos dalelės buvo 2,5 karto didesnės. Šis rezultatas buvo aiškinamas tuo, kad silpniau sujungtos DNR molekulės grandinės sukuria mažiau pasipriešinimo fermentui, bei tuo, kad silpnesnė grandinių tarpusavio hibridizacija lemia laisvesnį DNR susipakavimą dalelėje. Taip pat buvo pastebėta, kad dalelių dydį galima kontroliuoti parenkant reakcijos laiką: 10 h reikia norint gauti ~200 nm dydžio daleles ir 30 h – norint gauti 4 μm dydžio daleles (Zhu ir kt., 2013). Atliktame darbe dalelės buvo funkcionalizuotos fluorescuojančiais pradmenimis, fluorescuojančiais nukleotidais, scg8 aptameru ir vaistą surišančia seka. Fluorescuojantys pradmenys ir nukleotidas padėjo geriau matyti dalelių patekimą į ląsteles. Scg8 aptameras yra specifiskas PTK7 baltymui, kuris yra stipriai ekspresuojamas kai kuriose vėžinėse ląstelėse (Shangguan ir kt., 2006, Shangguan ir kt., 2008). Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš DNR buvo įsotintos doksorubicino (chemoterapinis vaistas) ir inkubuotos su sgc8 specifinėmis HeLa ir T leukemijos ląstelėmis bei su sgc8 nespecifinėmis B

limfomos ląstelėmis (1.16. pav.). Taip buvo parodyta, kad DNR dalelės gali būti panaudotos kaip vaisto nešiklis.



**1.16. pav.** Ląstelių gyvybingumo tikrinimas, jas paveikus doksorubicinu ištirpintu tirpale (mėlyna linija) ir doksorubicinu pernešamu DNR molekule, esančia ant gėlės žiedlapį primenančių dalelių paviršiaus (raudona linija) (Zhu ir kt., 2013)

Dažniausiai gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš DNR yra ruošiamos naudojant phi29 DNR polimerazę ir atliekant RCA reakciją. Pradinė medžiaga yra viengrandė žiedinė DNR molekulė, turinti vieną pradmenį. Tačiau jei iš pradžių vykdoma įprasta RCA reakcija 2 - 4 h, o po to tęsiama mpRCA reakcija dar 16 - 24 h, tai gaunamas hidrogelinė struktūra (Lee ir kt., 2012). Remiantis tik reologiniais matavimais medžiaga būtų laikoma geliu. Tačiau perkėlus medžiagą į skystį, ji turi formą tarsi būtų kietas kūnas, o pašalinus skystį medžiaga elgiasi lyg būtų skystis, t. y. teka (1.17. pav.). Ši savybė buvo panaudota sukuriant vandeniu reguliuojamą elektros jungiklį. Į hidrogelį buvo pridėta 10 nm aukso nanodalelių. Be vandens hidrogelis išsitempdavo ir sudarydavo elektrinį kontaktą. Pridėjus vandens, tas pats hidrogelis susitraukdavo iki trumpesnės formos ir elektros tekėjimas buvo nutraukiamas.

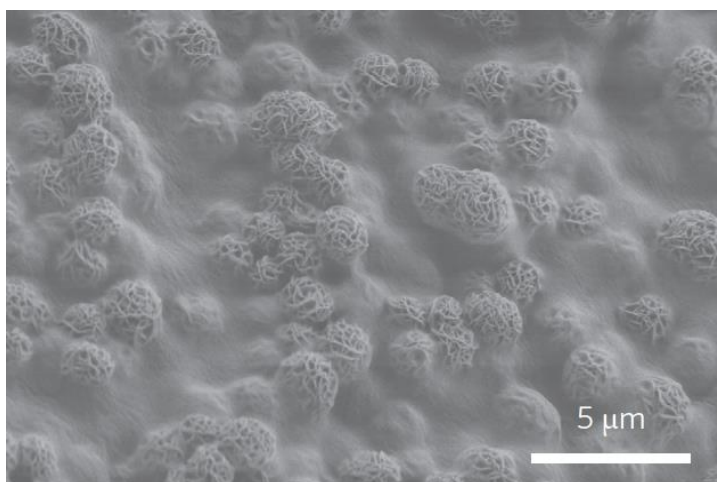


**1.17. pav.** DNR hidrogelis. Hidrogelis buvo sintetintas „D“, „N“ ir „A“ raidžių formose. Skystyje laikomas gelis išlaiko formą, o pašalinus vandenį gelis tampa takus tarsi skystis. Vėl pridėjus vandens, gelis grįžta į pradinę formą (Lee ir kt., 2012).



Tyrinėjant hidrogelio SEM nuotraukas, yra matomos gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš magnio pirofosfato ir DNR įsitvirtinusios DNR vijų tinkle (1.18. pav.). Autoriai pačias daleles vadina DNR paukščio lizdu (*angl.* DNA bird nest).

Gėlės žiedlapį primenančios dalelės susilaukia vis daugiau dėmesio. Didelis paviršiaus plotas ir mikroporėtumas suteikia puikias galimybes panaudoti jas fermentų pernešimui. Pačios dalelės yra paruoštos iš netoksiško metalo, todėl irdamos neterš aplinkos. Šios dalelės ne tik neterš aplinkos, tačiau magnio pirofosfatas ir nukleorūgštys yra puikiai suderinamos su biologinėmis sistemomis. NR dekoruotas daleles galima lengvai pritaikyti kitai užduočiai, tam tereikia pakeisti nukleotidų seką ir galima naudoti tą patį ruošimo metodą.



**1.18. pav.** Hidrogelis iš DNR dalelių ir DNR. Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš DNR yra įsitvirtinusios DNR tinkle (Lee ir kt., 2012).

Gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš magnio pirofosfato ir DNR gali būti paruoštos ne tik RCA reakcijos metu. Neseniai šios dalelės buvo pirmą kartą paruoštos mpRCA metodu (Galiniš ir kt., 2016). Skirtingai nuo kitų darbų, šiame metode DNR buvo amplifikuojama mikroskysčių lašeliuose parenkant tokias sąlygas, kad reakcijos metu viena dalelė susidarytų iš vienos DNR molekulės. Išgrynintos dalelės buvo pakartotinai inkapsuliuotos lašeliuose, turinčiuose *in vitro* transkripcijai ir translacijai būtinus komponentus. Taip buvo parodyta, kad gėlės žiedlapį primenančios dalelės iš magnio pirofosfato ir DNR, gali būti panaudotos *in vitro* baltymų sintezei

mikroskopsčių lašeliuose (Galiniš ir kt., 2016). Kiek mums yra žinoma, tai yra pirmas kartas, kai pavienės DNR molekulės buvo panaudotos dalelių sintezei. Taip pat tai yra pirmas kartas, kai gelės žiedlapį primenančios dalelės iš DNR yra panaudotos kaip matrica baltymų sintezei *in vitro*. Nors šiuo metu yra sukurta įvairių metodų kryptingai baltymų evoliucijai *in vitro*, tačiau dauguma esamų metodų dažnai yra apsunkinti papildomų žingsnių: DNR padauginimo, mikrorutuliukų pridėjimo ar lašelių suliejimo. Mūsų sukurtas metodas yra paprastesnis lyginant su kitais metodais. Nereikia papildomo mikroskopsčių modulio, skirto sulieti kelis skirtingus lašelius. Taip pat mūsų metodas nereikalauja papildomo darbo su mikrorutuliukais: jų paruošimo ar optimalaus kiekio nustatymo, ką tenka daryti kituose metoduose (Kojima ir kt., 2005, Paul ir kt., 2013). Vieno žingsnio metu yra padauginama DNR ir padaromos dalelės, prie kurių DNR yra jau pritvirtinta. Šis paprastas metodas paversti pavienes DNR molekules į daleles (turinčias tūkstančius kopijų pradinės DNR matricos) ir panaudoti šias daleles baltymų sintezei, gali ženkliai prisidėti prie *in vitro* evoliucijos metodų tobulinimo.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos, priemonės ir prietaisai

#### 2.1.1. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai:

Automatiniai tūrio dozatoriai: P2N, P10N, P20N, P100N, P200N ir P1000N (Gilson);

Centrifugos: J2-21 (Beckman), 5430 R ir 5810 R (Eppendorf), stalinė centrifuga „Grant-bio PCV-2400“ (Grant Instruments (Cambridge)), stalinė centrifuga Prism™ Mini (Labnet), dengimo fotorezistu centrifuga WS-650-23NPP (Laurell Technologies);

Desikatorius (Nalgene);

Fluorescencinės apšvietimo sistemos: X-Cite® 120PC (Lumen Dynamics), gyvsidabrinis šviesos šaltinis fluorescencijai „Nikon intensilight C-HGFI“ (Nikon);

Gelių fotografavimo sistema MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems);

Horizontalus elektroforezės aparatas, jo priedai ir srovės šaltinis PowerPac Basic (Bio-Rad);

Infraraudonųjų spindulių termometras MS6520B (Mastech);

Kaitinimo elementai: plokštė „PC-600D“ (Corning), FB15103, FB15101 ir Mini Dry Bath (Fisher Scientific);

Kaukių lygiavimo ir UV apšvitos prietaisas MJB3 (Süss Microtec);

Mikrobangų krosnelė GE711K (SAMSUNG);

Mikroplokštelių skaitytuvai: Synergy H4 (BioTek Instruments), Varioskan™ Flash Multimode Reader (ThermoScientific);

Mikroskopai: inversiniai optiniai mikroskopai „Eclipse Ti“ (Nikon) ir Olympus IX70 (Olympus), stereomikroskopas „SMZ445/SMZ460“;

Oriniai inkubatoriai: IB-01E (Medline Scientific), Memmert (Memmert), orinis inkubatorius Термостат (Одесский экспериментальный завод), Heratherm IGS60 (ThermoScientific);

Paviršių aktyvavimo plazma aparatas „Plasma system FEMTO“ (Diener electronic);

Peršviečiamas elektroninis mikroskopas: Morgagni 268 (FEI);

PGR aparatai: Mastercycler ir Mastercycler gradient (Eppendorf);

Profilometras Dektak® 6M (Veeco Instruments);

Programinė įranga: sekų redagavimo ir atvaizdavimo programos SerialCloner 2.6.1 (2004-2013, Franck Perez) ir Vector NTI 10.0.1 (2005 Invitrogen Corporation); spektrofotometro valdymo programa NanoDrop 2000/2000c Software (Thermo Fisher Scientific, Inc.), paveikslėlių redagavimo programa GIMP 2.8.6, paveikslėlių analizės programa ImageJ 1.50i (Nacionalinis sveikatos institutas, JAV), gelių analizės programa GelAnalyzer 2010a (dr. Istvan Lazar), biuro programų paketas Apache OpenOffice 4.1.3, brėžinių ruošimo programa AutoCAD Mac 2013, kameros valdymo ir paveikslėlių analizės programa NIS-Elements Nikon Imaging Software 4.0, video kameras valdanti įranga Phantom Camera Control 2.12.725.0 ir VimbaViewer 1.1.3, GelCaptureMiniBIS;

Skaitmeninės kameros: „AVT Guppy“ F033C ir F033B (Allied Vision Technologies), EMCCD technologijos kamera iXon (Andor), greitaeigė vaizdo kamera „Phantom v7.3“ (Vision Research), 1,5 MP mikroskopo kamera „Nikon Digital Sight DS-U3“ (Nikon);

Stalinės maišyklės Orbit™ LS ir Vortex Mixer S0200 (Labnet) ir purtyklė „Vortex-Genie 2“ (Scientific Industries);

Svarstyklės: KERN 770 ir 440-45N (KERN & Sohn), Scout (OHAUS);

Švirkštų pompos: „Harvard Apparatus PHD 2000 Infusion“, „Harvard Apparatus PHD Infuse/Withdraw“, „Harvard Apparatus PHD ULTRA“ (Harvard Apparatus);

UV šaltinis (Cell Biosciences);

Vakuuminės pompos Gast ir Pfeiffer Vacuum;

Vertikali laminarinio srauto spinta „Telstar Mini V/PCR“ (Telstar).

## 2.1.2. Priemonės

Apskritos poliruotos silicio plokštelės 100 mm ir 76 mm diametro ir 525 μm storio (Siltronix), mikroskopiniai stikliukai 75 × 50 mm ir 0,96 - 1,06 mm storio (Corning), hemocitometras, PTFE šlangelės 0,3 mm vidinio ir 0,76 mm išorinio skersmens (Adtech Polymer Engineer), 384 šulinėlių mikroplokštelė: mažo tūrio, nesterili, neadsorbuojančio paviršiaus padengimo, juodos plastmasės (#3544, Corning), švirkštai:

- 1 ml Omnifix®-F1 ml (BRAUN);
- 1 ml, 1001 TLL SYR (HAMILTON);

adatos (TERUMO):

- Neolus 0,4 x 16 mm 27G x 5/8”;
- Neolus 0,6 x 25 mm, 23G x 1”;

mėgintuvėliai:

- 0,2 ml PGR (ThermoScientific);
- Plus (Nerbe);
- MAXIMUM RECOVERY (Axygen);
- Protein LoBind ir DNA LoBind (Eppendorf);

TEM gardelės:

- 100 formvaro/anglies plėvele dengti 400 akių vario tinkleliai (QUANTIFOIL);
- anglimi dengti 200 akių vario tinkleliai (Pyser-SGI Limited).

#### 2.1.2.1. Mikrogardelės

Darbe naudota mikrogardelė ir jos bendrasis brėžinys yra pavaizduoti literatūros dalyje (1.10. pav.). Naudotų gardelių išmatavimai ties emulsifikavimo jungtimi pavaizduoti to paties paveikslėlyje.

#### 2.1.3. Reagentai

Acetonas ( $\geq 99,8$  %, SigmaAldrich);  
 Agaras (Merck);  
 Agarozė (Lonza);  
 CaCl<sub>2</sub> (AppliChem);  
 EA1 ir EA2 surfaktantai (Mikrotechnologijų sektorius, BTI);  
 Etanolis ( $\geq 99,8$  %, SigmaAldrich; 96 %, Vilniaus degtinė);  
 FC-40 (3M Novec);  
 HFE-7500 (3M Novec);  
 Izopropanolis ( $\geq 99,5$  %, SigmaAldrich);  
 Kanamicino sulfatas (CarlRoth);  
 Lengva mineralinė alyva (SigmaAldrich);  
 MgCl<sub>2</sub> (AcrosOrganics);  
 Mielių ekstraktas (Oxoid);  
 NaCl (CalBiochem);  
 NH<sub>4</sub>OAc (CarlRoth);  
 PFO (97 %, SigmaAldrich);  
 Poloxamer 407 (SigmaAldrich);  
 Triptonas (Fisher Chemical);  
 Tris (CarlRoth, Merck);  
 Vanduo be nukleazių (ThermoFisher Scientific);  
 Žemo lydymosi taško agarozė (ThermoFisher Scientific; # V2111 Promega).

#### 2.1.4. Komerciniai rinkiniai

*In vitro* transkripcijos ir translacijos rinkiniai: Expressway Cell-Free *E.coli* sintezės sistema ir New England Biolabs (NEB) PURExpress *in vitro* baltymų sintezės rinkinys. Plazmidžių gryninimo rinkiniai iš ThermoFisher Scientific „GeneJET Plasmid Miniprep“ ir iš Zymo Research „Plasmid Miniprep™ - Classic“. Silikono ruošimo rinkinys „SYLGARD® 184 silicone elastomer kit“ iš Dow Corning.

#### 2.1.5. Fermentai

Iš ThermoFisher Scientific: phi29 DNR polimerazė, RiboLock ribonukleazių inhibitorius, XagI ir HindIII restrikcijos endonukleazės. Iš New England Biolabs: phi29 DNR polimerazė, β-agarazė I, pelių RNazių inhibitorius, BanII restrikcijos endonukleazė.

#### 2.1.6. Tirpalai

##### 2.1.6.1. DNR padauginimo reakcija:

Iš ThermoFisher Scientific:

2 mM ir 10 mM dNTP mišinio tirpalas;

10 X phi29 DNR polimerazės buferis: 330 mM Tris-Ac (pH 7,9 37°C), 100 mM MgAc, 660 mM KAc, 1 % (v/v) Tween 20, 10 mM DTT.

Iš New England Biolabs:

10 X phi29 DNR polimerazės buferis: 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 mM DTT, pH 7,5 25°C.

##### 2.1.6.2. DNR elektroforezės buferiai ir tirpalai:

Iš New England Biolabs:

Gel Loading Dye Blue (6 X), kai 1 X tirpalas: 2,5 % Ficoll®-400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,017 % SDS, 0,015 % bromfenolio mėlynasis, pH 8,0 25°C;

Gel Loading Dye Purple (6 X), kai 1 X tirpalas: 2,5 % Ficoll®-400, 10 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,08 % SDS, 0,02 % dažo 1, 0,0008 % dažo 2, pH 8,0 25°C;

Iš ThermoFisher Scientific:

1 X TAE buferis: 40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA, pH 8,4 (ruošiamas iš 50X TAE);

6 X Loading Dye tirpalas: 10 mM Tris-HCl, 0,03 % bromfenolio mėlynasis, 0,03 % ksilenocianolis FF, 60 % glicerolis, 60 mM EDTA, pH 7,6;

#### *2.1.6.3. Kompetentinių ląstelių ruošimui ir kultivavimui skirti tirpalai:*

„Na“ tirpalas: 5 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0;

„Ca“ tirpalas: 5 mM Tris-HCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0.

Luria-Bertani (LB) terpė: 1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl, pH 7,0;

Luria-Bertani (LB) agarizuota terpė: 1,2 % agaras 1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl, pH 7,0.

#### *2.1.6.4. Kiti tirpalai:*

1 X R buferis: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA (ThermoFisher);

1 X CutSmart buferis: 50 mM KAc, 20 mM Tris-Ac (pH 7,9 25°C), 10 mM MgAc<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml BSA (NEB);

Neigiami fotorezistai SU8-2007 ir SU8-2015 (MicroChem);

Fotorezisto ryškalas mr-Dev 600 (Micro resist technology);

2 % (w/v) EA1 HFE-7500 alyvoje;

BSA 10 mg/ml (NEB);

Poloksameras 407 10 % (w/v) (Life Technologies);

10 mg/ml etidžio bromidas (CarlRoth);

Aquapel stiklo apdorojimo priemonė (Pittsburgh Glass Works);

10 X β-agarazės buferis: 10 mM Bis-Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 6,5 25°C (NEB);

5 M NH<sub>4</sub>Ac;

10 mM Tris buferis pH 8,5;

13,3 mM CaCl<sub>2</sub>;

10 μM FDG (ThermoFisher Scientific);

10 000 X SYBR Safe (ThermoFisher Scientific);

10 000 X SYBR Green I (ThermoFisher Scientific);

5 mM SYTO 84 fluorescencinis, oranžinis nukleorūgščių dažas (ThermoFisher Scientific);

SYTO 84 dažymo tirpalas: 10 μl 5 mM SYTO 84 sumaišoma su 390 μl HFE7500 alyva, turinčia 2 % (w/v) EA1;

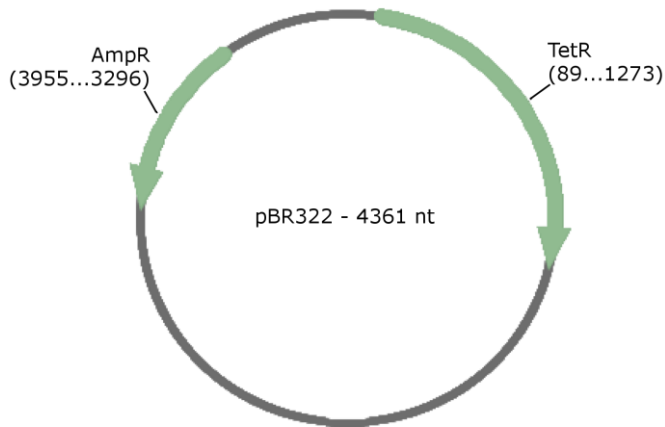
SYBR Green dažymo tirpalas: HFE7500 alyva, 2 % (w/v) EA1 surfaktantas, 100 X SYBR Green;

FDG analizės buferis: 1 X phi29 buferis (NEB), 1,1 μM FDG;  
Dalelių dažymo tirpalas: 1 X phi29 buferis (NEB), 10 X SYBR Green I.

### 2.1.7. Nukleorūgštys

Darbe naudotos plazmidės:

- pBR322 (ThermoFisher Scientific, 2.1. pav.);
- pET-29b(+)\_EGFP (Sabine Studer, 2.2. pav.);
- pIVEX2.2EM-lacZ-his (Greta Stonytė, 2.3. pav.).



**2.1. pav.** pBR322 plazmidės schema. AmpR – genas, koduojantis baltymą lemiantį šių plazmidžių padauginimui naudojamų *E.coli* ląstelių atsparumą ampicilinui, TetR – genas, koduojantis baltymą lemiantį šių plazmidžių padauginimui naudojamų *E.coli* ląstelių atsparumą tetraciklinui. Skaičiai skliausteliuose nurodo sąlyginę vietą sekoje.

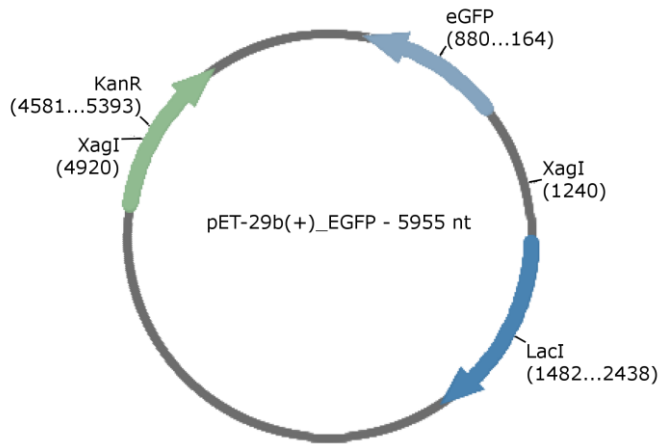
Kitos nukleorūgštys:

- Egzonukleazėms atsparūs atsitiktiniai pradmenys, 6 nt, 500 μM (3' gale dvi bazės yra prijungtos fosfotioatine jungtimi) (Microsynth);
- DNR masės žymenys (New England Biolabs):
  - 1 kb DNA Ladder;
  - 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb).

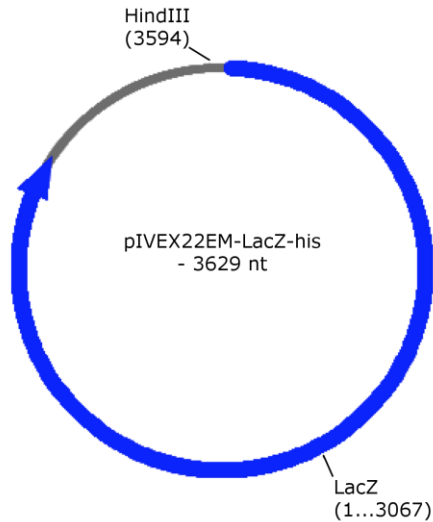
### 2.1.8. *E. coli* kamieniai

**XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)].





**2.2. pav.** pET-29b(+)\_EGFP plazmidės schema. eGFP – geno seka koduojanti žaliai fluorescuojantį baltymą, XagI – XagI restrikcijos endonukleazės atpažįstamos sekos, LacI – seka koduojanti *lac* promotoriaus aktyvumą slopinantį baltymą, KanR – genai, koduojantys baltymus lemiančius šių plazmidžių padauginimui naudojamų *E.coli* ląstelių atsparumą kanamicinui. Skaičiai skliausteliuose nurodo sąlyginę vietą sekoje.



**2.3. pav.** pIVEX22EM-LacZ-his plazmidės schema. LacZ – geno seka koduojanti β-galaktozidazės baltymą, HindIII – HindIII restrikcijos endonukleazės atpažįstama seka. Skaičiai skliausteliuose nurodo sąlyginę vietą sekoje.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Terpės ruošimas ir ląstelių auginimas

Medžiagos LB ir LB agarizuotos terpės gaminimui nurodytos 2.1.6.3 skyriuje. LB terpėje auginama biomasė, o LB agarizuota terpė naudojama Petri lėkštelių ruošimui. Reikiami medžiagų kiekiai sudedami į kolbą ir ištirpinami reikiamame vandens tūryje. Po to indai su tirpalais 40 min. autoklavuojami 1 atm slėgyje. Ląstelės užsėjamos į LB terpę nuo kolonijos Petri lėkštelėje naudojant sterilią kilpelę arba lazdelę. Jei bus auginamos ląstelės turinčios atsparumą antibiotikui, tai jo pridama į terpę jai atvėsus po autoklavavimo. Agarizuota LB terpė po autoklavavimo irgi yra atvėsinama iki ~45-50°C, įdedama antibiotiko ir išpilstoma į lėkšteles. Tiek ruošiant LB terpę, tiek LB agarizuotą terpę buvo naudojamas kanamicinas 50 mg/ml. Prieš naudojant, Petri lėkštelės su agarizuota terpe džiovinamos laminarinėje spintoje ~15-20 min.

### 2.2.2. Kompetentinių ląstelių ruošimas ir transformavimas

Ląstelės užsėjamos į 3 ml LB terpės ir auginamos ~2 h 37°C, kol pasiekia eksponentinę augimo stadiją (optinis tankis 0,5 - 0,8, kai bangos ilgis 600 nm). Mėgintuvėliai su ląstelėmis perkeliama į ledo vonią ir toliau dirbama šaltai. Visos centrifugavimo procedūros atliekamos šaltai 5 min, 2000 g, Eppendorf 5810R centrifuga. Ląstelės nucentrifuguojamos, supernatantas pašalinamas, o centrifugatas užpilamas ~1,5 ml „Na“ tirpalo. Ląstelės resuspenduojamos „Na“ tirpale ir inkubuojamos 10 min. Vėl centrifuguojama, supernatantas pašalinamas, o ląstelės užpilamos ~1,5 ml „Ca“ tirpalo. Ląstelės resuspenduojamos ir inkubuojamos 30 min. Toliau seka dar vienas centrifugavimo etapas, po kurio supernatantas pašalinamas dalinai, paliekant keletą lašų „Ca“ tirpalo. Įdedama transformuojamos DNR (nuo 1 iki 10 ng) ir mišinys, po resuspendavimo laikomas lede 20 min. Ląstelėms sukeliama temperatūrinis šokas: jos perkeliama 2 min į 42°C ir grąžinama atgal į ledo vonią 2 min. Po to ląstelės yra gaivinamos, t.y. į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 1,4 ml švarios LB terpės ir inkubuojama 37°C purtyklėje 1 valandą. Ląstelės centrifuguojamos šiltai ir išsėjamos Petri lėkštelėje su antibiotiku. Po to jos auginamos lėkštelėse ~16 - 18 h 37°C.

### 2.2.3. DNR gryninimas iš ląstelių kultūros

Surenkama ląstelių kolonija nuo Petri lėkštelės arba naudojamas naktinės ląstelių kultūros centrifugatas ir gryninama naudojant GeneJET™ Plasmid

Miniprep kit arba Zymo Research Plasmid Miniprep™ - Classic rinkinį. Dirbama pagal gamintojo rekomendacijas. Tik DNR užnešimo ant kolonėles žingsnis buvo kartojamas du kartus siekiant padidinti išeigą.

#### 2.2.4. Glicerolio kultūros ruošimas

Po transformavimo pET29b(+)\_EGFP plazmide pasirenkamos kelios kolonijos Petri lėkštelėje ir steriliai užsėjamos į mėgintuvėlius, turinčius 5 ml sterilios LB terpės ir 50 µg/ml kanamicino. Ląstelės auginamos per naktį 37°C temperatūroje purtant 220 apsisukimų per minutę greičiu. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 30 sekundžių 13500 apsisukimų per minutę greičiu ir DNR iš ląstelių kultūros gryninama naudojant komercinį rinkinį. Atliekama restrikcinė analizė. Analizės metu yra patvirtinama, kurios kolonijos po transformavimo turi pET29b(+)\_EGFP plazmidę. Tuomet tos pačios kolonijos yra steriliai užsėjamos į 1 ml LB terpės su 50 µg/ml kanamicino ir auginamos per naktį 37°C temperatūroje purtant 220 apsisukimų per minutę greičiu. 500 µl ląstelių suspensijos sumaišoma su 125 µl 80 % sterilaus glicerolio ir gautas tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai perkeliama į šaldymui į -80°C.

#### 2.2.5. Restrikcinė analizė

Naudojant programinę įrangą SerialCloner yra pasirenkama restrikcijos endonukleazė, kuri kerpa pET29b(+)\_EGFP plazmidę keliose vietose, pavyzdžiui AvaI (2 taikiniai) arba BanII (5 taikiniai). Ta pačia programa yra sugeneruojami teoriniai karpymo rezultatai su pasirinkta restrikcijos endonukleaze. Tuomet yra atliekamas eksperimentas, kuriame išgryninta plazmidė yra karpoma pasirinkta restrikcijos endonukleaze, pagal gamintojo rekomendacijas. Gauti produktai analizuojami 1 % agarozės gelyje ir lyginami su programos pateiktais rezultatais. Jei teorinė ir praktinė restriktogramos atitinka, yra laikoma, kad pavyko išgryninti pET29b(+)\_EGFP plazmidę.

#### 2.2.6. DNR elektroforezė

DNR mėginys maišomas su 6 X užnešimo dažu iki 1 X koncentracijos ir perkeliama į šulinėlius agaroziniame gelyje. Gelis ruošiamas iš agarozės (1 % (w/w)), 1 X TAE buferio ir EtBr (0,5 µg/ml). Elektroforezė vykdoma 1 X TAE buferyje, turinčiame 0,5 µg/ml EtBr, 1 valandą 10 V/cm režimu. Gautas rezultatas užfiksuojamas fotografavimo sistema MiniBIS Pro ir analizuojamas GelAnalyzer 2010 programine įranga.

### 2.2.7. DNR koncentracijos nustatymas

DNR koncentracija mėginyje nustatoma naudojant NanoDrop spektrofotometrą. Matavimo metu yra laikoma, kad 50 µg/ml DNR tirpalo sugertis yra lygi 1 ( $\lambda = 260$  nm). Prieš matavimą prietaisas yra sukalinuojamas naudojant buferinį tirpalą be DNR.

Kitas metodas DNR koncentracijos nustatymui yra pagrįstas densitometrija. Atliekama DNR elektroforezė agarozės gelyje. Keliuose šulinėliuose yra naudojamas žinomas kiekis DNR masės standarto. Į kitus šulinėlius yra užnešami skirtingi kiekiai nežinomos DNR koncentracijos tirpalo. Atlikus elektroforezę, gelis yra fotografuojamas fotografavimo sistema MiniBIS Pro ir analizuojamas programa GelAnalyzer 2010a. Analizė prasideda nuo takelių išskyrimo ir DNR juostelių nustatymo. Tuomet yra pašalinamas foninis signalas ir DNR masių standarto juostelės yra naudojamos kalibracinės kreivės sudarymui. Naudojantis kalibracinės kreivės lygtimi yra nustatomas nežinomos DNR kiekis. Išgrynintos plazmidės koncentracija būdavo 50 – 100 ng/µl.

### 2.2.8. Mikrogardelių gamyba

Mikrogardelės gamyba susideda iš dviejų etapų: liejimo formos ruošimo ir mikrogardelės gamybos.

#### **Liejimo formos gamyba**

Šiame darbe naudotos mikrogardelių liejimo formos buvo pagamintos Paryžiaus ESPCI technikos universitete, profesoriaus Andrew Griffiths laboratorijoje. Pirmiausia yra paruošiamas mikrogardelės kanalėlių brėžinys su AutoCAD programine įranga ir užsakomas jo spausdinimas aukštos raiškos spausdintuvu (atlikta Selba S.A įmonėje). Gaunamas juodas spausdinys ant skaidraus plastiko, kuris vėliau, gamybos procese, bus naudojamas kaip kaukė atrankiai praleisti UV šviesą.

Liejimo formos gamyba pradedama nuo silicio plokštelės paruošimo. Silicio diskas yra inkubuojamas ant kaitinimo plytelės 200°C temperatūroje bent 10 minučių, kad būtų pašalinta visa drėgmė. Tuomet jis perkeliamas į dengimo fotorezisto centrifuga ir užpilama šiek tiek SU8-2007 arba SU8-2015 fotorezisto. SU8-2007 fotorezistas buvo naudojamas, kai pageidaujamas kanalėlių aukštis turėjo būti ~10 µm, o SU8-2015 – ~20 µm. Centrifugoje substratas iš pradžių sukamas 500 apsisukimų per minutę greičiu. Po to sukimas tęsiamas dar 30 sekundžių apie 1700 apsisukimų per minutę greičiu (kiekvienam fotorezistui greitis parenkamas remiantis

gamintojo rekomendacijomis, detaliau žiūrėti 2.1 lentelę). Iš padengto fotorezisto yra pašalinamas tirpiklis, silicio substratą iš pradžių inkubuojant 65°C, o po to 95°C. Inkubavimo laikas priklauso nuo naudojamo fotorezisto (2.1 lentelė). Ant sustingusio fotorezisto, spausdiniu žemyn, yra uždedama kaukė ir visas substratas perkeliama į kaukių lygiavimo prietaisą MJB3. Kauke neuždengti fotorezisto plotai yra apšvitinami UV šviesa, kuri inicijuoja chemines jungimosi reakcijas ir apšviestos fotorezistos dalys tampa netirpios. Po švitinimo substratas su fotorezistu dar kartą kaitinamas 65°C ir 95°C. Po to nepolimerizuotas fotorezistas pašalinamas plaunant silicio plokštelę mr-Dev 600 ryškale, o silicio substratas nusausinamas suslėgto oro srove. Visas substratas plaunamas izopropanoliu ir nusausinamas oro srove. Detaliai visi procesai aprašyti 2.1. lentelėje.

**2.1. lentelė.** Detalios mikrogardelės liejimo formos ruošimo sąlygos

<b>Procesas</b>	<b>Charakteristika, kai naudojamas SU8-2007</b>	<b>Charakteristika, kai naudojamas SU8-2015</b>
Inkubavimas 200°C	> 10 min.	> 10 min.
Substrato sukimas	500 aps./min., 10 sek.	500 aps./min., 10 sek.
Substrato sukimas	1700 aps./min., 30 sek.	1715 aps./min., 30 sek.
Inkubavimas 65°C	2 min.	3 min.
Inkubavimas 95°C	3 min.	4 min.
UV apšvita	kietas kontaktas, 60 sek.	minkštas kontaktas, 12 sek.
Inkubavimas 65°C	1 min.	1 min.
Inkubavimas 95°C	4 min.	5 min.
Ryškinimas	3 min.	3 min.

Paruošta liejimo forma yra inkubuojamas 200°C 10 – 30 minučių. Gautų kanalėlių aukščiai yra įvertinami profilometru. Šiame darbe buvo naudotos dvi liejimo formos, kurių reljefinių detalių aukščiai buvo 11 µm ir 19 µm.

### **Mikrogardelės gamyba**

Skystas PDMS yra gerai sumaišomas su PDMS kietikliu ir užpilamas ant mikrogardelės liejimo formos. Užpilta forma yra vakuumuojama desikatoriuje, kol yra pašalinami visi oro burbulai. Liejimo forma su dar skystu silikonu yra perkeliama į 65°C orinį termostatą ir inkubuojama bent 2 valandas. Sukietėjęs silikonas yra išpjaunamas ir biopsijos adata yra praduriamos skylutės, kurios vėliau bus naudojamos reagentų įleidimui ir

emulsijos surinkimui. Paruoštas silikono antspaudas yra nuplaunamas izopropanoliu, išdžiovinamas ir kartu su švriu mikroskopiniu stikliuku įdedamas į degounies plazmos generavimo prietaisą. Paveikus abu paviršius plazma, paviršių cheminės grupės yra oksiduojamos ir paviršiai tampa hidrofiliški (Ferguson ir kt., 1991). Abejuose paviršiuose padaugėja –OH ir –Si–OH grupių (Morra ir kt., 1990), o sudėjus paviršius vieną prie kito, oksiduotos grupės reaguoja tarpusavyje taip sujungdami silikono antspaudą su stiklu kovalentinėmis siloksano (Si–O–Si) jungtimis (Duffy ir kt., 1998). Kad reakcija vyktų greičiau, mikrogardelė yra inkubuojama 65°C keletą minučių. Vėliau kanalai yra padengiami „Aqual“<sup>®</sup>, stiklo apdorojimo priemone. Priemonė yra išvirkščiamą į kanalėlius, inkubuojama ~15 sekundžių ir pašalinama kanalėlius prapučiant argono dujomis.

### 2.2.9. DNR kiekio skaičiavimas naudojant Puasono skirstinį

Emulsifikavimo metu visas reakcijos mišinys yra išskirstomas į atskirus lašelius. Po emulsifikavimo, reakcijos mišinyje esančios molekulės gali:

- likti lašelyje (vandens fazėje) – būdinga hidrofilinėms molekulėms;
- difunduoti į vandens ir alyvos interfazę – amfifilinėms molekulėms;
- pereiti į alyvą – fluorofilinėms molekulėms;
- emulsifikuotis micelėse – dažniausiai hidrofobinėms molekulėms (priklauso nuo naudojamo surfaktanto).

DNR molekulės yra hidrofilinės ir pasiskirsto į lašelius. Šis procesas geriausiai yra aprašomas Puasono skirstiniu (2.1 formulė). DNR molekulių pasiskirstymas dažniausiai nepriklauso nuo kitų molekulių pasiskirstymo ir yra atsitiktinis procesas. Taip pat šis procesas yra diskretus, t. y. į lašelį negali patekti dalis molekulės, nes jos yra hidrofilinės ir yra linkusios pilnai būti lašelyje.

$$P(k; \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$$

**2.1 formulė.** Puasono skirstinio formulė.

$\lambda$  yra vidutinis molekulių kiekis vienam lašeliui,  $e$  – Oilerio skaičius, lygus 2,718...,  $k$  yra į lašelius patekusių DNR molekulių skaičius, kuriam norime apskaičiuoti tikimybę, o  $k!$  - skaičiaus  $k$  faktorialas. Remiantis 2.1 formule, galima apskaičiuoti kokia yra tikimybė ( $P(k; \lambda)$ ), kad į lašelius

pateks tam tikras DNR molekulių skaičius. Kaip pavyzdį pateikiame DNR molekulių pasiskirstymą, kai vidutiniškai vienam lašeliui tenka viena molekulė (2.2 lentelė).

**2.2. lentelė.** DNR molekulių pasiskirstymas lašeliuose, kai  $\lambda = 1$ .

DNR molekulių skaičius lašelyje, vnt.	Lašelių dalis, turintį tokį DNR molekulių skaičių, %
0	36,8
1	36,8
2	18,4
3	6,1
4	1,5
$\geq 5$	0,4

#### 2.2.10. DNR padauginimas lašeliuose

DNR padauginimas lašeliuose buvo atliekamas naudojant phi29 DNR polimerazę. Įprasta reakcijos sudėtis yra pateikiama 2.3 lentelėje:

**2.3. lentelė.** DNR padauginimo reakcijos sudėtis

Komponentas	Galutinė koncentracija
Egzonukleazėms atsparūs 6nt ilgio pradmenys	50 $\mu$ M
Poloksameras 407	0,4 % (w/v)
DNR	0,3 – 6 pg/ $\mu$ L
Vanduo	-
dNTP (mišinys)	1 mM
phi29 DNR polimerazės buferis (NEB)	1 X
phi29 DNR polimerazė	0,8 U/ $\mu$ L

Skirtinguose eksperimentuose buvo naudojamas skirtingas DNR kiekis, kuris svyruodavo nuo  $\lambda = 0,1$  iki  $\lambda = 2$  (žr. 2.2.9 skyrelį). Reakcija buvo ruošiama laminarinėje spintoje. Egzonukleazėms atsparūs pradmenys, poloksameras 407, DNR ir vanduo buvo sumaišoma „Eppendorf DNA LoBind“ mėgintuvėliuose ir inkubuojami 95°C nuo 30 iki 60 sekundžių. Tuomet mėgintuvėlis perkeliamas ant ledo ir paliekamas keletą minučių

atvėsti. Sudedami likę komponentai, t. y. buferis, dNTP mišinys ir polimerazė.

Rezultatų dalyje yra paminėta, kad DNR padauginimo eksperimentai buvo atlikti kitomis sąlygomis, nei aprašyta aukščiau (t. y. kitos komponentų koncentracijos ar reakcijos paruošimo būdas.

Paruošta reakcija buvo emulsifikuojama ir surenkama, kaip tai aprašyta 2.2.12 skyrelyje. Surinkta emulsija buvo perkeliama į 30°C orinį termostatą ir inkubuojama 15-17 valandų. Po DNR padauginimo phi29 DNR polimerazė inaktyvuojama karščiu: 65°C 10 minučių.

#### 2.2.11. *In vitro* transkripcija ir transliacija

Darbe naudoti du *in vitro* transkripcijos ir transliacijos (IVTT) rinkiniai. ThermoFisher Scientific firmos mišinys yra paruoštas iš dalinai valyto *E. coli* ląstelių ekstrakto. NEB IVTT mišinys ruošiamas iš transkripcijai, transliacijai ir energijos perdirimui būtinausių komponentų, kurių kiekvienas yra išgryninamas atskirai.

IVTT reakcijos reagentai paimami iš -70°C ir laikomi +4°C ~0,5-1 h, kad atšiltų lėtai. Reakcijos mišinys yra ruošiamas reagentus laikant šaltai. Kiekvienas komponentas yra išimamas iš šaldomo stovėlio, sumaišomas ir dedamas į reakcijos mišinį. Naudoti NEB ir ThermoFisher Scientific IVTT mišiniai buvo ruošiami pagal gamintojo rekomendacijas. Papildomai buvo pridėdama RiboLock arba pelių RNazių inhibitorius 1 U/μl.

Dažniausiai naudotas DNR kiekis atitiko gamintojo rekomendacijas, t. y. 0,1 μg/10 μl. Rezultatų dalyje yra minima, kai buvo naudojamas kitoks DNR kiekis. Rezultatuose yra detaliau aprašoma, koks DNR dalelių kiekis buvo naudotas konkrečiame eksperimente, kokie kiti reakcijos komponentai buvo pridėdami.

Paruošta IVTT reakcija buvo perkeliama į 384 šulinėlių mikroplokštelę arba emulsifikuojama ir surenkama, kaip tai aprašyta 2.2.12 skyrelyje. Reakcija buvo vykdoma 37°C (NEB) arba 30°C (ThermoFisher Scientific).

Šio darbo metu baltymų sintezės eksperimentuose buvo sintetunami du baltymai: eGFP ir LacZ. eGFP yra žaliai fluorescuojantis baltymas, kurio sintezę galima stebėti tiesiogiai įrašant fluorescencinio signalo stiprumą. LacZ baltymas yra fermentas, todėl jo sintezė buvo stebima netiesiogiai į reakcijos mišinį pridėdant ne fluorescuojančio substrato FDG. Susintetinus aktyvų LacZ baltymą, jis FDG hidrolizudavo iki fluoresceino, kurio fluorescencijos signalas ir buvo matuojamas.



### **eGFP reporterinė sistema**

eGFP baltymas buvo ekspresuojamas mikroplokštelėje arba mikroskysčių lašeliuose.

eGFP baltymo sintezę atliekant mikroplokštelėje, plokštelė buvo inkubuojama plokštelių skaitytuve, kuris iškart detektuodavo eGFP baltymo fluorescenciją.

Reakciją vykdant mikrolašeliuose, dalis emulsijos buvo užnešama ant hemocitometro ir daromos fluorescencinės nuotraukos. Fluorescencinėse nuotraukose norint matyti ne tik eGFP baltymą, bet ir DNR daleles, emulsija turėjo būti papildomai dažoma. ~2  $\mu$ l emulsijos buvo sumaišoma su ~2  $\mu$ l SYTO 84 dažymo tirpalu. Pridedama dar ~6  $\mu$ l HFE7500 alyvos, turinčios 2 % (w/v) EA1 surfaktanto, užnešama ant hemocitometro ir daromos fluorescencinės nuotraukos.

#### **2.4. lentelė. eGFP baltymo sintezės eksperimentų suvestinė**

<b>Eksperimentas</b>	<b>Matrica</b>	<b>Kartai</b>	<b>Rezultatas</b>
TF* - mikrolašeliuose – $\lambda=1$	Plazmidė	3	Negauta fluorescencija
TF* - mikroplokštelėje – $\lambda=1$	Plazmidė	3	Negauta fluorescencija
TF* - mikrolašeliuose – $\lambda=13\ 000$	Plazmidė	1	Gauta fluorescencija
NEB - mikroplokštelėje – $\lambda=10^{1-4}$	Plazmidė	4	Gauta fluorescencija
NEB - mikroplokštelėje – $\lambda=0,01-0,1$	Dalelės	12	Gauta fluorescencija
NEB - mikrolašeliuose – $\lambda=0,1-1$	Dalelės	6	Gauta fluorescencija

\* - ThermoFisher Scientific IVTT rinkinys;

### **LacZ reporterinė sistema**

LacZ baltymo sintezė taip pat buvo stebima mikroplokštelėje arba mikroskysčių lašeliuose.

IVTT reakcija iš pradžių buvo atliekama 0,2 ml mėgintuvėlyje 3 valandas 37°C. Po to 1  $\mu$ l šio mišinio, turinčio susitentintą LacZ, buvo sumaišoma su 9  $\mu$ l FDG analizės buferio ir perkeliama į mikroplokštelę esančią plokštelių skaitytuve. Prietaisas įrašydavo po FDG hidrolizės susidariusio fluoresceino signalą.

LacZ baltymo sintezė taip pat buvo vykdoma mikrolašeliuose. Į paruoštą IVTT reakciją buvo papildomai pridama FDG, kurio kiekis eksperimentuose būdavo 0,8 - 1  $\mu$ M. Tuomet IVTT reakcija buvo emulsifikuojama ir LacZ sintezė vykdoma 37°C temperatūroje. Po valandos

dalis emulsijos buvo užnešama ant hemocitometro ir daromos fluorescencinės nuotraukos.

Norint fluorescencinėse nuotraukose matyti ne tik LacZ fermento aktyvumą, bet ir DNR daleles, turėjo būti naudojamas papildomas dažas. Dalelių DNR buvo dažoma arba EtBr, arba SYTO 84 dažu. Naudojant EtBr, 15 - 50  $\mu\text{g/ml}$  šio dažo buvo dedama į IVTT reakciją prieš ją emulsifikuojant. Kai dalelės buvo dažomos su SYTO 84 dažu,  $\sim 2 \mu\text{l}$  emulsijos, po IVTT reakcijos, buvo sumaišoma su  $\sim 2 \mu\text{l}$  SYTO 84 dažymo tirpalu. Pridedama dar  $\sim 6 \mu\text{l}$  HFE7500 alyvos, turinčios 2 % (w/v) EA1 surfaktanto, užnešama ant hemocitometro ir daromos fluorescencinės nuotraukos.

## 2.5. lentelė. LacZ baltymo sintezės eksperimentų suvestinė

<b>Eksperimentas</b>	<b>Matrica</b>	<b>Kartai</b>	<b>Rezultatas</b>
NEB - mikrolašeliuose – $\lambda=10^5$	Plazmidė	1	Gauta fluorescencija
NEB - mikrolašeliuose – $\lambda=0,1-0,2$	Dalelės	3	Gauta fluorescencija
NEB - mikroplokštelėje – $\lambda=10^{2-5}$	Plazmidė	2	Gauta fluorescencija
NEB - mikroplokštelėje – $\lambda=0,1-1$	Dalelės	6	Gauta fluorescencija

### 2.2.12. Reakcijos mišinio emulsifikavimas

Prieš emulsifikuojant reakcijos mišinį, paruošiami švirkštai. Alyvos fazei buvo naudojamas 1 ml švirkštas, pripildytas HFE7500 alyvos turinčios 2 % (w/v) EA1 surfaktanto. Vandens fazei irgi naudotas 1 ml švirkštas, kuris papildomas 200-400  $\mu\text{l}$  HFE7500 alyvos. Prie abiejų švirkštų prijungiama 27G adata ir PTFE šlangelė (0,3 mm vidinio skersmens).

Paruoštas reakcijos mišinys (DNR padauginimo reakcija arba IVTT) įtraukiamas į vandens fazės švirkšto PTFE šlangelę. Švirkštai įstatomi į pompas. Jose nustatomas įstatyto švirkšto diametras. Šlangelė inkubuojama dėžutėje su ledu, o pats švirkštas apklojamas pirštine, užpildyta ledu. Kanalu sistema mikrogardelėje pirmiausiai užpildoma HFE7500 alyvos ir surfaktanto mišiniu ir tik tada prijungiamas vandens fazės švirkštas. Paleidus vandens fazę ir jai pasiekus jungtį, kurioje vyksta emulsifikavimas, yra leidžiama tekėti ir alyvos fazei.

Eksperimentuose, kuriuose buvo naudojama 11  $\mu\text{m}$  aukščio mikrogardelė, vandens fazės tekėjimo greitis būdavo 50  $\mu\text{l/val.}$  arba 100  $\mu\text{l/val.}$ , o alyvos fazės greitis atitinkamai 150  $\mu\text{l/val.}$  arba 250-

300  $\mu\text{l/val.}$ . Eksperimentuose, kuriuose buvo naudojama 19  $\mu\text{m}$  aukščio gardelė, vandens fazės tekėjimo greitis būdavo 100  $\mu\text{l/val.}$ , o alyvos fazės greitis 250  $\mu\text{l/val.}$ .

### 2.2.13. Emulsijos įvertinimas fluorescenciniu mikroskopu

Emulsija buvo mikroskopuojama paskleista ant hemocitometro stikliuko arba, kai kuriais retais atvejais, suspausta tarp dviejų mikroskopijos stikliukų. Hemocitometras arba mikroskopijos stikliukai nuplaunami muiluotu vandeniu, nuskalaujami distiliuotu vandeniu ir dar kartą nuplaunami 96 % etanolio. Emulsijos paruošimas mikroskopavimui skirdavosi priklausomai nuo reakcijos:

#### **Kai SYBR Safe buvo dedamas į DNR padauginimo reakciją:**

Emulsijos nereikėjo dažyti papildomai. Todėl  $\sim 2$   $\mu\text{l}$  emulsijos ir  $\sim 8$   $\mu\text{l}$  HFE7500 alyvos, turinčios 2 % (w/v) EA1 surfaktanto, buvo užnešama ant hemocitometro ir pridengiama mikroskopiniu stikliuku.

Fluorescencijos signalo sužadinimui buvo naudojamas mėlynos spalvos spektras ( $\lambda = 470 \pm 20$  nm), signalas buvo fiksuojamas žalios spalvos spektre ( $\lambda = 525 \pm 25$  nm). Andor kamera buvo šaldoma iki  $-40^\circ\text{C}$ , ekspozicija trukdavo 100 ms, o elektroninis signalo stiprinimas (EMCCD gain) buvo nustatytas 225. Viena nuotrauka buvo padaroma sumuojant 5 atskirus kadrus.

#### **Kai SYBR Safe nebuvo dedamas į DNR padauginimo reakciją:**

DNR esančią emulsijoje reikėjo dažyti.  $\sim 2$   $\mu\text{l}$  emulsijos buvo sumaišomi su  $\sim 8$   $\mu\text{l}$  SYBR Green dažymo tirpalo ant hemocitometro ir pridengiama mikroskopiniu stikliuku.

Sužadinimui buvo naudojamas mėlynos spalvos spektras ( $\lambda = 470 \pm 20$  nm), o fluorescencijos signalas buvo fiksuojamas žalios spalvos spektre ( $\lambda = 525 \pm 25$  nm). Ekspozicija su Nikon kamera trukdavo 100 ms.

#### **Po eGFP arba LacZ IVTT reakcijos:**

Kai emulsija buvo dažoma, tai  $\sim 2$   $\mu\text{l}$  emulsijos buvo sumaišoma su  $\sim 2$   $\mu\text{l}$  SYTO 84 dažymo tirpalu ir pridedami dar  $\sim 6$   $\mu\text{l}$  HFE7500 alyvos, turinčios 2 % (w/v) EA1 surfaktanto. Viskas perkeliama ant hemocitometro ir pridengiama mikroskopiniu stikliuku.

eGFP arba fluoresceino sužadinimui buvo naudojamas mėlynos spalvos spektras ( $\lambda = 470 \pm 20$  nm), o fluorescencijos signalas buvo fiksuojamas žalios spalvos spektre ( $\lambda = 525 \pm 25$  nm). Ekspozicija su Nikon kamera buvo nustatyta 3 s. EtBr arba SYTO 84 sužadinimui buvo naudojamas mėlynos

spalvos spektras ( $\lambda = 475 \pm 12$  nm), o fluorescencijos signalas buvo fiksuojamas raudonos spalvos spektre ( $\lambda = 559 \pm 17$  nm). Ekspozicija su Nikon kamera buvo nustatyta nuo 600 ms iki 3 s.

#### 2.2.14. Lašelių dydžio įvertinimas

Emulsija buvo paskleidžiama ant hemocitometro ir padaromos kelios šviesaus lauko nuotraukos, naudojant 20 X objektyvą. Gautoms nuotraukoms buvo nustatomas mastelis naudojant mikroskopo kalibravimo stikliuką arba naudojantis žinoma mikroskopo kalibracija. ImageJ programa buvo išmatuojami bent 10 lašelių dydžiai ir apskaičiuojamas aritmetinis vidurkis. Lašelių tūris buvo apskaičiuojamas pagal 2.2 formulę:

$$V(\text{lašelio, pl}) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{1000}$$

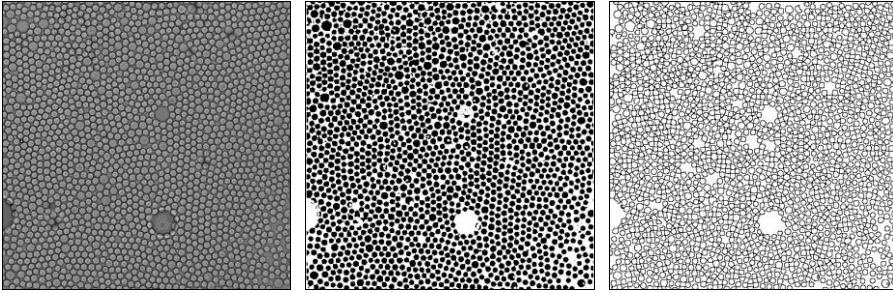
**2.2. formulė.** Lašelių tūrio skaičiavimo formulė.

$\pi$  yra matematinė konstanta lygi 3,141...,  $r$  – lašelio spindulys mikrometrais,  $^{4/3}$  – sferos tūrio skaičiavimo konstanta, o 1000 – konstanta reikalinga lašelio tūrį išreikšti pikolitrais.

#### 2.2.15. Fluorescuojančių lašelių kiekio įvertinimas

Norint įvertinti, kokia dalis emulsijos lašelių fluorescuoja, lašeliai buvo paskleidžiami ant hemocitometro. Mikroskopijos nuotrauka daroma tokioje pozicijoje, kurioje kuo didesnė dalis emulsijos (pageidautina visa) būtų išsidėsčiusi viename sluoksnyje. Toje pačioje pozicijoje padaromos šviesaus lauko ir fluorescencinės nuotraukos naudojant 10 X objektyvą. Taip surenkamos trys poros nuotraukų iš vieno mėginio.

Šviesaus lauko ir fluorescencinių nuotraukų analizės eiga šiek tiek skirdavosi. Naudojant ImageJ programą šviesaus lauko nuotraukai yra pritaikoma slenkstinė riba, gautas negatyvas yra invertuojamas ir atliekama morfologinė paveikslėlių atidarymo operacija („Open“). Nuotraukai pritaikoma funkcija takoskyra („Watershed“), kuri atskiria sulipusius lašelius. Nuotraukoje esančių lašelių kiekis yra įvertinamas naudojant dalelių analizavimo įrankį („Analyze Particles“), kuriame yra nustatomas skaičiuojamų dalelių dydis ir pasirenkamas dalelių apvalumo indeksas („Circularity“), paprastai tarp 0,5 ir 1,0. Detalesnė nuotraukų analizės eiga yra pavaizduota paveiksle (2.4. pav.).



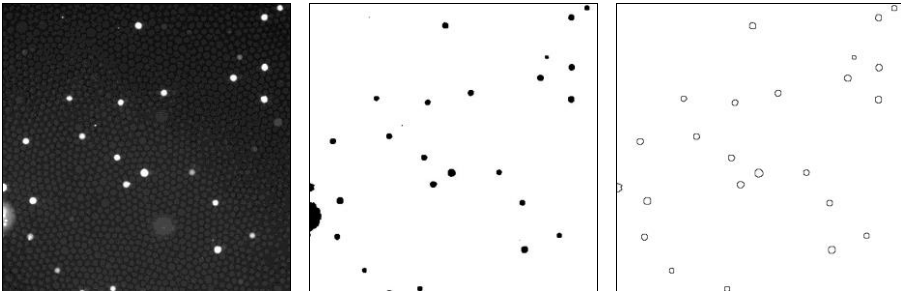
**2.4. pav.** Šviesaus lauko nuotraukų analizė.

**Kairėje:** matoma šviesaus lauko nuotrauka padaryta 10 X objektyvu.

**Centre:** matoma ta pati nuotrauka pritaikius slenkstinę ribą, invertavus nuotrauką ir atlikus atidarymo ir takoskyros operacijas.

**Dešinėje:** matomi objektai, kurie dalelių analizavimo įrankio buvo atpažinti, kaip dalelės, ir buvo suskaičiuoti.

Šviesaus lauko nuotraukos buvo naudojamos nustatyti visą lašelių skaičių, esantį fotografuotame plote. Fluorescuojančių lašelių skaičiui nustatyti, ImageJ programa buvo pritaikoma slenkstinė riba fluorescencinei nuotraukai. Susilieję lašeliai būdavo atskiriami panaudojant takoskyros funkcija („Watershed“). Fluorescuojančių lašelių kiekis tame plote yra įvertinamas naudojantis dalelių analizavimo įrankiu („Analyze Particles“), kuriame nustatomas dalelių dydis ir pasirenkamas dalelių apvalumo indeksas („Circularity“), paprastai tarp 0,3 ir 1,0. Detalesnė nuotraukų analizės eiga yra pavaizduota paveiksle žemiau (2.5. pav.).



**2.5. pav.** Fluorescencinių nuotraukų analizė.

**Kairėje:** matoma fluorescencinė nuotrauka padaryta 10 X objektyvu.

**Centre:** matoma ta pati nuotrauka pritaikius slenkstinę ribą ir atlikus takoskyros operaciją.

**Dešinėje:** matomi objektai, kurie dalelių analizavimo įrankio buvo atpažinti, kaip dalelės, ir buvo suskaičiuoti.

Paveikslėliuose pristatytoje šviesaus lauko nuotraukoje (2.4. pav.) buvo nustatyti 1778 lašeliai, o fluorescencinėje nuotraukoje (2.5. pav.) – 24. Šviesaus lauko nuotraukose nustatytas lašelių kiekis buvo laikomas 100 % lašelių, o fluorescencinėse nuotraukose nustatytas lašelių kiekis buvo naudojamas įvertinti fluorescuojančių lašelių kiekį mėginyje. Pristatytame pavyzdyje tai yra 1,3 % fluorescuojančių lašelių.

#### 2.2.16. DNR dalelių gryninimas

Po DNR padauginimo reakcijos, emulsija yra surenkama ir perkeliama į atskirą mėgintuvėlį. Emulsijos suardymu yra pridedama PFO tirpiklio ir paliekama keletai minučių ant ledo. 1 tūriui emulsijos naudojami 2 tūriai PFO. Emulsijai suirus, vandeninė fazė yra surenkama į atskirą mėgintuvėlį.

#### **DNR dalelių gryninimas iš agarozės:**

Po emulsijos suardymo surinkta vandens fazė yra praskiedžiama su vandeniu iki 400  $\mu$ l tūrio ir centrifuguojama 10000 g 10 minučių. Supernatantas pašalinamas, o resuspenduotos nuosėdos yra sumaišomos su 6 X DNR užnešimo dažu. Taip paruoštas tirpalas yra perkeliamas į 1 % žemos lydymosi temperatūros agarozės šulinėlį (gelis paruoštas iš TAE buferio, turintis 1  $\mu$ g/ml EtBr). Kitos elektroforezės sąlygos yra tokios, kaip aprašyta 2.2.6 skyrelyje. Po elektroforezės gelis yra ištraukiamas ir išpjaunamas šulinėlis, į kurį buvo užneštos dalelės. Nustačius šulinėlio masę, yra pridedama 10 X  $\beta$ -agarazės buferio iki 1 X koncentracijos. Gelis išlydomas inkubuojant 65°C 10 minučių. Tuomet mėgintuvėlis perkeliamas 5 minutėm į 42°C temperatūrą. Pridedamas 1 U  $\beta$ -agarazės kiekvienam 100 mg gelio ir tęsiama inkubacija 42°C 1 valandą. Pridedami 2 tūriai vandens ir EtBr iki 1  $\mu$ g/ml koncentracijos. Gautas tirpalas centrifuguojamas 30 minučių 17500 g. Viršutinė tirpalo dalis yra pašalinama nesujudinant dugno (dalelių nuosėdų gali ir nesimatyti).

#### **DNR dalelių gryninimas karpant su restrikcijos endonukleazėmis:**

Šį dalelių gryninimo metodą sukūrė ir optimizavo Greta Zubaitė (Zubaite, 2016).

Po emulsijos suardymo surinkta vandens fazė skiedžiama vandeniu iki 400  $\mu$ l tūrio ir centrifuguojama 10000 g 10 minučių. Supernatantas pašalinamas, o resuspenduotos nuosėdos yra panaudojamos restrikcijos reakcijoje. 100  $\mu$ l reakcijos mišinys yra ruošiamas iš 10  $\mu$ l 10 X R restrikcijos endonukleazės buferio, 10  $\mu$ l restrikcijos endonukleazės,

vandens ir DNR dalelių. Dalelių gryninimui buvo parinktos tokios restrikcijos endonukleazės, kurios kerpa už signalinio baltymo sekos. XagI restrikcijos endonukleazė naudota iš pET-29b(+)\_EGFP plazmidės (2.2. pav.) ruošoms dalelėms, o HindIII restrikcijos endonukleazė – iš pIVEX22EM-LacZ-his plazmidės (2.3. pav.) ruošoms dalelėms gryninti. Reakcija vykdoma 15 - 20 minučių 37°C. Po to pridedama vandens iki 400 µl ir centrifuguojama 10000 g 10 minučių, supernatantas pašalinamas. Centrifugavimas ir supernatanto pašalinimas kartojami dar du kartus. Po to dalelės resuspenduojamos 15-25 µl likusio tirpalo.

Dalelių gryninimo efektyvumas buvo vertinamas suskaičiuojant dalelių kiekį prieš ir po gryninimo proceso pagal metodiką aprašytą 2.2.17 skyrelyje. Naudoto gryninimo metodo efektyvumo rezultatai yra pateikti atitinkamame rezultatų skyrelyje (3.4).

#### 2.2.17. Dalelių kiekio skaičiavimas

1 µl dalelių tirpalo sumaišoma su 9 µl dalelių dažymo tirpalu ir užnešama ant hemocitometro. Daromos kelios fluorescencinės ir viena šviesaus lauko nuotrauka. Naudojantis hemocitometre esančiu žymėjimu ir šviesaus lauko nuotrauka, yra nustatoma, koks skysčio tūris yra analizuojamas. Kadangi ne visos dalelės yra vienoje objektyvo fokusavimo plokštumoje, tai fluorescencinės nuotraukos buvo daromos skirtingose fokusavimo padėtyse. Visos fluorescencinės nuotraukos yra sudedamos naudojant ImageJ programos paveikslėlių sudėjimo įrankį („Image Calculator → Addition“). Gautam paveikslui yra pritaikoma slenkstinė riba ir dalelės yra suskaičiuojamos naudojant dalelių analizavimo įrankį („Analyze Particles“). Šis principas taikomas visų dalelių tirpalų koncentracijų nustatymui. Negrynintų dalelių ir restrikcijos endonukleazėmis grynintų dalelių tirpalai prieš tokį įvertinimą turi būti skiedžiami 10 kartų. Nustatytas dalelių skaičius ir analizuojamo ploto tūris yra panaudojami apskaičiuoti dalelių koncentraciją dalelėmis mikrolitre. Lyginant visą dalelių skaičių prieš gryninimą ir po jo, buvo nustatomas naudojamo gryninimo metodo efektyvumas.

#### 2.2.18. Dalelių dydžių analizė remiantis TEM nuotraukomis

DNR padauginimas buvo vykdomas įprastomis sąlygomis. Po 17 valandų inkubacijos 30°C emulsija buvo padalinta į dvi dalis. Viena dalis inkubuota 65°C 10 minučių, kita ne. Dalis kiekvienos emulsijos buvo suardyta ir panaudota peršviečiamo elektroninio mikroskopo nuotraukoms daryti.

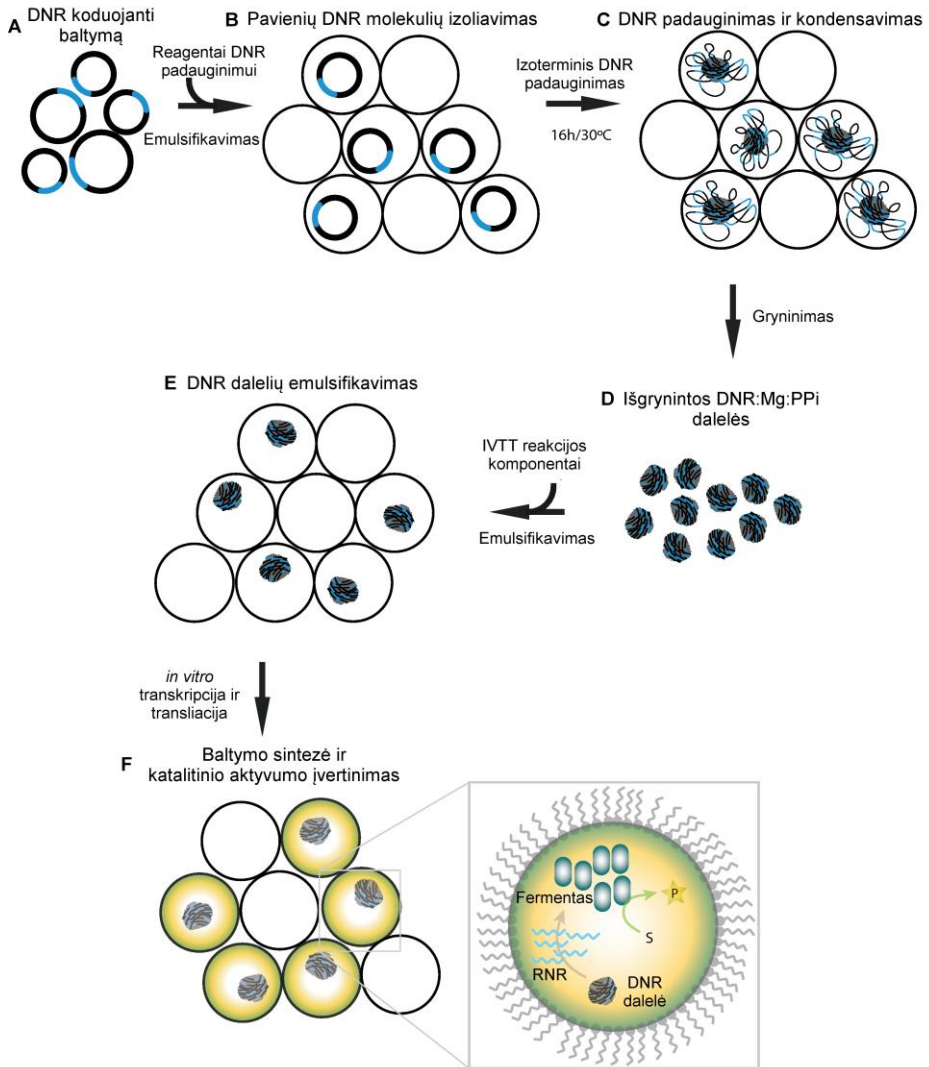
Likusios emulsijos grąžintos į 30°C. Praėjus 38 ir 66 valandoms nuo padauginimo reakcijos pradžios, buvo imamas mėginys iš kiekvienos emulsijos, emulsija ardoma ir daromos TEM nuotraukos. 4 μl dalelių tirpalo buvo perkeliama ant TEM gardelės ir inkubuojama ~1 minutę. Tuomet tirpalas sugeriamas naudojant filtrinį popierių. Ant tos pačios gardelės užnešami 4 μl 2 mM Uranilacetato, inkubuojama 1 minutę ir skysčio perteklius surenkamas filtriniu popieriumi. Gardelė perkeliama į peršviečiamą elektroninį mikroskopą ir padaromos bent 5 nuotraukos skirtingose gardelės pozicijose. TEM nuotraukos buvo daromos naudojant tokį priartinimą, kad vienoje nuotraukoje vidutiniškai būdavo nuo 7 iki 40 dalelių. Naudojant elektronų mikroskopo kalibraciją, nuotraukoms buvo priskiriamas mastelis. Remiantis juo ir naudojant ImageJ programą buvo įvertintas dalelių dydis. Kadangi didesnės dalelės ne visada būna apvalios (kai kurios būna elipsės formos), todėl buvo matuojamas vidutinis dalelės dydis. Dalelė buvo sutalpinama į mažiausią įmanomą stačiakampio formos figūrą ir matuojamas stačiakampio perimetras. Pastarasis skaičius vėliau dalinamas iš 4 ir gautas dydis laikomas vidutiniu dalelės diametru.



### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Siekdami sukurti efektyvesnį metodą *in vitro* baltymų sintezei atlikti, mes savo darbus pradėjome nuo pavienių DNR molekulių sintezės mikroskopiniuose vandens lašeliuose. Deja, gauti rezultatai nuvylė, nes baltymo sintezė lašeliuose nevyko arba pagaminamas baltymo kiekis buvo per mažas detektavimui. Siekdami pagerinti baltymo išėigas mes pasirinkome padauginti pavienes DNR molekules lašeliuose ir tik tuomet atlikti baltymo sintezę. Kadangi DNR kopijų skaičius po padauginimo padidėja daugiau nei tūkstantį kartų, galima tikėtis, kad dėl to padidės ir *in vitro* susintetinto baltymo kiekis. Atliekant DNR padauginimą lašeliuose, mūsų pačių nuostabai, buvo pastebėta, kad po DNR amplifikavimo, susidaro DNR mikrodalelės. Lygindami savo rezultatus su kitų autorių darbais darėme prielaidą, kad padauginta DNR turėtų būti prisitvirtinusi magnio pirofosfato mikrokristalų paviršiuje (Shopsowitz ir kt., 2014). Pastarieji susidaro DNR sintezės metu kaip šalutinis reakcijos produktas (Mori ir kt., 2001). Dėl šio atradimo buvo pasiūlyta nauja darbo eiga (3.1. pav.). Darbo metu buvo išbandyti įvairūs metodai DNR-magnio-pirofosfato dalelių atskyrimui nuo laisvos DNR (likusios tirpale) ir reakcijos mišinio ir įvertinta jų išėiga. Išgrynintos dalelės buvo sėkmingai panaudotos kaip DNR matrica baltymų sintezei *in vitro* atlikti. Panaudojant DNR daleles buvo ekspresuoti du baltymai: žaliai fluorescuojantis baltymas ir  $\beta$ -laktamazė. Šios disertacijos metu sukurtas naujas metodas turėtų papildyti baltymų inžinerijos metodų sąrašą.

Šioje disertacijoje pristatomi rezultatai buvo gauti skirtingose laboratorijose. Mikrogardelės (rezultatai 3.1 skyrelyje) buvo gamintos ESPCI (Prancūzija) ir GMC (Lietuva) laboratorijose. Pavienių DNR molekulių sintezės (3.2 skyrelio), inaktyvavimo karščiu (3.3.5 skyrelio), kitų DNR padauginimo sąlygų (3.3.4 skyrelio), dalelių grynino panaudojant REazę (3.4.2 skyrelio) bei baltymų sintezės nuo dalelių (3.5 skyrelio) rezultatai buvo gauti GMC laboratorijoje. Kiti rezultatai pristatyti vienos DNR molekulės padauginimo (3.3) ir dalelių gryninimo iš agarozės (3.4.1) skyreliuose buvo gauti ETH (Šveicarija) laboratorijoje. Taip pat pirmieji baltymų sintezės nuo dalelių rezultatai buvo gauti ETH (Šveicarija) laboratorijoje.



### 3.1. pav. Darbo eigos schema.

DNR koduojanti tikslinį fermentą yra inkapsuliuojama kartu su reagentais skirtais DNR padauginimui (A). DNR molekulių kiekis yra parenkamas toks, kad emulsifikavimo metu viename lašelyje būtų viena nukleorūgšties molekulė (B). Po DNR molekulių izoterminio padauginimo lašeliuose susiformuoja dalelės sudarytos iš DNR ir magnio pirofosfato (C). Emulsija yra suardoma ir dalelės išgryninamos (D). Šios dalelės yra emulsifikuojamos antrą kartą kartu su IVTT mišinio komponentais. Parenkamas toks dalelių kiekis, kad lašelyje būtų viena dalelė (E). Dalelėje esanti DNR yra panaudojama kaip matrica baltymo sintezei. Susintetintas fermentas katalizuoja substrato vartimą produktu, kurio fluorescenciją galima nustatyti (F) (Zubaite ir kt., 2017).

### 3.1. Mikrogardelių pagaminimas ir testavimas

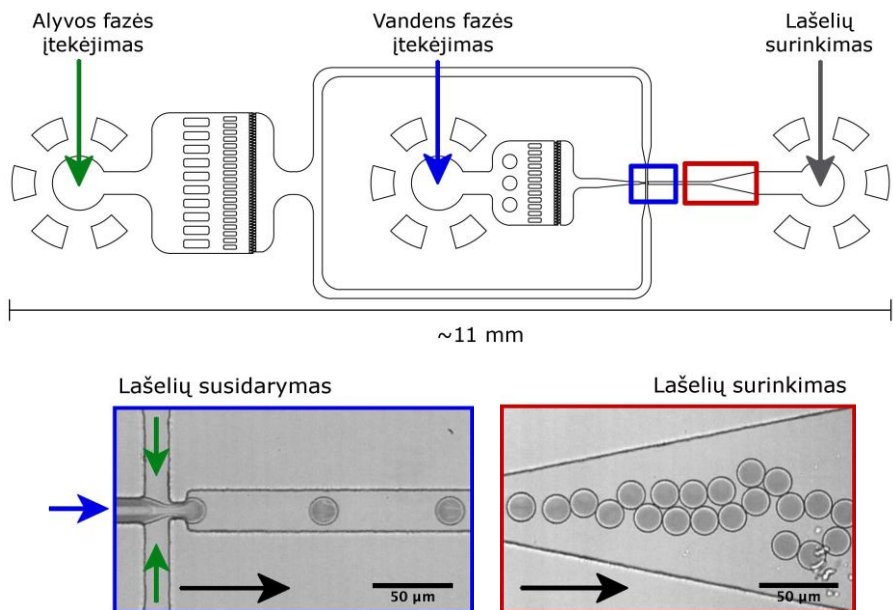
Darbo metu DNR sintezė ir *in vitro* transkripcija ir transliacija buvo vykdoma mikrolašeliuose. Mikrolašeliai buvo generuojami mikrogardelėse, kurių pagaminimas detaliam aprašytas metodinėje dalyje (2.2.8 skyrius). Projektuojant ir gaminant mikrogardėles siekėme užtikrinti keletą esminių savybių: generuoti kuo mažesnius mikrolašelius kiek galima labiau atitinkančius vienos ląstelės dydį (~ 15 μm), mikrolašelių generavimo procesas turėjo išlikti stabilus 1 valandą ar ilgiau, o generuojami lašeliai turi būti monodispersiški (t.y. vienodo tūrio). Tokio paties dizaino mikrogardelės buvo naudojamos tiek DNR sintezės reakcijos, tiek *in vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijos komponentams emulsifikuoti (3.1. pav. B ir E bei 3.2. pav.).

Emulsifikuojami tirpalai pasižymėjo skirtinga klampa, atsižvelgiant į tai buvo parenkami skirtingų išmatavimų mikrokanalėliai (detaliau 2.1.2.1 skyriuje). 11 μm aukščio gardelės buvo naudojamos DNR sintezės reakcijos mišinio emulsifikavimui. 19 μm gylio gardelės buvo naudojamos IVTT reakcijos komponentams emulsifikuoti. Nustatyta, jog 11 μm aukščio gardelėse gaunami mikrolašeliai buvo apie 4 pl tūrio, o 19 μm gardelėse – apie 20 pl tūrio.

### 3.2. Pavienių DNR molekulių sintezė

Sėkminga baltymo sintezė lašeliuose yra būtina sąlyga būsimiems *in vitro* evoliucijos eksperimentams. Šiuose eksperimentuose kiekvienas lašelis turi atlikti dvi pagrindines funkcijas: ryšio ir barjero. Lašelis, kaip ryšys, turi susieti konkretų genotipą tik su jo fenotipu. O lašelis, kaip barjeras, turi atskirti vieną genotipą kartu su jo fenotipu nuo kitų genotipų ir jų fenotipų. Tik laikantis šių sąlygų būtų galima rūšiuoti lašelius pagal fenotipą, kartu atrenkant ir jį koduojantį genotipą. Barjero funkcija yra efektyviai vykdoma kai viename lašelyje yra tik vieno tipo genetinė medžiaga, o ne įvairių genotipų mišinys. Tačiau, po DNR padauginimo, dažniausiai yra turima visa

DNR mutantų biblioteka. Skirtingas mutacijas turinčios molekulės gali būti atskirtos. Tam DNR mišinys yra skiedžiamas tiek, kad molekulių skaičius tampa panašus į planuojamą sugeneruoti lašelių skaičių. Tokiose sąlygose emulsifikuojant DNR molekules, į daugumą lašelių pateks tik po vieną molekulę. Savo darbus pradėjome nuo eGFP baltymo sintezės eksperimento, naudodami tokį DNR kiekį, kad viename lašelyje būtų tik



### 3.2. pav. DNR sintezės lašelių generavimas.

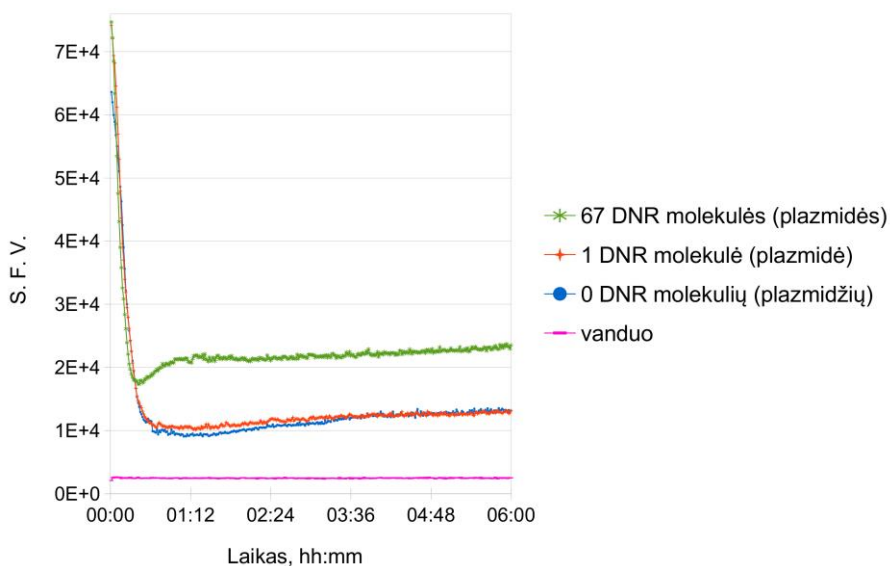
**Viršuje** bendras kanalų išdėstymas. Įėjimo kanalas alyvos fazei pažymėtas žalia rodykle modulio kairėje, įėjimo kanalas reakcijos mišino vandeninei fazei – mėlyna rodykle modulio centre bei emulsijos surinkimo kanalas – pilka rodykle modulio dešinėje. Mėlynas kvadratas žymi jungtį, kurioje susijungia alyvos ir vandens fazės ir vyksta emulsijos susidarymas, o raudonas kvadratas žymi mikrogardelės dalį, kuria lašeliai keliauja iki surinkimo kanalo.

**Žemiau kairėje – mėlynai apvestas paveikslukas:** Lašelių generavimo jungtis, kurioje iš kairės atitekančią vandens fazę (mėlyna rodyklė) į atskirus lašelius padalina iš viršaus ir apačios atitekanči alyvos fazė (žalios rodyklės). Juoda rodyklė žymi lašelių judėjimo kryptį.

**Žemiau dešinėje – raudonai apvestas paveikslukas:** Pavieniai lašeliai artėja prie surinkimo kanalo. Šioje dalyje jie jau gali susiliesti vienas su kitu ir nesusiliesti į vieną lašelį, nes jie yra stabilizuoti alyvoje esančio surfaktanto. Juoda rodyklė žymi lašelių judėjimo kryptį.

viena DNR molekulė (3.1. pav. E ir F etapai, skirtumas tik tame, kad šiame eksperimente emulsifikavome DNR molekules, o ne daleles). Ekstraktinė IVTT reakcija buvo paruošta kaip aprašyta 2.2.11 skyrelyje, emulsifikuota naudojant mikroskysčių gardelę (2.2.12 skyrelis) ir inkubuota 6 valandas 30 °C. Tuomet mikroskysčių lašeliai perkelti į hemocitometrą ir mikroskopuoti. Šiuose eksperimentuose fluorescuojančių lašelių užfiksuoti nepavyko, nepaisant to, kad eksperimentas buvo kartotas tris kartus. Reakcija galėjo nevykti dėl keleto priežasčių: netinkama genetinė

konstrukcija, per mažas DNR kiekis arba IVTT reakcijos nesuderinamumas su naudojama mikroskysčių sistema (netinkama alyva ar naudojama paviršiaus aktyvioji medžiaga). Pradžioje norėjome patikrinti, ar fluorescencinio signalo nebuvimas yra dėl per mažo DNR kiekio, todėl eksperimentas buvo pakartotas tris kartus, tik šįkart neemulsifikuojant, t.y. mikroplokštelėje. Pateikiame rezultatus vieno iš eksperimentų, kuriame buvo naudotas toks DNR kiekis, kuris lašeliuose atitiktų 67, 1 ir 0 DNR molekulių (3.3. pav.).



**3.3. pav.** eGFP baltymo sintezė mikroplokštelėje. Paruošta eGFP baltymo sintezės reakcija Thermo Fisher Scientific IVTT rinkinyje, naudojant tokius DNR kiekius, kurie atitiktų 67, 1 ir 0 DNR molekulių lašelyje (2.2.11 skyrelis). Reakcija vykdyta 6 valandas 30 °C mikroplokštelėje inkubuojamoje mikroplokštelių skaitytuve įrašant fluorescenciją 505 – 545 nm bangų ruože. Fluorescencija buvo matuojama santykiniais fluorescencijos vienetais (S. F. V.).

Mikroplokštelėje gautas rezultatas dar kartą patvirtino, kad sumažinus DNR kiekį, eGFP sintezės signalo gauti nepavyks.

Vykdytą IVTT reakciją mikroskysčių lašeliuose, vienos DNR molekūlės santykinė koncentracija yra per maža, kad galima būtų nustatyti efektyviai baltymo sintezę. Detaliau netyrėme kodėl nepavyksta nustatyti baltymo sintezės: nevyksta baltymo sintezė nuo mažo DNR kiekio ar mūsų naudojama įranga nėra pakankamai jautri. Mūsų naudojamoje mikroskysčių

sistemoje negalėsime pritaikyti jautresnių metodų, pavyzdžiui, žymėjimo radioaktyviais izotopais. Šią problemą galima būtų spręsti kitais būdais: mažinant lašelio tūrį, keičiant nešančiąją alyvą arba didinant DNR kiekį.

Kadangi koncentracija yra medžiagos kiekio tam tikrame tūryje matas, jos dydis priklauso ir nuo lašelio tūrio, t. y. nuo lašelio dydžio, kurį dažniausiai riboja mikrogardelės kanalų geometrija. Mažiausias patogus lašelio dydis mūsų mikroskysčių sistemoje yra ~10 μm (diametras), tai atitinka 0,5 pl tūrį. Vienos molekulės koncentracija tokiam tūryje yra 3 pM. Būtų galima daryti mažesnius lašelius (Shim ir kt., 2013; Lim ir kt., 2012) ir taip padidinti DNR koncentraciją, tačiau tokiu atveju būtų sunku pritaikyti kitus mikroskysčių modulius: rūšiavimą, suliejimą, perskyrimą ar kitus. Šie moduliai buvo optimizuoti darbui su didesnio tūrio lašeliais. Tik neseniai pasirodė metodikos, kuriose yra dirbama su femtolitrų tūrio lašeliais (Leman ir kt., 2015). Todėl mūsų naudojamoje sistemoje lašelio tūrio mažinimas nebuvo tinkama išeitis.

Kiti autoriai (Courtois ir kt., 2008) mikroskysčių sistemoje naudojo ne fluorilintą, bet mineralinę alyvą, ir ne EA1 surfaktantą, o Abil EM 90, ir jiems pavyko gauti GFP baltymo sintezę nuo vienos DNR molekulės. Tačiau tokia mikroskysčių sistema turi keletą trūkumų. Vienas iš jų yra didesnis lašelių nestabilumas. Taip pat tokios sistemos pasižymi didesniu alyvos klampumu, dėl to dauguma mikroskysčių procesų tampa lėtesni, pavyzdžiui, lašelių gamybos greitis sumažėja nuo 30'000 iki 440 lašelių per sekundę (Theberge ir kt., 2010 ir Courtois ir kt., 2008). Didesnis alyvos klampumas taip pat pasunkina darbą su mikroskysčiais, nes tenka sugaišti daugiau laiko bandant gauti monodispersiškus lašelius.

Dėl to, kad yra sudėtinga gauti baltymo sintezę nuo vienos DNR molekulės lašelyje, mokslininkai dažniausiai pradeda nuo DNR padauginimo žingsnio. Vieno tipo mutacijas turinti DNR gali būti dauginama viename lašelyje vėliau jį suliejant su kitu lašeliu, turinčiu IVTT reakcijai reikalingus komponentus (Mazutis ir kt., 2009). Taip pat galima lašelyje padaugintą DNR pritvirtinti prie vienos mikrodalės. Tuomet tokia emulsija yra ardoma ir išgrynintos dalelės yra dar kartą emulsifikuojamos į kitus lašelius su IVTT komponentais (Stapleton ir Swartz, 2010).

Siekdami įvertinti, ar mūsų naudojama IVTT sistema yra suderinama su naudojama mikroskysčių sistema, atlikome eGFP baltymo sintezę naudodami ThermoFisher Scientific *in vitro* transkripcijos ir translacijos (IVTT) rinkinį mikrolašeliuose. Eksperimento metu buvo paruošti du mėginiai: teigiama kontrolė, kurioje vienas lašelis turėjo ~13000 plazmidžių

(kiekis buvo parinktas pagal gamintojo rekomendacijas), ir neigiama kontrolė, į kurią DNR buvo neįdėta. Po 6 valandų inkubavimo 30 °C, emulsijos buvo mikroskopuojamos. Naudotas IVTT mišinys pasižymi lengva autofluorescencija, todėl stebint kiekvieną mėginį atskirai buvo sunku įvertinti kokį fluorescencijos signalą detekuojame: reakcijos mišinio ar susintetinto eGFP baltymo. Skirtumas tarp abiejų mėginių aiškiai matėsi, tik kai emulsijos iš abiejų mėginių buvo sumaišytos ir paskleistos ant hemocitometro (3.4. pav.).

3.4. pav. yra matomos dvi lašelių populiacijos: blyškūs, nefluorescuojantys lašeliai, ir ryškūs, fluorescuojantys lašeliai. Iš šių rezultatų akivaizdu, kad fluorescencinis signalas yra detekuojamas tuose lašeliuose, kuriuose buvo įdėta eGFP baltymą koduojanti plazmidė ir įvyko baltymo sintezė. Eksperimentas kartotas vieną kartą.

### 3.3. Vienos DNR molekulės padauginimas ir DNR dalelių susidarymas

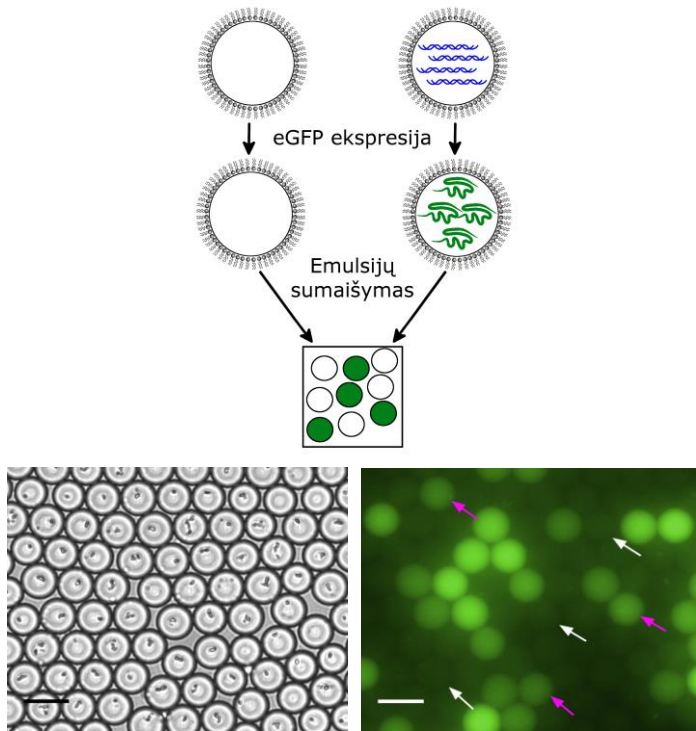
#### 3.3.1. Pradinės DNR padauginimo sąlygos

DNR padauginimui buvo pasirinktas izoterminio DNR padauginimo metodas naudojantis phi29 DNR polimerazę (3.1. pav. A – C). Izoterminio padauginimo metu emulsijos yra stabilesnės nei cikliškai kaitaliojant temperatūras PGR metu (Kennedy ir Oswald, 2011). Pradinės DNR padauginimo reakcijos sąlygos yra pateiktos 3.1 lentelėje:

**3.1. lentelė.** DNR padauginimo reakcijos sudėtis

<b>Komponentas</b>	<b>Galutinė koncentracija</b>
Egzonukleazėms atsparūs 6nt ilgio pradmenys	50 μM
dNTP (mišinys)	0,2 mM
phi29 DNR polimerazės buferis (NEB)	1 X
BSA	0,2 μg/μL
SYBR Safe	0,5 X
phi29 DNR polimerazė	0,2 U/μL
DNR	0,2 – 3,3 pg/μL
Vanduo	-

Eksperimentų vykdymo pradžioje į DNR padauginimo mišinį buvo dedamas SYBR Safe (ThermoFisher Scientific) dažas, kuris fluorescuoja kai yra interkaliavęs į DNR. 3.5. pav. pateikti rezultatai po DNR padauginimo su



### 3.4. pav. eGFP baltymo sintezė mikroskopsčių lašelyje.

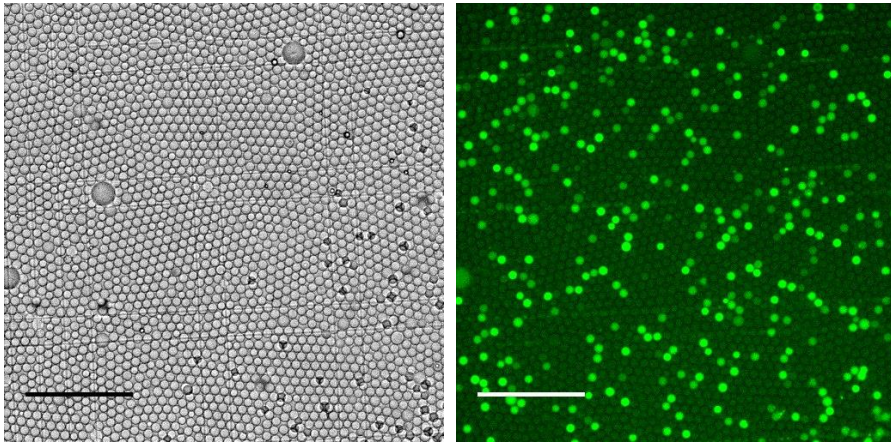
**Viršuje** yra pavaizduota atlikto eksperimento schema. Buvo paruošti du mėginiai: viename (lašeliai kairėje) buvo tik IVTT mišinys, o kitame (lašeliai dešinėje) papildomai buvo įdėta DNR (pavaizduota mėlyna spalva). Atlikus baltymo sintezę, eGFP buvo susintetintas tik tuose lašeliuose, kuriuose buvo DNR. Tuomet šie du mėginiai buvo sumaišyti ir padarytos fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos (paveikslukas apačioje schemas).

**Apačioje** yra pavaizduotos gautos mikroskopijos nuotraukos. Kairėje pateikta šviesaus lauko mikroskopijos nuotrauka, o dešinėje – fluorescencinė. Dešinėje nuotraukoje yra matomos dvi lašelių populiacijos: lašeliai, kurie yra ryškūs, fluorescuoja dėl susintetinto eGFP baltymo (dėta ~13 tūkst. DNR molekulių), pažymėti purpurinėmis rodyklėmis, ir lašeliai, kurie yra blyškūs, į kuriuos DNR nedėta, pažymėti baltomis rodyklėmis. Skalė nuotraukose yra lygi 25 μm.

phi29 DNR polimeraze. Verta paminėti, kad šis dažas į pradinį reakcijos mišinį buvo dedamas tik tuose eksperimentuose, kurie buvo vykdyti ETH universitete, Ciuriche. Vykdamas eksperimentus Vilniaus Universitete šis dažas buvo nebededamas į padauginimo reakcijos mišinį, nes slopino reakciją ir lašelių fluorescenciją buvo sunku užfiksuoti. Tiksliai tokio reiškinio priežastis nėra žinoma, buvo manoma, kad Lietuvoje įsigyta kita dažo



gamybinė partija arba naudota fluorescencinė kamera yra nepakankamai jautri. To pasekoje padauginta DNR buvo dažoma tuo pačiu dažu, bet dažas įdedamas po padauginimo reakcijos.



**3.5. pav.** DNR padauginimas mikrolašelyje. Kairėje pateikta šviesaus lauko mikroskopijos nuotrauka, o dešinėje – fluorescencinė. Dešinėje nuotraukoje fluorescuoja lašeliai, į kuriuos inkapsuliavimo metu pateko bent viena DNR molekulė ir įvyko DNR padauginimas. Skalė nuotraukose yra lygi 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2. DNR dalelių susidarymo sąlygos

Viena iš pirmųjų problemų, su kuria susidurdavome amplifikuodami pavienes DNR molekules aukščiau aprašytais sąlygomis (3.1 lentelė), buvo fluorescuojančių lašelių kiekis po reakcijos. Žinodami įdėtų DNR molekulių skaičių ir naudodami Puasono skirstinį, aprašantį retų atsitiktinių įvykių tikimybę, apskaičiuodavome, kiek fluorescuojančių lašelių turėtume gauti po DNR padauginimo. Tačiau, dažnai (eksperimentai kartoti tris kartus) fluorescuodavo mažiau lašelių, nei buvo teoriškai tikėtasi. Pavyzdžiui, eksperimente buvo naudotas toks DNR kiekis, kad vidutiniškai į vieną lašelį turėtų patekti 0,6 DNR molekulės, t. y.  $\lambda$  Puasono skirstinyje yra lygi 0,6. Remiantis Puasono skirstiniu, buvo apskaičiuota, kad tikimasi 45 % fluorescuojančių lašelių, tačiau gauti rezultatai buvo kitokie (3.2 lentelė).

Šiomis reakcijos sąlygomis gaudavome  $\sim 3$  kartus mažiau fluorescuojančių lašelių, nei teoriškai buvo tikėtasi. Todėl į reakcijos mišinį papildomai buvo dedamas poloksameras 407. Šis nejoninis surfaktantas

**3.2. lentelė.** DNR padauginimo rezultatai, kai tikimasi **45 %** fluorescuojančių lašelių

Mėginys	Fluorescuojančių lašelių kiekis, %
Teorinė reikšmė	45
Įprastos reakcijos sąlygos (3.1 lentelė ir 3.5. pav.)	16 ± 0,5
Papildomai pridėta: 0,4 % (w/v) poloksamero 407 ir DNR denatūracijos žingsnis	32 ± 1,9

mikroskysčių lašeliuose naudojamas sumažinti nespecifinę biomolekulių adsorbciją prie paviršių (Au ir kt., 2011, Luk ir kt., 2008). Minėtuose darbuose buvo išbandytos įvairios poloksamero 407 koncentracijos 0,08 - 0,8% (w/v). Savo darbe mes pasirinkome 0,4 % (w/v) koncentraciją, nes tokia pati koncentracija buvo naudojama ir A. Godinos *in vitro* baltymų sintezės eksperimentuose atliktuose mikroskysčių lašeliuose (Godina, 2013). Nors papildomai pridėjus nejoninio surfaktanto poloksamero 407 ir DNR denatūracijos žingsnį (inkubavimas 30 s 95°C) fluorescuojančių lašelių kiekis padidėdavo (kartota du kartus), bet vistiek nepasiekdavo laukiamos teorinės vertės (3.2 lentelė).

Todėl DNR padauginimo reakcijos mišinio sudėtis buvo optimizuojama toliau, didinant dNTP ir phi29 DNR polimerazės kiekius (3.3 lentelė).

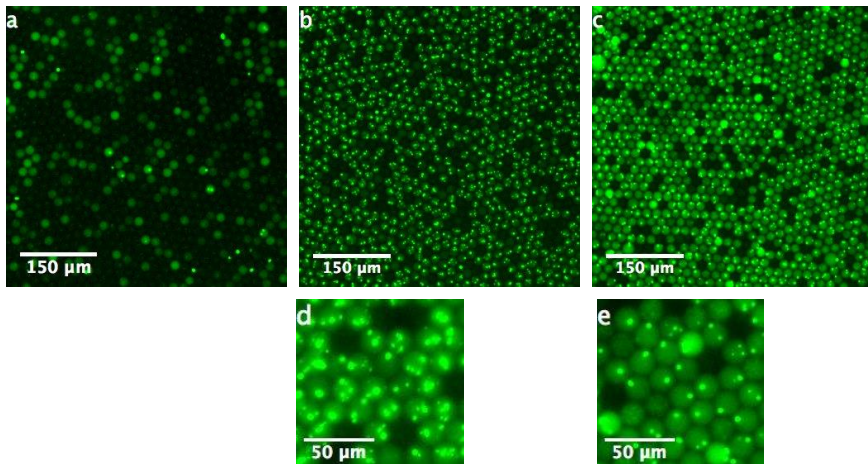
**3.3. lentelė.** DNR padauginimo rezultatai, kai tikimasi **80 %** fluorescuojančių lašelių

Mėginio Nr.	DNR padauginimo sąlygos: <sup>2</sup>	Fluorescuojančių lašelių kiekis, %
1.	0,4 % (w/v) poloksamero 407, DNR denatūracijos žingsnis	34 ± 1,9
2.	0,4 % (w/v) poloksamero 407, DNR denatūracijos žingsnis, <b>4X polimerazės</b>	80 ± 1,4
3.	0,4 % (w/v) poloksamero 407, DNR denatūracijos žingsnis, 4X polimerazės, <b>5X dNTP</b>	81 ± 2,3

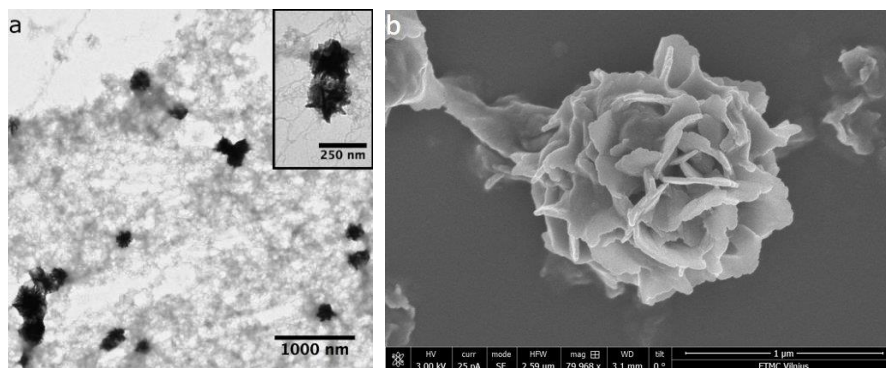
2- kitos DNR padauginimo sąlygos kaip 3.1 lentelėje.

Kartojant eksperimentą įprastomis sąlygomis, vėl buvo gauta ~2,4 karto mažiau fluorescuojančių lašelių, nei teoriškai tikimasi (3.3 lentelė 1 mėginys ir 3.6. pav. a). Tačiau padidinus phi29 DNR polimerazės kiekį 4 kartus, fluorescuojančių lašelių skaičius priartėjo prie apskaičiuotos teorinės vertės (3.3 lentelė 2 mėginys ir 3.6. pav. b ir d). Ne tik buvo priartėta prie teorinio fluorescuojančių lašelių skaičiaus, tačiau buvo pastebėta, kad beveik kiekvienas fluorescuojantis lašelis turi kelis ryškius taškus. Padidinus ne tik polimerazės kiekį, bet ir dNTP kiekį 5 kartus (lyginant su įprastomis reakcijos sąlygomis), bendra lašelio fluorescencija tapdavo intensyvesnė, o dauguma lašelių turėdavo vieną fluorescuojantį tašką (3.3 lentelė 3 mėginys ir 3.6. pav. c ir e). Kartojant DNR padauginimo eksperimentus, fluorescuojančių dalelių atsiradimas atsikartodavo. Eksperimentai šiomis sąlygomis kartoti du kartus.

Norint daugiau sužinoti apie fluorescuojančias daleles, buvo suardyta emulsija po DNR padauginimo ir reakcijos produktai buvo tiriami peršviečiamu elektroniniu mikroskopu (angl. *transmission electron microscope* – TEM) bei skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM, darbą atliko Vaidotas Kiseliovas). TEM nuotraukose buvo matomos gijos ir tamsūs objektai, panašūs į polimorfinius kristalus (3.7 pav. a). SEM nuotraukose



**3.6. pav.** DNR padauginimas mikrolašeliuose. (a) paveikslelyje yra pavaizduoti DNR padauginimo rezultatai naudojant pradinės reakcijos sąlygas ir pridėdant poloksamero 407 ir DNR išlydymo žingsnį, (b) paveikslėlyje – tas pats, kaip (a), tik 4 kartus padidintas phi29 DNR polimerazės kiekis, (c) – tas pats, kaip (b), tik 5 kartus padidintas dNTP kiekis. (d) ir (e) paveikslėliuose yra labiau priartinti (b) ir (c) mėginiai.



**3.7 pav.** DNR padauginimas mikrolašeliuose. Paveikslėliuose yra pavaizduotos nuotraukos darytos po DNR padauginimo, kai reakcija buvo vykdoma su poloksameru 407 F-127, DNR išlydymo žingsniu, 4 kartus padidintu phi29 DNR polimerazės kiekiu ir 5 kartus padidintu dNTP kiekiu. Dalelių TEM nuotrauka pavaizduota (a) ir SEM - (b) paveikslėliuose.

aiškiai matėsi pačių kristalų paviršius (3.7 pav. b).

Kitų autorių darbuose, kuriuose buvo naudojama phi29 DNR polimerazė, buvo rastos dalelių TEM nuotraukos, kurios atrodė labai panašios į mūsų gautas daleles (Zhu ir kt., 2013). Minimame darbe reakcija buvo vykdoma naudojant riedančio rato amplifikacijos (RCA) metodą, o ne daug pradmenų naudojantį riedančio rato DNR padauginimo metodą (mpRCA). Kitų autorių darbuose tokių dalelių susidarymas buvo stebimas ne tik po DNR padauginimo reakcijos, bet ir po RNR padauginimo (Shopsowitz ir kt., 2014). Pastarajame darbe autoriai parodė dalelių susidarymą po RNR padauginimo naudojant T7 RNR polimerazę. Šių dalelių branduolys buvo sudarytas iš  $Mg_2P_2O_7 \times 3,5 H_2O$ , o RNR daugiausiai buvo išsidėsčiusi dalelių paviršiuje. RNR sudarė ~15-21 % visos dalelių masės. Dr. Rapolas Žilionis taip pat atliko DNR padauginimo eksperimentus su ir be pirofosfatazės (fermentas katalizuojantis pirofosfato skilimą į ortofosfatą). Juose buvo nustatyta, kad naudojant šį fermentą dalelės nesusidaro. Dalelių sudėtis buvo papildomai patvirtinta, kai daleles buvo gautos sumaišius DNR su magnio ir pirofosfato jonais (Galiniš ir kt., 2016). Remiantis šių darbų rezultatais, galima teigti, kad magnio pirofosfato dalelės, susidarancios po DNR padauginimo, adsorbuoja padaugintą DNR savo paviršiuje ir natūraliai veikia kaip NR nešiklis. Nusprendėme panaudoti šią savybę, kad galėtume pernešti padaugintą DNR iš amplifikacijos reakcijos į lašelius, turinčius *in vitro* transkripcijos ir translacijos reakcijos komponentus. Sėkmingai tai

atlikę galėtume supaprastinti kryptingos evoliucijos eksperimento eigą ir išvengtume papildomų mikroskysčių etapų, reikalingų skirtingų reakcijų apjungimui (lašelių suliejimo (Mazutis ir kt., 2009) ar pikoinjekcijos (Abate ir kt., 2010)). Mūsų hipotezę rėmė ir kitų autorių darbai, kuriuose tokios dalelės buvo naudojamos, kaip DNR šaltinis sekoskaitai (Drmanac ir kt., 2010).

Atliekant DNR padauginimo eksperimentus pastebėta, kad dalelių kiekis po skirtingų eksperimentų svyravo nuo 1,5 dalelės vienam fluorescuojančiam lašeliui iki 0,1 dalelės fluorescuojančiam lašeliui. Darbo metu nepavyko iki galo išsiaiškinti priežasčių, kurios lemdavo susidarančių dalelių kiekį. Galbūt dalelių kiekiui įtakos turėdavo polimerazės kokybė, DNR kokybė, reakcijos inaktyvacija karščiu ar kiti komponentai: naudojamo surfaktanto kokybė ar SYBR Safe naudojimas padauginimo reakcijos metu.

Optimalios DNR padauginimo sąlygos (4 kartus padidintas DNR polimerazės kiekis ir 5 kartus padidintas dNTP kiekis) buvo naudojamos visuose kituose DNR padauginimo eksperimentuose. Šiomis sąlygomis dažnai pavykdavo gauti puikius DNR padauginimo rezultatus, t. y. eksperimente gautas fluorescuojančių lašelių kiekis atitikdavo teoriškai laukiamą rezultatą. Tačiau tokius rezultatus ne visada pavykdavo pakartoti. Buvo spėjama, kad dalis pavienių DNR molekulių yra prarandamos dėl nespecifinės adsorbcijos ruošiant pagrindinį DNR tirpalą.

### 3.3.3. Nespecifinė adsorbcija

Atliekant eksperimentus fluorescuojančių lašelių kiekis ne visuomet atsikartodavo, t. y. būdavo gaunamas mažesnis fluorescuojančių lašelių kiekis, nei teoriškai tikėtasi (ši problema atsikartojo du kartus). Buvo spėjama, kad dalis DNR gali būti prarandama dėl nespecifinės molekulių adsorbcijos ant paviršiaus. Yra žinoma, kad įprasti polipropileno mėgintuvėliai gali adsorbuoti daugiau nei 10 ng DNR. Turint mažas DNR koncentracijas, t. y. mažiau nei 100 pg/μl, dėl nespecifinės adsorbcijos galima prarasti iki 95 % medžiagos (Gaillard ir Strauss, 1998). Tai ypač svarbu mūsų vykdomuose eksperimentuose, nes DNR tirpalus turėdavome skiesti iki 10-50 pg/μl. Norėjome sumažinti nespecifinę DNR adsorbciją labai praskiestuose tirpaluose, todėl nusprendėme išbandyti keletą skirtingų mėgintuvėlių rūšių ir cheminį priedą, mažinantį biomolekulių adsorbciją.

Pradėjome nuo naujai išgrynintos DNR. Šio tirpalo koncentraciją nustatėme dvejais skirtingais būdais: spektrometriškai ir densitometriškai. Šis DNR tirpalas buvo skiedžiamas arba tik vandeniu, arba vandeniu,

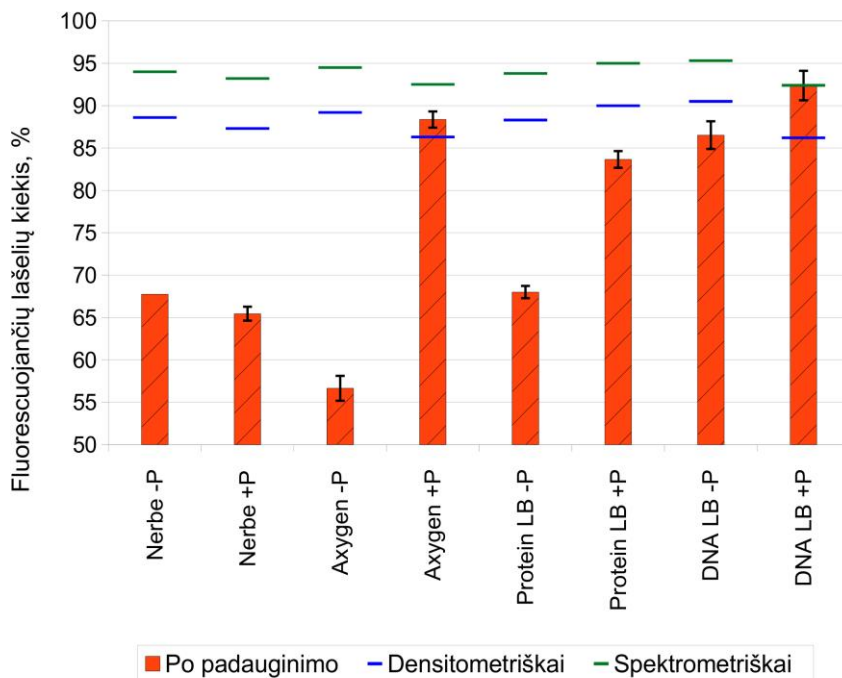
turinčiu 0,4 % (w/v) poloksamero 407, iki 40 pg/ $\mu$ l koncentracijos. Tuomet gauti tirpalai išpilstyti į skirtingų rūšių mėgintuvėlius: „Nerbe Plus“, „Axygen MAXYMUM RECOVERY“, „Eppendorf Protein LoBind“ ir „Eppendorf DNA LoBind“. Taip paruošti tirpalai buvo inkubuoti 37°C 3 valandas (pasiekama maksimali adsorbcija, Gaillard ir Strauss, 1998). Po inkubacijos šie tirpalai buvo panaudoti ruošiant DNR padauginimo reakciją mikroskysčių lašeliuose (3.3 lentelė, 3 mėginio sąlygomis). Eksperimentas kartotas du kartus.

Remiantis DNR koncentracijomis nustatytais densitometriniu bei spektrometriniu būdais ir gautų lašelių dydžiu, buvo apskaičiuota kiek fluorescuojančių lašelių yra teoriškai tikimasi kiekviename mėginyje (žali ir mėlyni brūkšneliai 3.8. pav.). Šalia teorinių verčių buvo atidėti praktiškai nustatyti fluorescuojančių lašelių kiekiai (raudoni stulpeliai su įstrižais brūkšneliais 3.8. pav.). Gauti rezultatai atitiko literatūroje aprašytus faktus apie nejoninį surfaktantą poloksamerą 407. Jo pridėjimas visuose mėginiuose sumažino DNR praradimą dėl nespecifinės adsorbcijos. Vienintelė išimtis yra „Nerbe Plus“ mėgintuvėliai, kuriuose nepastebėta jokio skirtumo naudojant ar nenaudojant poloksamero 407. Mažiausia nespecifinė adsorbcija pasižymėjo mėginiai, gauti naudojant „Axygen MAXYMUM RECOVERY“ ir „Eppendorf DNA LoBind“ mėgintuvėlius, kai buvo naudotas 0,4 % (w/v) poloksamero 407. Buvo bandoma išsiaiškinti priežastis lemiančias šias mėgintuvėlių savybes. Tiek Axygen, tiek Eppendorf įmonių atstovai teigė, kad jų mėgintuvėliai neturi jokio cheminės prigimties paviršiaus paruošimo, o rezultatas yra pasiekiamas specialiu būdu poliruojant plastiką (asmeninis susirašinėjimas). Todėl tikėtina, kad nespecifinės adsorbcijos priežastys yra ne tik cheminės, bet ir fizikinės, pavyzdžiui, įvairūs mikrodefektai plastiko paviršiuje.

Visuose žemiau aprašomuose eksperimentuose DNR padauginimas buvo atliekamas naudojant DNR tirpalą paruoštą „Eppendorf DNA LoBind“ mėgintuvėliuose, o DNR skiedimui buvo naudojamas tirpalas, turintis 0,4 % (w/v) poloksamero 407.

#### 3.3.4. Kitos DNR padauginimo sąlygos

Iš ankstesnių eksperimentų (3.3.2 skyrius) buvo žinoma, kad phi29 DNR polimerazės ir dNTP kiekio padidinimas padidino fluorescuojančių lašelių kiekį ir šiose sąlygose buvo gaunamos magnio pirofosfato dalelės, dekoruotos DNR. Remiantis ta pačia eksperimentine patirtimi, buvo



**3.8. pav.** DNR padauginimas, kai skiestas DNR tirpalas inkubuotas skirtinguose mėgintuvėliuose. Skirtinguose mėginiuose, lašelių dydis nežymiai skyrėsi, todėl teoriškai tikėtinas fluorescuojančių lašelių kiekis irgi varijuoja nežymiai. Žaliais brūkšneliais yra pavaizduotas teorinis fluorescuojančių lašelių kiekis, apskaičiuotas remiantis densitometriškai nustatyta DNR koncentracija, o mėlyniais – spektrometriškai. Po DNR padauginimo reakcijos praktiškai nustatytas fluorescuojančių lašelių kiekis, pavaizduotas raudonais stulpeliais su pasvirusiais brūkšniais. Paklaidos režiuose atidėta standartinė lašelių skaičiavimo paklaida. „+/-P“ - žymi ar buvo naudotas poloksameras 407, kai DNR buvo skiedžiama. Nerbe – „Nerbe Plus“, Axygen - „Axygen MAXIMUM RECOVERY“, Protein LB - „Eppendorf Protein LoBind“ ar DNA LB - „Eppendorf DNA LoBind“ mėgintuvėliai.

bandoma patikrinti, ar galima dar labiau optimizuoti turimas reakcijos sąlygas.

Buvo paruoštas bendras reakcijos mišinys, išpilstytas į atskirus mėgintuvėlius ir atskirai pridėti skirtingi phi29 DNR polimerazės ir dNTP kiekiai. Po 16 valandų inkubavimo 30°C ir 10 min 65 °C analizuotos atskirų mėginių emulsijos fluorescenciniu mikroskopu. Eksperimentas kartotas du kartus. Vieno iš eksperimentų rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.

Dauginant DNR lašeliuose anksčiau aprašytomis sąlygomis (3.4 lentelė 1 mėginys ir 3.9. pav. (a)) praktinis fluorescuojančių lašelių kiekis beveik pasiekdavo teoriškai laukiamą kiekį. Taip pat šiose sąlygose būdavo daugiausiai lašelių, turinčių vieną ryškią dalelę. Vykdamas DNR padauginimą šiomis sąlygomis būdavo galima greitai ir lengvai įvertinti susidariusių dalelių kiekį ir kokybę.

Didinant polimerazės kiekį DNR padauginimo mišinyje, buvo galima pastebėti dvi tendencijas: fluorescuojančių lašelių kiekis mažėdavo, o dalelių kokybė prastėdavo (3.4 lentelė 4 ir 6 mėginiai ir 3.9. pav. (c) ir (d)). Lašelių, turinčių vieną ryškią dalelę, beveik nebebuvo, o dauguma lašelių turėdavo daug smulkių dalelių. Todėl buvo nuspręsta, kad 0,8 U/μl phi29 DNR polimerazės yra optimalus kiekis.

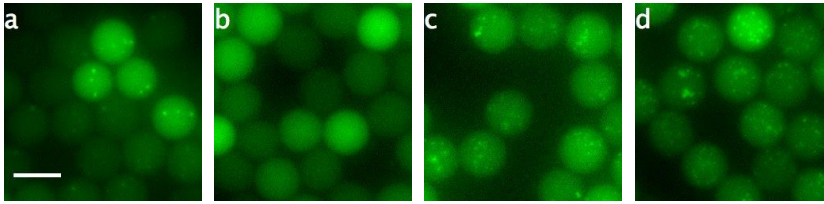
**3.4. lentelė.** DNR padauginimo rezultatai, didinant polimerazės ir dNTP kiekius<sup>3</sup>

Mėginio Nr.	Polimerazė, U/μl	dNTP, mM	Teorinis fluorescuojančių lašelių kiekis, %	Praktinis fluorescuojančių lašelių kiekis, %	Ar yra dalelės?
1.	0,8	1	68 ± 4,1	65 ± 4,6	Taip, po vieną ryškią lašelyje
2.	0,8	2	74 ± 3,5	86 ± 4,0	Ne
3.	0,8	4	77 ± 3,0	47 ± 2,5	Ne
4.	2	1	79 ± 1,5	42 ± 5,1	Taip, po keletą neryškių lašelyje
5.	2	2	76 ± 2,6	61 ± 10,5	Ne
6.	4	1	71 ± 2,7	56 ± 4,4	Taip, po keletą neryškių lašelyje

Didinant dNTP kiekį buvo stebimi kitokie efektai. Fluorescencija tapdavo vienoda visame lašelio tūryje ir nebebuvo galima matyti dalelių. Toks rezultatas būdavo pasiekiamas jei polimerazės kiekis buvo 0,8 ar 2 U/μl (3.4.

3- kitos DNR padauginimo sąlygos kaip 3.2 lentelėje, tik nedėta BSA ir SYBR Safe.



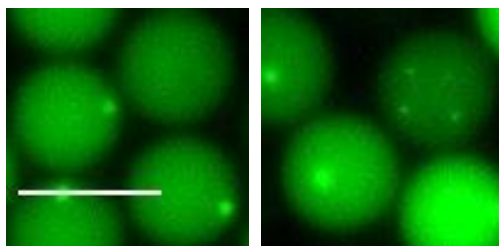


**3.9. pav.** DNR padauginimas mikrolašeliuose. (a) nuotraukoje yra mėginys, kuriame DNR padauginimas vykdytas įprastomis sąlygomis, t. y.  $0,8 \text{ U}/\mu\text{L}$  polimerazės ir  $1 \text{ mM}$  dNTP. (b) – polimerazės kiekis paliktas toks pats, kaip ir (a), o dNTP padidintas iki  $2 \text{ mM}$ . (c) nuotraukoje dNTP kiekis kaip ir (a), o polimerazės kiekis padidintas iki  $2 \text{ U}/\mu\text{l}$ . (d) nuotraukoje dNTP kiekis kaip ir (a), o polimerazės kiekis padidintas iki  $4 \text{ U}/\mu\text{l}$ . Skalė visose nuotraukose yra lygi  $20 \mu\text{m}$ .

lentelė 2, 3 ir 5 mėginiai ir 3.9. pav. (b)). Nors dalelės nebuvo matomos fluorescencinėse nuotraukose, tačiau DNR elektroforezės rezultatai ir TEM nuotraukos patvirtindavo apie tai, kad dalelės susidarydavo. Nėra žinoma tiksliai priežastis, kodėl nematėme dalelių lašeliuose padidinus dNTP kiekį. Vienas iš galimų paaiškinimų galėtų būti susijęs su  $\phi\text{I}29$  DNR polimerazės egzozonukleaziniu aktyvumu. Esant didesniai dNTP kiekiui, šis aktyvumas yra slopinamas, todėl net ir po ilgesnio inkubavimo laiko laisvos DNR koncentracija lašeliuose nemažėja ir šios DNR fluorescencija neleidžia gerai matyti dalelių fluorescencijos. Esant mažesniai dNTP kiekiui, jie greičiau yra sunaudojami sintezės reakcijos metu ir  $\phi\text{I}29$  DNR polimerazės egzozonukleazinis aktyvumas degraduoja dalį susintetintos DNR, todėl dalelių fluorescencija tampa geriau matoma (del Prado ir kt., 2019, Pan ir kt., 2008). Kitas efektas, kuris buvo stebimas padidinus dNTP koncentraciją iki  $2 \text{ mM}$ , yra didesnis fluorescuojančių lašelių kiekis nei teoriškai tikėtasi (3.4 lentelė 2 mėginys). Toks rezultatas buvo gautas kelis kartus kartojant eksperimentą. Šis neatitikimas galimas dėl dviejų priežasčių: nustatyta pradinė DNR koncentracija yra netiksli arba amplifikacijos reakcija yra užteršta svetimais DNR. Užteršti reakcijos mišinį ar vieną iš komponentų yra labai paprasta, nes užtenka vos keletos pikogramų žiedinės DNR ir amplifikacija įvyks. Šie rezultatai taip pat parodo, kad  $1 \text{ mM}$  dNTP koncentracija nėra optimali norint gauti maksimalų fluorescuojančių lašelių kiekį. Tačiau visi tolimesni eksperimentai buvo vykdomi naudojant  $1 \text{ mM}$  dNTP koncentraciją, kad būtų galima greitai ir patogiai įvertinti, ar dalelės susidarė ir kokia jų kokybė. Didinant dNTP kiekį dar daugiau, fluorescuojančių lašelių kiekis pradėdavo mažėti (3.4 lentelė 3 mėginys).

### 3.3.5. Inaktyvavimo karščiu įtaka

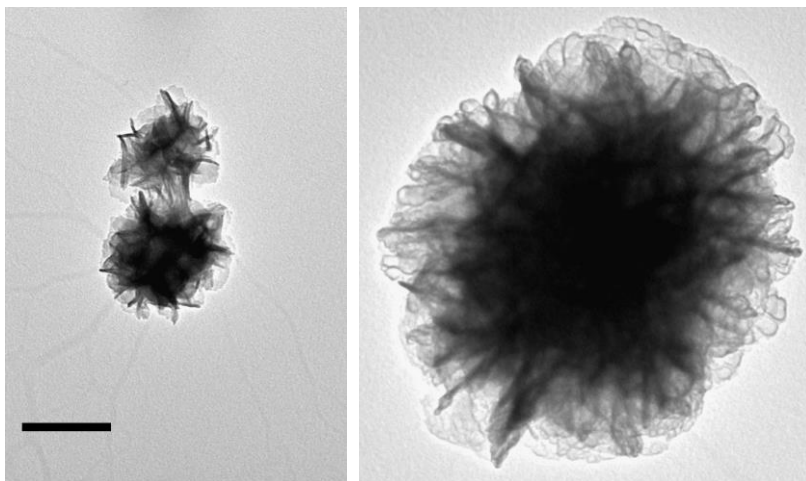
Atliekant DNR padauginimo eksperimentus, buvo pastebėta, kad lašeliai gali turėti vieną ryškią dalelę arba keletą smulkesnių ir mažiau ryškių dalelių. Vėliau buvo pastebėta, kad šiam reiškiniui įtakos turi phi29 DNR polimerazės inaktyvavimas karščiu. Neinaktyvuojant phi29 DNR polimerazės, lašeliai arba turėdavo vieną ryškią dalelę, arba neturėdavo jokių dalelių. Inaktyvuojant phi29 DNR polimerazę 10 minučių 65°C, beveik visi lašeliai turėdavo daleles, tik kai kuriuose lašeliuose buvo stebima ne viena ryški dalelė, o keleta smulkesnių ir silpniau fluorescuojančių dalelių (3.10. pav.). Todėl buvo nuspręsta atidžiau įvertinti dalelių dydžių pasiskirstymą po amplifikacijos.



**3.10. pav.** Fluorescencinės nuotraukos po DNR padauginimo reakcijos. Kairėje nuotraukoje matome emulsiją, kuri nebuvo inaktyvuota karščiu (65°C 10 minučių), o dešinėje – emulsiją, kuri buvo inaktyvuota karščiu. Kairėje nuotraukoje, kai kuriuose lašeliuose matomos pavienės ryškios dalelės, o dešinėje nuotraukoje galima pastebėti lašelius turinčius keletą smulkių ir mažiau ryškių dalelių. Skalė lygi 20  $\mu\text{m}$ . Nuotraukos darytos Karolio Simučio.

Po 16 valandų DNR padauginimo lašeliuose (šiam eksperimente naudota pIVEX2.2EM-lacZ-his plazmidė) emulsija buvo atskirta į du mėgintuvėlius ir vienas mėginys buvo inaktyvuojamas karščiu (65°C 10 minučių). Abi emulsijos grąžintos į 30°C ir inkubuotos toliau. Iš šių emulsijų buvo paimama dalis mėginio nuo padauginimo reakcijos pradžios praėjus 17, 38 ir 66 valandoms. Paimta emulsija suardyta ir reakcijos produktai stebėti peršviečiamu elektroniniu mikroskopu (3.11. pav.), o ImageJ programa buvo įvertinti matomų dalelių dydžiai ir dydžių pasiskirstymai (3.12. pav.). Šis eksperimentas atliktas vieną kartą.

Kai emulsija neinkubuojama 65°C 10 minučių, gaunamų dalelių vidutinis dydis būdavo ~1300 nm ir beveik visos dalelės būdavo didesnės nei 700 nm



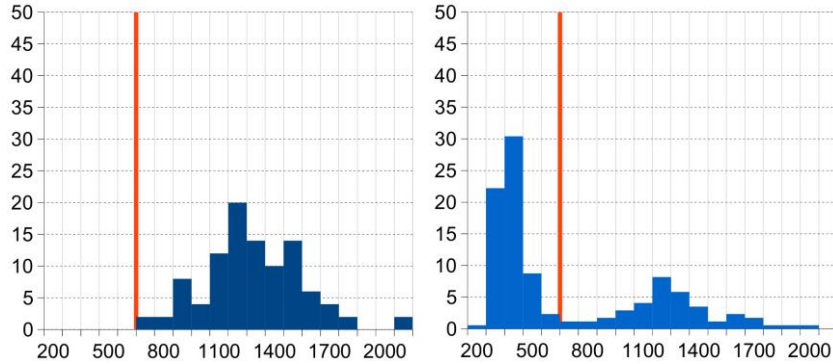
**3.11. pav.** TEM nuotraukos, kuriose pavaizduotos skirtingų dydžių dalelės. Kairėje nuotraukoje matome dvi 310 ir 356 nm daleles, susidariusias reakcijos mišinį inkubuojant 65°C 10 minučių. Dešinėje nuotraukoje matome vieną 1212 nm dydžio dalelę. Skalė lygi 250 nm.

(tik viena iš 131 matuotos dalelės, buvo 530 nm dydžio, 3.12. pav. apatinis grafikas kairėje). Tačiau, jei polimerazė buvo inaktyvuojama karščiu, tai didelės dalelės (700 - 2000 nm) sudarydavo mažesnę dalį visos dalelių populiacijos, t. y. tik 18-30 %. O mažesniųjų dalelių vidutinis dydis būdavo ~350 nm ir jų skaičius išaugdavo (vidurkis dalelių, kurios yra mažesnės nei 700 nm, 3.12. pav. grafikai dešinėje pusėje ir 3.11. pav. dešinė nuotrauka).

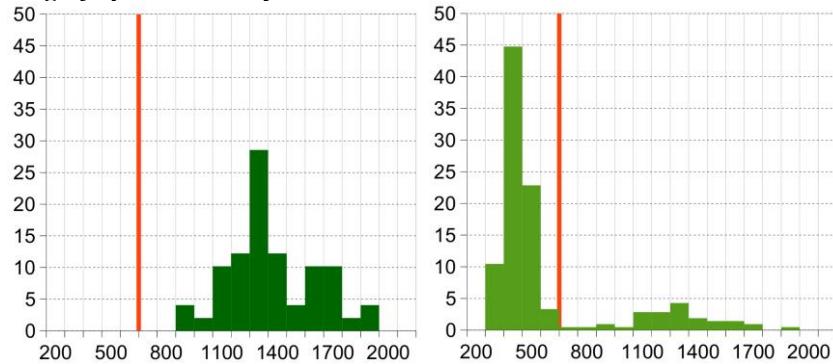
Panašius rezultatus, naudodamas dinaminį šviesos sklaidymo metodą, gavo ir Vaidotas Kisieliovas (DLS, 3.13. pav.). Mažesniųjų dalelių vidurkis buvo  $152 \pm 37$  nm (93,5 % visų dalelių), o didesniųjų dalelių –  $1669 \pm 645$  nm (6,5% visų dalelių). Šiuo metodu gauta didesnė mažesniųjų dalelių dalis, lyginant su rezultatais gautais iš TEM nuotraukų. DLS metodas yra mažiau tinkamas matuoti nevienalytę dalelių populiaciją. Taip pat, matuojant šiuo metodu didesnės dalelės galėjo greičiau sedimentuoti mėgintuvėlio dugne ir galėjo būti prasčiau detektuojamos. Tačiau vis dar nėra žinoma, kodėl DLS metodu nustatytas mažesniųjų dalelių vidutinis dydis ~2 kartus skyrėsi nuo dydžio nustatyto iš TEM nuotraukų.

Nustačius, jog mažesniosios dalelės susidaro dėl inaktyvavimo karščiu, liko neatsakyta, kokiū būdu jos susidaro? Galbūt didžiosios dalelės pasižymi temperatūriniu nestabilumu? Tokiu atveju keliant temperatūrą dalis

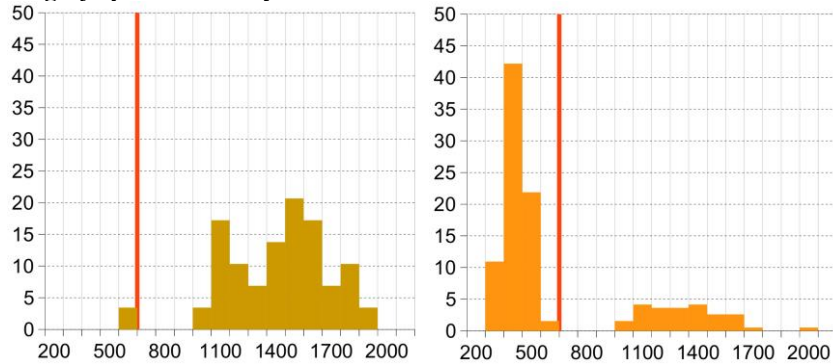
### Mėginys po 17 valandų:



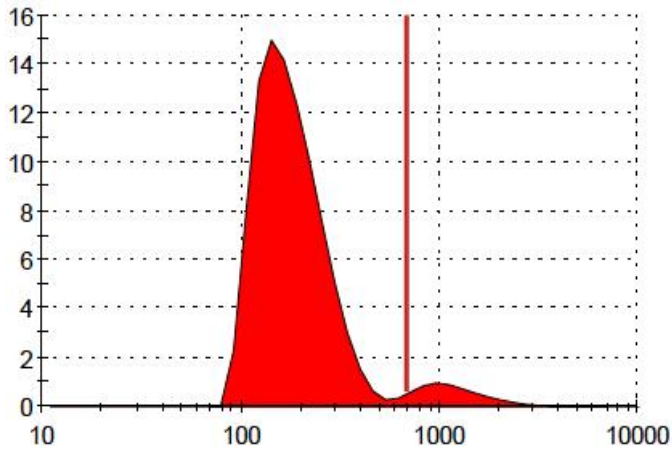
### Mėginys po 38 valandų:



### Mėginys po 66 valandų:



**3.12. pav.** Dalelių dydžių pasiskirstymas po DNR amplifikacijos. Kairėje pusėje pateikti DNR dalelių dydžio pasiskirstymo grafikai, kai emulsija po amplifikacijos nebuvo inkubuojama 65°C 10 minučių, o dešinėje pusėje – kai buvo inkubuojama 65°C 10 minučių. Dalelių dydžiai įvertinti nuo amplifikacijos pradžios praėjus 17, 38 ir 66 valandoms (atitinkamai pažymėti mėlyna, žalia ir geltona spalvomis). Grafikų x ašyje yra atidėtas dalelių dydis nanometrais, o y ašyje yra atidėtas dalelių kiekis procentais. Raudona vertikali linija kiekviename grafike žymi 700 nanometrų ribą.



**3.13. pav.** Dalelių dydžių pasiskirstymas po DNR amplifikacijos. Dalelių dydis įvertintas naudojant DLS metodą po DNR amplifikacijos. Grafiko x ašyje yra atidėtas dalelių dydis nanometrais, o y ašyje yra atidėtas dalelių kiekis procentais. Raudona vertikali linija žymi 700 nanometrų ribą.

polimorfinio kristalo suskyla, o atskilę gabaliukai ir yra mažesnės dalelės. Kitas galimas paaiškinimas galėtų būti tirpalo komponentų kristalizavimasis dėl poveikio karščiui, taip sudarant naujas, mažesnes daleles.

Tikslus dalelių susidarymo mechanizmas nėra žinomas, bet buvo pastebėta, kad paveikus emulsiją karščiui absoliutus dalelių kiekis padidėja. Mėginys, 65°C paveiktas 10 minučių, turėdavo daugiau lašelių su dalelėmis, nei mėginys nepaveiktas karščiui (3.10. pav.). Dalelių pagausėjimo faktastaip pat buvo patvirtintas ir gryninimo eksperimentų metu. Lyginant emulsiją inaktyvuotą karščiui su emulsija neinaktyvuota karščiui, bendras dalelių skaičius visada būdavo didesnis (1,4 – 3 kartus).

#### 3.4. DNR dalelių gryninimas

DNR padauginimo reakcijos metu susidaro kristalai, panašūs į kitų autorių aprašytas daleles (Shopsowitz ir kt., 2014). Nors aprašytuose darbuose buvo amplifikuojama RNR, tačiau dėl RNR ir DNR panašumo, taip pat dėl to, kad NR buvo padauginamos naudojant fermentus izoterminėmis sąlygomis, buvo manoma, kad mūsų darbų metu gautos dalelės turėtų būti panašios. Todėl buvo daroma prielaida, kad DNR padauginimo reakcijos metu susidaro magnio pirofosfato kristalai dekoruoti padauginta DNR. Ši Dalis DNR esančios reakcijos mišinyje adsorbuojasi kristalų paviršiuje (magnio pirofosfato kristalai padengti DNR toliau tekste

vadinami dalelėmis), o kita dalis DNR lieka tirpale. Suardžius emulsiją, neadsorbuota DNR gali laisvai difunduoti tirpale, todėl tokį tirpalą inkapsuliuavus antrą kartą, baltymo sintezė lašelyje galės vykti tiek nuo DNR esančios ant dalelės, tiek nuo „laisvos“ DNR esančios tirpale. Tokiu atveju būtų neįmanoma atskirti kuri DNR koduoja aktyvų mutantą ir atranka būtų neveiksminga. Todėl reikėjo surasti būdą kaip atskirti tirpale likusią DNR nuo DNR esančios ant dalelių (3.1. pav. E – D). Žemiau aprašytuose DNR dalelių gryninimo eksperimentuose buvo naudojama tik pET-29b(+)\_EGFP plazmidė.

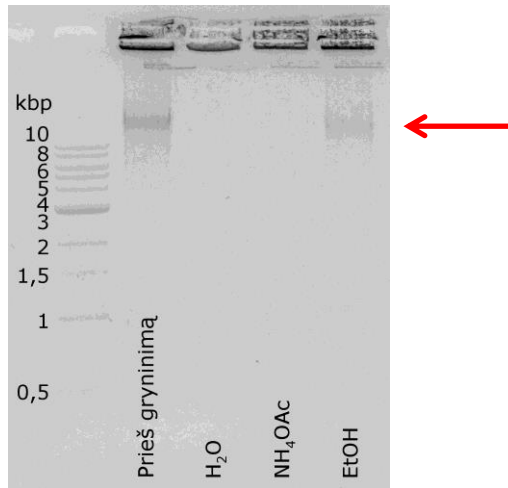
#### 3.4.1. DNR dalelių gryninimas iš agarozės

Analizuojant padaugintos DNR reakcijos mišinį 1% agarozės gelyje, dalis reakcijos produktų migruoja gelyje įprastai, o dalis produktų lieka šulinėlyje (3.14. pav. antras takelis iš kairės). Buvo spėjama, kad šulinėlyje lieka dalis dalelių. Šiuos spėjimus lėmė ir tai, kad vidutinis dalelių dydis yra ~1300 nm, o 1% agarozės porų dydis yra ~250 nm (įprastos agarozės) ir ~650 nm (žemos lydymosi temperatūros agarozės) (Narayanan ir kt., 2006). Dėl to dalelių gryninimui buvo nuspręsta pritaikyti įprastą DNR gryninimą iš žemos lydymosi temperatūros agarozės.

Dalelių ir laisvos DNR mišinys užnešamas į šulinėlį ir leidžiama srovė. Atlikus elektroforezę, iš gelio buvo išpjaunamas šulinėlis ir naudojant fermentą  $\beta$ -agarazę DNR dalelės buvo gryninamos pagal gamintojo pateikiamas rekomendacijas. Hidrolizavus agarozę, reakcijos mišinys buvo maišomas su: i) 2,5 tūrio vandens arba ii) 2,5 tūrio gryno etanolio arba iii) 1 tūriu 5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ . Dalelės buvo surenkamos centrifuguojant 30 minučių 17500 g. Gauti rezultatai yra pateikti paveiksle žemiau (3.14. pav.).

Maišant dalelių ir hidrolizuotos agarozės tirpalą su etanoliu buvo gautos baltos nuosėdos mėgintuvėlio dugne. Ištirpinus gautas nuosėdas ir išanalizavus produktus agarozės gelyje, vėl buvo matoma juostelė, kuri galėtų būti siejama su DNR neadsorbuota ant dalelių (3.14. pav., penktas takelis iš kairės, raudona rodyklė). Tačiau jei dalelių ir hidrolizuotos agarozės tirpalas buvo maišomas su vandeniu ar amonio acetato tirpalu, tai tokia juostelė nebuvo matoma (3.14. pav., trečias ir ketvirtas takeliai iš kairės).

Iš atliktų eksperimentų buvo sunku pasakyti, kodėl naudojant etanolį neadsorbuotas DNR juostelė vėl buvo matoma agarozės gelyje. Galbūt etanolis taip sulipdo DNR daleles į nuosėdas, kad nuosėdų tirpinimo metu

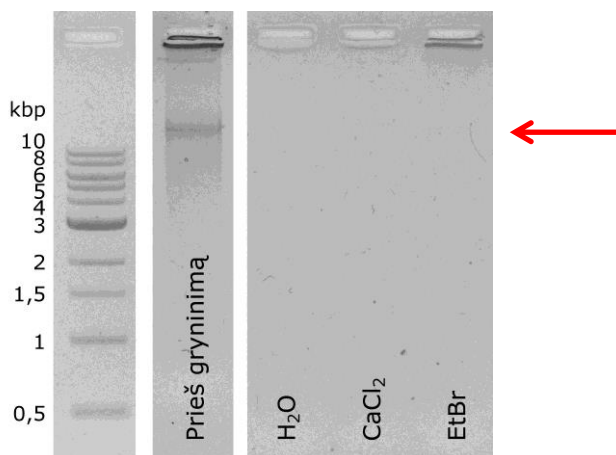


**3.14. pav.** 1 % agarozės gelio nuotrauka. Pirmame takelyje iš kairės pusės yra DNR masės žymuo, antrame – mėginys po DNR padauginimo, trečiame, ketvirtame ir penktame – mėginiai po DNR dalelių gryninimo iš žemos lydymosi temperatūros agarozės, kai galutiniame gryninimo etape buvo pridėta vandens, amonio acetato ar etanolio, atitinkamai. Iškart po šulinėliais yra matomos juostelės, kurios lyginant su šulinėliais yra pasislinkusios dešiniau. Šios juostelės yra šulinėliuose esančių produktų atspindžiai. Raudona rodyklė žymi gelio ruožą, kuriame migruoja prie dalelių neadsorbuota DNR.

dalis DNR atsilaisvina nuo dalelių ir patenka į tirpalą? Galbūt etanolio poveikyje kristalizuojant DNR, DNR kristalai yra linkę susidaryti ne dalelių paviršiuje? Taip pat negalima atmesti galimybės, kad etanolis gali turėti įtakos dalelių stabilumui ar DNR ir magnio pirofosfato sąveikos stiprumui. Dalelių išsodinimui iš tirpalo buvo išbandyti ir kiti metodai. Neadsorbuotos DNR juostelė atsirasdavo gelyje, kai daleles iš hidrolizuotos agarozės tirpalo buvo mėginama išgryninti naudojant polietilenglikolio tirpalą (9 % (w/v)), poloksamero 407 (14 % (w/v)) tirpalą ar dializuojant.

Pakartoti dalelių gryninimą iš agarozės ne visada pavykdavo – dalelių tiesiog nelikdavo agarozės šulinėlyje. Vėliau buvo pastebėta, kad dalelės nesėda centrifuguojant, nes tirpale nėra etidžio bromido (3.15. pav.). Nors į DNR interkaliavęs etidžio bromidas galėtų neigiamai paveikti *in vitro* transkripciją, tačiau dėl jo svarbos dalelių išsodinime jis buvo naudojamas ir toliau.

Dalelių kiekis prieš gryninimą ir po jo buvo įvertinamas pasitelkiant fluorescencinį mikroskopą. Dalelės buvo dažomos SYBR Green dažu ir



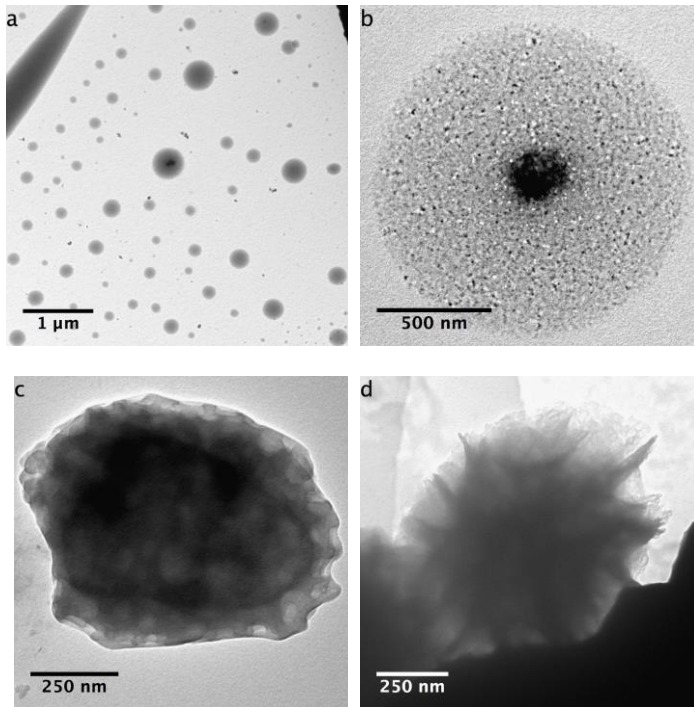
**3.15. pav.** 1 % agarozės gelio nuotrauka. Pirmame takelyje iš kairės pusės yra DNR masės žymuo, antrame – mėginys po DNR padauginimo, trečiame, ketvirtame ir penktame – mėginiai po DNR dalelių gryninimo iš žemos lydymosi temperatūros agarozės, kai galutiniame gryninimo etape buvo pridėta vandens, 10 mM kalcio chlorido ar 1 µg/ml etidžio bromido. Iškart po kai kuriais šulinėliais yra matomos juostelės, kurios lyginant su šulinėliais yra pasislinkusios kairiau. Šios juostelės yra šulinėliuose esančių produktų atspindžiai. Raudona rodyklė žymi gelio ruožą, kuriame migruoja prie dalelių neadsorbuota DNR.

paskleidžiamos hemocitometre. Nustatyta, kad šio gryninimo metodo efektyvumas buvo mažas ir svyravo nuo 1,3 iki 5,5 %. Šis efektyvumas nustatytas iš keturių eksperimentų.

Po gryninimo dalelės vėl būdavo matomos agarozės gelio šulinėliuose arba fluorescuojančio optinio mikroskopo nuotraukose, tačiau bandant gauti išgrynintų dalelių elektroninio mikroskopo nuotraukas, buvo labai sunku rasti daleles ant tinklelio (3.16. pav.). Visas tinklelis būdavo nuklotas didesniais ar mažesniais apskritimais. Dauguma apskritimų būdavo vienodos tekstūros, o kai kurie turėdavo tamsią dėmę apskritimo centre (3.16. pav. a – objektas centre ir b). Labai retai, bet pavykdavo aptikti objektus, kurie būdavo panašūs į aptirpusią dalelę, kurios vidinė struktūra dar būdavo šiek tiek matoma ir būdavo panaši į sveikos dalelės (3.16. pav. c). Visame tinklelyje pavyko atrasti tik kelias neaptirpusias daleles (3.16. pav. d).

Šis eksperimentas nebuvo kartojamas daug kartų, nes gryninimo metodas nėra labai efektyvus. Tačiau gautas rezultatas gali būti paaiškintas literatūriniais duomenimis. Yra žinoma, kad magnio pirofosfato dalelės ištirpsta paveiktos 10 s 5 mM EDTA tirpalu (Shopsowitz ir kt., 2014).





**3.16. pav.** TEM nuotraukos po gryninimo iš žemos lydymosi temperatūros agarozės. (a) nuotraukoje yra įprastas tinklelio vaizdas iš toliau, (b) nuotraukoje yra priartintas vienas iš apskritimų, (c) – yra aptirpusi dalelė, (d) – neaptirpusi dalelė. (c) ir (d) nuotraukose matomos dalelės buvo vos kelios visame tinklelyje.

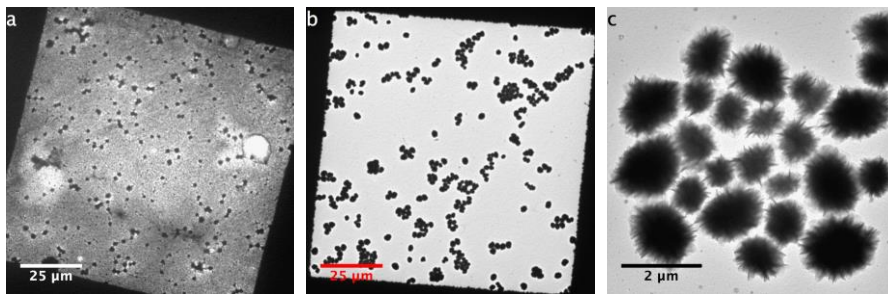
Daleles gryninat iš agarozės gelio, EDTA koncentracija buferyje yra 1 mM. Valandą laiko inkubavus daleles EDTA turinčiame buferyje, labai tikėtina, kad Mg-PP<sub>i</sub> kristalas ištirpsta ir lieka tik jį apsvijusios DNR kamuolys. Daugybino nustūmimo metodu vykdoma amplifikacija yra chaotiškas procesas, paprastai turintis daugybę pradžios taškų ir daug DNR vijų. Labai tikėtina, kad tokia DNR galėtų likti „susipainiojusi“ ir susivijusi į rutulį ir galėtų būti matoma peršviečiamo elektroninio mikroskopo nuotraukose kaip apskritimas (3.16. pav. a ir b).

#### 3.4.2. DNR dalelių gryninimas panaudojant REazę ir centrifugavimą

Dalelių išgryninimas iš žemos lydymosi temperatūros agarozės turėjo gana mažą išeią ir dažnai baigdavosi nesėkme. Todėl buvo daug dirbama bandant rasti alternatyvų būdą, kuris būtų greitesnis ir produktyvesnis. Tokį metodą pasiūlė ir optimizavo Greta Zubaitė (Zubaite, 2016).

Po emulsijos suardymo dalelės surenkamos centrifuguojant 10000 g jėga 10 minučių. Resuspenduojamos mažesniame tūryje ir DNR yra trumpai karpoma su restrikcijos endonukleaze. Po to dalelės yra tris kartus plaunamos vandeniu ir surenkamos centrifuguojant. Prie dalelių neprikibusi DNR turėtų būti greičiau sukarpoma restrikcijos endonukleaze nei ta DNR kuri yra prilipusi prie dalelių. Ši prielaida yra daroma, nes DNR esančią tirpale fermentas gali pasiekti kur kas lengviau, nei DNR esančią dalelėje ar dalelės paviršiuje. Sukarpyta DNR būtų pašalinama po centrifugavimo ir plovimo etapų.

TEM nuotraukose daromose prieš gryninimą yra matoma DNR matrica, kurioje yra tamsios dalelės (3.17. pav. a). Po gryninimo yra matomos tik dalelės, bet DNR matricos nesimato (3.17. pav. b ir c). Naudojant restrikcijos endonukleazę ir centrifugavimą, dalelių gryninimo efektyvumas gali siekti net iki ~ 100 %.

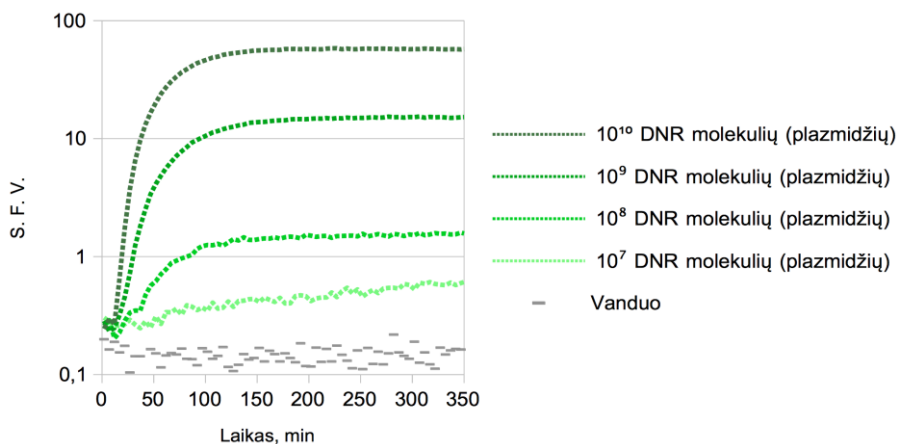


**3.17. pav.** DNR-Mg-PP dalelių TEM nuotraukos. (a) nuotraukoje yra įprastas tinkelio vaizdas prieš gryninant daleles, (b) nuotraukoje yra įprastas tinkelio vaizdas po dalelių gryninimo su restrikcijos endonukleaze, (c) nuotraukoje yra (b) mėginio dalelės iš arčiau.

### 3.5. Baltymų sintezė *in vitro* nuo DNR dalelių

Kadangi amplifikuota DNR yra linkusi adsorbuotis magnio pirofosfato dalelių paviršiuje, buvo postuliuojama, kad tokios dalelės galėtų būti panaudotos kaip nukleorūgšties nešikliai. Tačiau nebuvo žinoma, ar tokia DNR gali būti panaudota kaip matrica *in vitro* transkripcijoje (3.1. pav.)? Ar prie jos galės „priesti“ baltymai? Ar dalelių gryninimo metu naudojami komponentai, etidžio bromidas, restrikcijos endonukleazės neturės neigiamos įtakos baltymų sintezei?

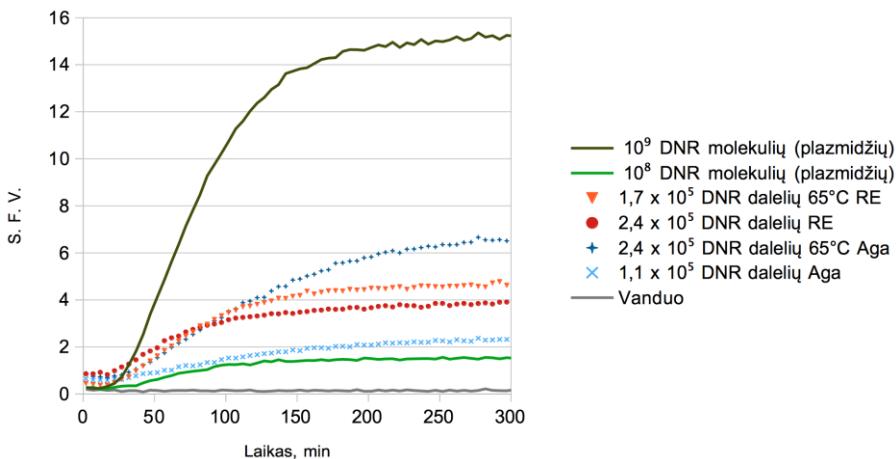
Norėdami atsakyti į šiuos klausimus, DNR daleles išbandėme dvejose modelinėse sistemose. Vienoje jų reporteriniu baltymu buvo naudotas žaliai fluorescuojantis baltymas eGFP. Šioje sistemoje įdėtos DNR kiekis yra tiesiogiai susijęs su susintetinto baltymo kiekiu (3.18. pav.). Tačiau tokioje sistemoje susintetinus labai mažą baltymo kiekį gali būti sunku detektuoti signalą. Todėl naudojome ir kitą reporterinę sistemą, kurioje reporterinis baltymas yra fermentas  $\beta$ -galaktozidazė (LacZ). Esant mažoms baltymo išėigoms, ši sistema yra gerokai jautresnė, nes net ir mažas fermento kiekis gali generuoti tokį fluorescuojančio produkto kiekį, kurio pakaks detekcijai. Tačiau tokia, fermentinė sistema gali būti gerokai mažiau jautri bandant nustatyti DNR kiekį, kuris buvo panaudotas sintezei.



**3.18. pav.** eGFP baltymo sintezės kalibracinė kreivė. eGFP baltymo sintezė buvo atlikta naudojant skirtingus plazmidžių kiekius („molekulių“). Rezultatai pateikti logaritminėje skalėje.

### 3.5.1. eGFP baltymo sintezė

eGFP baltymo sintezės eksperimentai buvo atlikti mikroplokštelėje. Sintezė buvo atlikta komerciškai prieinamame NEB *in vitro* transkripcijos translacijos rinkinyje, naudojant daleles paruoštas skirtingais metodais (3.19. pav.). Vykdam šiuos eksperimentus, naudojamas dalelių kiekis buvo nustatytas naudojant hemocitometrą. Gautas sintezės signalo stiprumas buvo panaudotas nustatant geno kopijų skaičių vienoje dalelėje (3.19. pav.). Eksperimentai kartoti keturi kartus. Minimame eksperimente viena dalelė



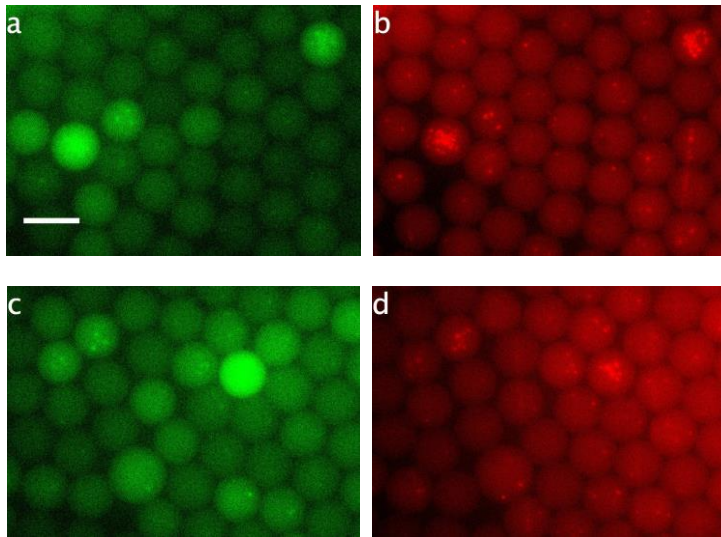
**3.19. pav.** eGFP baltymo sintezė nuo dalelių mikroplokštelėje. eGFP baltymo sintezė buvo atlikta nuo žinomo kiekio plazmidžių („molekulių“) ir palyginta su sinteze nuo skirtingai paruoštų dalelių. Legendos aprašymuose „65°C“ - žymi, kad dalelės buvo inkubuotos 65°C 10 minučių. „RE“ žymi, kad dalelės buvo grynintos naudojant restrikcijos endonukleazę, o „Aga“ - dalelės buvo grynintos naudojant žemos lydymosi temperatūros agarozę.

turėtų turėti  $\sim 10^3 - 10^4$  geno kopijų. Šie skaičiavimai remiasi prielaida, kad susintetinto baltymo kiekis yra tiesiogiai proporcingas įdėtos DNR kiekiui.

eGFP baltymo sintezė buvo atlikta ir mikroskysčių lašeliuose (3.20. pav. nuotraukos (a) – (d)). Eksperimentui naudotos dalelės buvo paruoštos skirtingais metodais: inkubuotos 65°C 10 minučių ir grynintos iš agarozės arba nekaitintos ir grynintos trumpai sukarpius su XagI restrikcijos endonukleaze. Didelio skirtumo tarp gautų rezultatų nesimatė. Tiek nuo vieno, tiek nuo kitų dalelių buvo gauta eGFP baltymo sintezė. Tačiau ryškus fluorescencinis signalas buvo gautas tik tuose lašeliuose, kurie turėjo keletą dalelių. Atlikti šeši pakartojimai.

Nėra žinomos tikslios priežastys, kodėl fluorescencinis signalas yra toks silpnas. Galbūt dalelės turi per mažą DNR kiekį. Galbūt įtakos turi dalelių saugojimo sąlygos. Išgrynintos dalelės buvo saugomos +4°C, o ne -20°C, tikintis kad jos neaglomeruos. Tačiau tokiomis sąlygomis nepageidaujamas užteršimas DNazėmis gali turėti įtakos DNR kiekiui ir kokybei.

eGFP baltymo sintezė buvo sėkmingai detektuota mikroplokštelėje ir mikroskysčių lašeliuose, naudojant DNR adsorbuotą magnio pirofosfato



**3.20. pav.** eGFP baltymo sintezė nuo dalelių mikrolašeliuose. Baltymo sintezė buvo atlikta nuo dalelių, neinkubuotų 65°C 10 minučių ir grynintų XagI restrikcijos endonukleaze, – (a) ir (b) nuotraukos, ir nuo dalelių, inkubuotų 65°C 10 minučių ir grynintų iš žemos lydymosi temperatūros agarozės, – (c) ir (d) nuotraukos. Nuotraukose (a) ir (c) matoma eGFP baltymo fluorescencija, o (b) ir (d) – SYTO 84 dažytos dalelės. Skalė lygi 25  $\mu\text{m}$ .

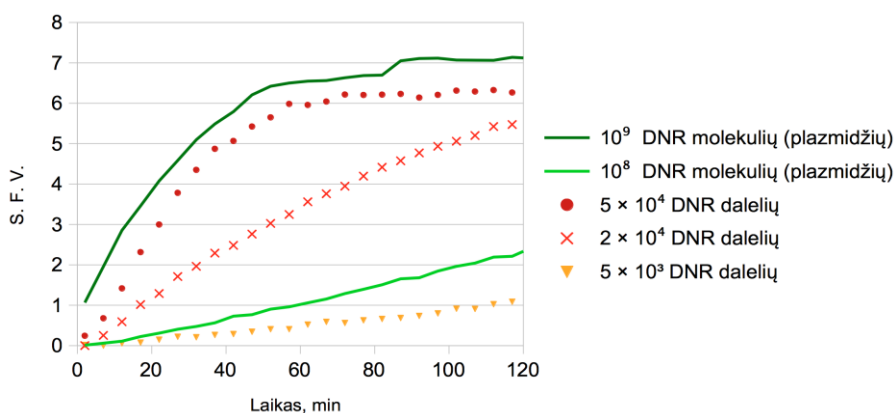
dalelių paviršiuje. Tačiau mikrolašeliuose fluorescencinis signalas buvo matomas tik tuose lašeliuose, kuriuose buvo kelios dalelės. *In vitro* evoliucijos eksperimentuose viename lašelyje turėtų būti tik vieno mutanto DNR, t. y. viename lašelyje turėtų būti tik viena dalelė. Norint vykdyti *in vitro* evoliucijos eksperimentus su baltymu, kurio detektavimui yra naudojama paties baltymo fluorescencija, reikėtų surasti sąlygas, kuriose viena dalelė turėtų didesnį DNR kiekį. Kita alternatyva būtų naudoti tokią reporterinę sistemą, kurioje galima detektuoti signalą naudojant mažesnius DNR kiekius.

### 3.5.2. LacZ baltymo sintezė

DNR dalelės buvo panaudotos *in vitro* transkripcijai ir translacijai su kita reporterine sistema. Šioje sistemoje buvo naudojamas fermentas  $\beta$ -galaktozidazė (LacZ). Jei eGFP sistemoje fluorescencinis signalas yra proporcingas susintetinto baltymo kiekiui, tai fermentinėje, LacZ, sistemoje baltymo kiekis turi mažiau įtakos signalo stiprumui. Tokioje sistemoje signalo stiprumas priklauso nuo įdėto substrato kiekio, o nuo baltymo kiekio

labiau priklauso laikas, kurį reiks laukti kol bus matomas signalas. LacZ sistemoje, fluorescenciniam signalui gauti buvo naudojamas fluoresceino di- $\beta$ -D-galaktopiranozidas (FDG), kurį gali hidrolizuoti ši  $\beta$ -galaktozidazė.

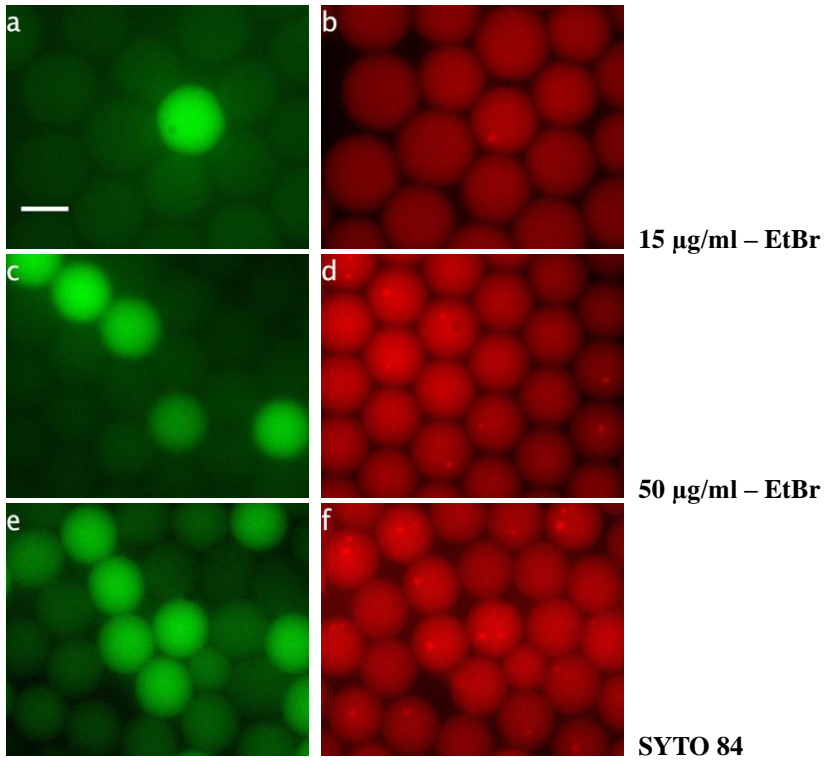
Ruošiant daleles, phi29 DNR polimerazė buvo inaktyvuota karščiau (65°C 10 minučių). Tirpale esanti laisva DNR buvo sukarpyta restrikcijos endonukleaze, o dalelės buvo surinktos centrifuguojant (detaliau aprašyta 2.2.16 skyriuje). Šiame eksperimente nuo dalelių susintetintas LacZ baltymo kiekis buvo toks, koks būtų jei viena dalelė turėtų  $\sim 10^4 - 10^5$  geno kopijų (3.21. pav.). Kalibracinės kreivės mėginiai nuo plazmidės kartoti du kartus, o nuo dalelių šešis kartus.



**3.21. pav.** LacZ baltymo detektavimas. LacZ baltymas buvo ekspresuotas nuo dalelių ir nuo plazmidžių. Vėliau susintetintas baltymas buvo sumaišytas su detekcijos buferiu, turinčiu FDG substratą. Šiame eksperimente buvo naudotos dalelės, kurios buvo inkubuotos 65°C 10 minučių ir grynintos naudojant restrikcijos endonukleazę.

LacZ baltymo sintezė taip pat buvo atlikta mikroskysčių lašeliuose. Atlikti trys eksperimentai. Dalelės buvo paruoštos taip pat, kaip ir eksperimentuose atliktuose mikroplokštelėje. Pateikiamos fluorescencinės nuotraukos buvo daromos praėjus vienai valandai nuo reakcijos pradžios (3.22. pav.). Inkubuoti ilgiau nebuvo galima, nes vis daugiau fluoresceino „ištekėdavo“ iš lašelių, kuriuose įvykdavo reakcija (Courtois ir kt. 2009).

Pirmąjį kartą *in vitro* transkripcija ir translacija mikrolašeliuose buvo vykdoma į reakcijos mišinį įdėjus 15  $\mu\text{g/ml}$  etidžio bromido (EtBr). Šiomis reakcijos sąlygomis dalelės būdavo stebimos tik tuose lašeliuose (3.22. pav.



**3.22. pav.** LacZ baltymo sintezė nuo dalelių mikrolašeliuose. Sintezė buvo atlikta nuo dalelių inkubuotų 65°C 10 minučių ir grynintų naudojant restrikcijos endonukleazę. (a), (c) ir (e) nuotraukose matoma fluoresceino fluorescencija po to, kai lašelyje susintetintas LacZ hidrolizuoja FDG substratą. (b) ir (d) nuotraukose nukleorūgštys dažytos EtBr, o (f) nuotraukoje SYTO84. Skalė visose nuotraukose yra lygi 25 µm.

b), kuriuose LacZ hidrolizavo FDG iki fluoresceino (3.22. pav. a). Tačiau dalelių fluorescencijos signalas buvo labai silpnas, todėl EtBr koncentracija buvo padidinta iki 50 µg/ml (3.22. pav. c ir d). Šiomis sąlygomis dalelės buvo matomos daug ryškiau, tačiau buvo pastebėta, kad kai kurie lašeliai, turintys daleles, nepasižymi LacZ aktyvumu, t. y. nėra fluoresceino signalo (3.22. pav. lyginti fluorescuojančius lašelius (c) paveiklėlyje ir lašelius su dalelėmis (d) paveikslėlyje). Buvo spėjama, kad didelė EtBr koncentracija gali turėti neigiamą poveikį baltymų *in vitro* transkripcijai ir translacijai (ThermoFisher Scientific ir asmeninis susirašinėjimas). Todėl LacZ baltymo sintezei lašeliuose buvo kartojama dar kartą nededant EtBr. Po vienos valandos inkubavimo 37°C, emulsija buvo



maišoma su nukleorūgščių dažu SYTO 84, kuris prisiskverbdavo į emulsijos lašelius ir nudažydavo DNR esančią dalelių paviršiuje (3.22. pav. e ir f). Šio eksperimento nuotraukose irgi buvo matomi lašeliai, kurie turi dalelę, bet ne fluorescuoja. Todėl kilo klausimas, kodėl ne visi lašeliai, turintys dalelę, pasižymi baltymo sinteze? Vienas iš galimų paaiškinimų yra, kad viena valanda yra nepakankamas laiko tarpas. Lašeliuose, turinčiuose mažesnę DNR kiekį, nespėja pasigaminti pakankamas LacZ kiekis ir mes nematome FDG hidrolizės. Tačiau eksperimentai, atlikti mikroplokštelėse, suponuoja, kad per valandą laiko turėtų įvykti bent dalis sintezės. Kitas būdas paaiškinti, kodėl kai kuriuose lašeliuose nėra sintezės, yra dalelių skirtingumas. Dalelės turi nevienodus DNR kiekius. Tai pagrindžia ir faktas, kad dažant mažesne EtBr koncentracija (15 µg/ml) buvo matomos tik tos dalelės, nuo kurių buvo susitentintas pakankamas LacZ baltymo kiekis, t.y. nusidažydavo tik tos dalelės, kurios turėjo daugiausiai DNR. Taip pat svarbu nepamiršti, kad šiuose eksperimentuose buvo naudotos dalelės, kurios po DNR padauginimo buvo inkubuotos 65°C 10 minučių. Dėl inaktyvavimo karščiu, nemaža dalis (~80-70 %) dalelių populiacija yra mažos dalelės. Šių eksperimentų darymo metu nebuvo žinoma, kokią dalį visų dalelių sudaro mažosios dalelės (250 – 550 nm) po gryninimo. Tačiau yra labai tikėtina, kad gryninimo metu išgryninamos ne tik didžiosios dalelės, bet ir dalis mažųjų dalelių. Tokiu atveju didžiosios dalelės turės daugiau DNR ir LacZ baltymo sintezė bus detektuojama greičiau, o mažosios dalelės gali turėti pakankamai DNR dalelių detekcijai, bet per mažai DNR baltymo sintezei. Eksperimentai, kurių rezultatai pristatyti (3.22. pav.), buvo daryti po vieną kartą.

Šiame darbe yra pristatytos reakcijos sąlygos, kuriomis galima susintetinti magnio pirofosfato daleles dekoruotas DNR. Lyginant su kitais šiuo metu žinomais gėlės žiedlapį primenančių dalelių iš DNR paruošimo metodais, šis metodas leidžia sintezei naudoti superspiralizuotą plazmidinę DNR ir išvengia viengrandės DNR ligavimo į žiedą. Taip pat, naudojant šį metodą galima būti tikru, kad viena DNR dalelė yra paruošta matrica naudojant vieną, unikalią DNR molekulę. Dėl šios savybės tokios dalelės gali būti panaudotos *in vitro* evoliucijos darbuose ar DNR sekoskaitoje kaip vienos rūšies DNR molekulių nešikliai. Šio darbo metu taip pat buvo išmoktos naudingos pamokos apie tai kaip sumažinti DNR molekulių praradimą dėl nespecifinės adsorbcijos labai praskiestuose tirpaluose (<10 pg/µl). Darbo metu buvo susidurta su ne vienu netikėtu pastebėjimu: lašelių kaitinimas (kuris buvo atliekamas siekiant termiškai inaktyvuoti phi29 DNR polimerazę) lemia mažų dalelių susidarymą, etidžio bromidas yra svarbus



dalelių nusodinimui centrifugavimo metu, tačiau jis gali inhibuoti *in vitro* sintezę. Nors pastarieji rezultatai nėra esminiai, tačiau jie atkreipia dėmesį į tai, kiek daug dar nėra žinoma apie gėlės žiedlapį primenančias daleles ir kaip yra svarbu gerai suprasti kiekvieną eksperimentinį etapą.

## IŠVADOS

- Vienos DNR molekulės padauginimo metu, panaudojant riedančio rato izoterminę reakciją, galima gauti apie 1  $\mu\text{m}$  dydžio, rožės žiedlapį primenančias struktūras, sudarytas iš magnio pirofosfato ir padaugintos DNR;
- Mėginių, turinčių itin žemas DNR koncentracijas ( $\leq 10$  pM), nespecifinę DNR molekulių adsorbciją ir praradimą ant paviršių galima ženkliai sumažinti į reakcijos mišinį pridėjus nejoninės paviršiaus aktyviosios medžiagos poloksamero 407;
- Vienoje DNR dalelėje, sugeneruotoje 4 pl tūrio lašelyje, gali būti nuo  $10^3$  iki  $10^5$  DNR matricos kopijų;
- DNR dalelės gali būti atskirtos nuo reakcijos mišinio išlaikant jų kompaktišką struktūrą ir panaudotos kaip substratas *in vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijoje;
- Nuo vienos DNR dalelės susintetintas eGFP baltymo kiekis prilygo tam baltymo kiekiui, kuris yra gaunamas kai reakcijos mišinyje yra naudojama  $\sim 10^3$ - $10^4$  plazmidinės DNR kopijų.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abalde-Cela S, Taladriz-Blanco P, de Oliveira MG, Abell C. Droplet microfluidics for the highly controlled synthesis of branched gold nanoparticles. *Sci Rep.* 2018 Feb 5;8(1):2440. doi: 10.1038/s41598-018-20754-x
2. Abate AR, Hung T, Mary P, Agresti JJ, Weitz DA. High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45):19163-19166. doi:10.1073/pnas.1006888107
3. Abate AR, Agresti JJ, Weitz DA. Microfluidic sorting with high-speed single-layer membrane valves. *Appl Phys Lett.* 2010;96(20):203509. doi:10.1063/1.3431281
4. Agam MA, Guo Q. Electron Beam Modification of Polymer Nanospheres. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7(10):3615-3619. doi:10.1166/jnn.2007.814
5. Ahn B, Lee K, Panchapakesan R, Oh KW. On-demand electrostatic droplet charging and sorting. *Biomicrofluidics.* 2011;5(2):24113. doi:10.1063/1.3604393
6. Ahn K, Kerbage C, Hunt TP, Westervelt RM, Link DR, Weitz DA. Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices. *Appl Phys Lett.* 2006;88(2):024104. doi:10.1063/1.2164911
7. Alberts B, Sternglanz R. Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature.* 1977;269(5630):655-661. doi:10.1038/269655a0
8. Anastasina M, Terenin I, Butcher SJ, Kainov DE. A technique to increase protein yield in a rabbit reticulocyte lysate translation system. *Biotechniques.* 2014;56(1):36-39. doi:10.2144/000114125
9. Anderson DL, Hickman DD, Reilly BE. Structure of Bacillus subtilis Bacteriophage o29 and the Length of o29 Deoxyribonucleic Acid. *Microbiology.* 1966;91(5):2081-2089. doi: 10.1128/jb.91.5.2081-2089.1966
10. Anderson MJ, Stark JC, Hodgman CE, Jewett MC. Energizing eukaryotic cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *FEBS Lett.* 2015;589(15):1723-1727. doi:10.1016/j.febslet.2015.05.045
11. Anna SL, Bontoux N, Stone HA. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Appl Phys Lett.* 2003;82(3):364-366. doi:10.1063/1.1537519
12. Aoki M, Matsuda T, Tomo Y, et al. Automated system for high-throughput protein production using the dialysis cell-free method. *Protein Expr Purif.* 2009;68(2):128-136. doi:10.1016/j.pep.2009.07.017
13. Arumugam TU, Ito D, Takashima E, et al. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(1):75-85. doi:10.1586/14760584.2014.861747
14. Au SH, Kumar P, Wheeler AR. A New Angle on Pluronic Additives: Advancing Droplets and Understanding in Digital Microfluidics. *Langmuir.* 2011. doi:10.1021/la201185c
15. Autour A, Ryckelynck M. Ultrahigh-throughput improvement and discovery of enzymes using droplet-based microfluidic screening. *Micromachines.* 2017;8(4). doi:10.3390/mi8040128
16. Bar-Even A, Noor E, Savir Y, et al. The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry.* 2011;50(21):4402-4410. doi:10.1021/bi2002289
17. Baroud CN, Robert de Saint Vincent M, Delville J-P. An optical toolbox for total control of droplet microfluidics. *Lab Chip.* 2007;7(8):1029. doi:10.1039/b702472j
18. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 5th edition. W H Freeman; 2002.
19. Berman AJ, Kamtekar S, Goodman JL, et al. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family

- polymerases. *EMBO J.* 2007;26(14):3494-3505. doi:10.1038/sj.emboj.7601780
20. Bernath K, Hai M, Mastrobattista E, Griffiths AD, Magdassi S, Tawfik DS. *In vitro* compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Anal Biochem.* 2004;325(1):151-157. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.005
  21. Bernath K, Magdassi S, Tawfik DS. Directed Evolution of Protein Inhibitors of DNA-nucleases by *in Vitro* Compartmentalization (IVC) and Nano-droplet Delivery. *J Mol Biol.* 2005;345(5):1015-1026. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.017
  22. Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem.* 1989;264(15):8935-8940
  23. Blanco L, Salas M. Replication of phage phi 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length phi 29 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(19):6404-6408. doi: 10.1073/pnas.82.19.6404
  24. Boggio SB, Roveri OA. Catalytic properties of an endogenous b-lactamase responsible for the resistance of *Azospirillum lipoferum* to b-lactam antibiotics. *Microbiology.* 2003;149:445-450. doi:10.1099/mic.0.25926-0
  25. Bremond N, Thiam AR, Bibette J. Decompressing Emulsion Droplets Favors Coalescence. *Phys Rev Lett.* 2008;100(2):024501. doi:10.1103/PhysRevLett.100.024501
  26. Brödel AK, Sonnabend A, Roberts LO, Stech M, Wüstenhagen DA, Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems. *PLoS One.* 2013;8(12):e82234. doi:10.1371/journal.pone.0082234
  27. Brödel AK, Wüstenhagen DA, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis Systems Derived from Cultured Mammalian Cells. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.).* Vol 1261. ; 2015:129-140. doi:10.1007/978-1-4939-2230-7\_7
  28. Buntru M, Vogel S, Spiegel H, Schillberg S. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based *in vitro* translation system. *BMC Biotechnol.* 2014;14:37. doi:10.1186/1472-6750-14-37
  29. Buntru M, Vogel S, Stoff K, Spiegel H, Schillberg S. A versatile coupled cell-free transcription-translation system based on tobacco BY-2 cell lysates. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(5):867-878. doi:10.1002/bit.25502
  30. Calhoun KA, Swartz JR. Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90(5):606-613. doi:10.1002/bit.20449
  31. Calhoun KA, Swartz JR. Energy Systems for ATP Regeneration in Cell-Free Protein Synthesis Reactions. In: *In Vitro Transcription and Translation Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2007:3-17. doi:10.1007/978-1-59745-388-2\_1
  32. Cancedda R, Schlesinger MJ. Formation of Sindbis virus capsid protein in mammalian cell-free extracts programmed with viral messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(5):1843-1847. doi: 10.1073/pnas.71.5.1843
  33. Cao J, Zhang X, Zhang Y, Zhou J, Chen Y, Liu X. Free MoS<sub>2</sub> Nanoflowers Grown on Graphene by Microwave-Assisted Synthesis as Highly Efficient Non-Noble-Metal Electrocatalysts for the Hydrogen Evolution Reaction. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161374. doi:10.1371/journal.pone.0161374
  34. Carter WA, Levy HB, Diamond LS. Protein synthesis by amoebal ribosomes. *Nature.* 1967;213(5077):722-724. doi: 10.1038/213722b0
  35. Caschera F, Noireaux V. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription-translation system. *Biochimie.* 2014;99:162-168. doi:10.1016/j.biochi.2013.11.025
  36. Chabert M, Dorfman KD, Viovy J-L. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. *Electrophoresis.* 2005;26(19):3706-3715. doi:10.1002/elps.200500109
  37. Chan EM, Alivisatos AP, Mathies RA. High-Temperature Microfluidic Synthesis of

- CdSe Nanocrystals in Nanoliter Droplets. *J Am Chem Soc.* 2005;127(40):13854-13861. doi:10.1021/ja051381p
38. Chen X, Abdullah H, Kuo D-H. CuMnOS Nanoflowers with Different Cu(+)/Cu(2+) Ratios for the CO<sub>2</sub>-to-CH<sub>3</sub>OH and the CH<sub>3</sub>OH-to-H<sub>2</sub> Redox Reactions. *Sci Rep.* 2017;7:41194. doi:10.1038/srep41194
  39. Chesters JK. Cell-free protein synthesis by rumen protozoa. *J Protozool.* 1968;15(3):509-512. doi: 10.1111/j.1550-7408.1968.tb02164.x
  40. Chin CD, Laksanasopin T, Cheung YK, Steinmiller D, Linder V, Parsa H, Wang J, Moore H, Rouse R, Umvilighozo G, Karita E, Mwambarangwe L, Braunstein SL, van de Wijgert J, Sahabo R, Justman JE, El-Sadr W, Sia SK. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nat Med.* 2011 Jul 31;17(8):1015-9. doi: 10.1038/nm.2408.
  41. Cho EJ, Yang L, Levy M, Ellington AD. Using a Deoxyribozyme Ligase and Rolling Circle Amplification To Detect a Non-nucleic Acid Analyte, ATP. *J Am Chem Soc.* 2005;127(7):2022-2023. doi:10.1021/ja043490u
  42. Choy J-H, Jang E-S, Won J-H, Chung J-H, Jang D-J, Kim Y-W. Hydrothermal route to ZnO nanocoral reefs and nanofibers. *Appl Phys Lett.* 2004;84(2):287-289. doi:10.1063/1.1639514
  43. Chong S. Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Curr Protoc Mol Biol.* 2014;108:16.30.1-11. doi:10.1002/0471142727.mb1630s108
  44. Chou WL, Lee PY, Yang CL, Huang WY, Lin YS. Recent advances in applications of droplet microfluidics. *Micromachines.* 2015;6(9):1249-1271. doi:10.3390/mi6091249
  45. Choudhury A, Hodgman CE, Anderson MJ, Jewett MC. Evaluating fermentation effects on cell growth and crude extract metabolic activity for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biochem Eng J.* 2014;91:140-148. doi:10.1016/j.bej.2014.07.014
  46. Convery N, Gadegaard N. 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering.* 2019;2:76-91. doi.org/10.1016/j.mne.2019.01.003
  47. Courtois F, Olguin LF, Whyte G, et al. An integrated device for monitoring time-dependent *in vitro* expression from single genes in picolitre droplets. *Chembiochem.* 2008;9(3):439-446. doi:10.1002/cbic.200700536
  48. Courtois F, Olguin LF, Whyte G, et al. Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for Use in Cell-Based Assays. *Anal Chem.* 2009;81(8):3008-3016. doi:10.1021/ac802658n
  49. Craig D, Howell MT, Gibbs CL, Hunt T, Jackson RJ. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic *in vitro* transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(19):4987-4995. doi: 10.1093/nar/20.19.4987
  50. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods.* 2008;151(2):264-270. doi:10.1016/j.jviromet.2008.04.011
  51. De Diego N, Fürst T, Humplik JF, Ugena L, Podlešáková K, Spíchal L. An Automated Method for High-Throughput Screening of Arabidopsis Rosette Growth in Multi-Well Plates and Its Validation in Stress Conditions. *Front Plant Sci.* 2017;8:1702. doi:10.3389/fpls.2017.01702
  52. de los Santos ELC, Meyerowitz JT, Mayo SL, Murray RM. Engineering Transcriptional Regulator Effector Specificity Using Computational Design and *In Vitro* Rapid Prototyping: Developing a Vanillin Sensor. *ACS Synth Biol.* 2016;5(4):287-295. doi:10.1021/acssynbio.5b00090
  53. del Prado A, Rodríguez I, Lázaro JM, Moreno-Morcillo M, Vega M, Salas M. New insights into the coordination between the polymerization and 3'-5' exonuclease activities in  $\phi$ 29 DNA polymerase. *Sci Rep.* 2019 Jan 29;9(1):923. doi:

- 10.1038/s41598-018-37513-7
54. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11(6):1095-1099. doi:10.1101/gr.180501
  55. Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5261-5266. doi:10.1073/pnas.082089499
  56. Demidov V V. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2(6):542-548. doi:10.1586/14737159.2.6.542
  57. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods.* 2006;3(7):551-559. doi:10.1038/nmeth898
  58. Dodevski I, Markou GC, Sarkar CA. Conceptual and methodological advances in cell-free directed evolution. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;33:1-7. doi:10.1016/j.sbi.2015.04.008
  59. Dondapati SK, Wüstenhagen DA, Kubick S. Functional Analysis of Membrane Proteins Produced by Cell-Free Translation. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1685. ; 2018:171-185. doi:10.1007/978-1-4939-7366-8\_10
  60. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8817-8822. doi:10.1073/pnas.1133470100
  61. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, et al. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. *Science.* 2009;1469(November):1-7. doi:10.1126/science.1181498
  62. Duan J, He D, Wang W, et al. Glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles for ractopamine and metaproterenol sensing. *Chem Phys Lett.* 2013;574:83-88. doi:10.1016/j.cplett.2013.04.057
  63. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 1998;70(23):4974-4984. doi:10.1021/ac980656z
  64. Elhardt D, Bock A. An *in vitro* polypeptide synthesizing system from methanogenic bacteria: Sensitivity to antibiotics. *MGG Mol Gen Genet.* 1982;188(1):128-134. doi:10.1007/bf00333006
  65. Endoh T, Kanai T, Imanaka T. A highly productive system for cell-free protein synthesis using a lysate of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(5):1153-1161. doi:10.1007/s00253-006-0753-3
  66. Endoh T, Kanai T, Sato YT, et al. Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile. *J Biotechnol.* 2006;126(2):186-195. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.04.010
  67. Esteban JA, Salas M, Blanco L. Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem.* 1993;268(4):2719-2726.
  68. Esteban JA, Soengas MS, Salas M, Blanco L. 3'- and 5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31946-31954.
  69. Failmezger J, Rauter M, Nitschel R, Kraml M, Siemann-Herzberg M. Cell-free protein synthesis from non-growing, stressed *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2017;7(1):16524. doi:10.1038/s41598-017-16767-7
  70. Fallah-Araghi A, Baret J-C, Ryckelynck M, Griffiths AD. A completely *in vitro* ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein

- engineering and directed evolution. *Lab Chip*. 2012;12(5):882. doi:10.1039/c2lc21035e
71. Ferguson GS, Chaudhury MK, Sigal GB, Whitesides GM. Contact adhesion of thin gold films on elastomeric supports: cold welding under ambient conditions. *Science*. 1991;253(5021):776-778. doi:10.1126/science.253.5021.776
  72. Fischlechner M, Schaerli Y, Mohamed MF, Patil S, Abell C, Hollfelder F. Evolution of enzyme catalysts caged in biomimetic gel-shell beads. *Nat Chem*. 2014;6(9):791-796. doi:10.1038/nchem.1996
  73. Freudl R, MacIntyre S, Degen M, Henning U. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol*. 1986 Apr 5;188(3):491-4. doi:10.1016/0022-2836(86)90171-3.
  74. Gaillard C, Strauss F. Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. *Tech Tips Online*. 1998;3(08):63-65. doi:10.1016/S1366-2120(08)70101-6
  75. Galinis R, Stonyte G, Kiseliovas V, Zilionis R, Studer S, Hilvert D, Janulaitis A, Mazutis L. DNA Nanoparticles for Improved Protein Synthesis *In Vitro*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(9):3120-3123. doi:10.1002/anie.201511809
  76. Garmendia C, Bernad A, Esteban JA, Blanco L, Salas M. The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem*. 1992;267(4):2594-2599
  77. Garstecki P, Fuerstman MJ, Stone HA, Whitesides GM. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up. *Lab Chip*. 2006;6(3):437. doi:10.1039/b510841a
  78. Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(7):428-432. doi:10.1038/nnano.2012.80
  79. Gesteland RF. Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 1966;16(1):67-84. doi:10.1016/s0022-2836(66)80263-2
  80. Gielen F, Colin P-Y, Mair P, Hollfelder F. Ultrahigh-Throughput Screening of Single-Cell Lysates for Directed Evolution and Functional Metagenomics. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1685. ; 2018:297-309. doi:10.1007/978-1-4939-7366-8\_18
  81. Godina A. In vivo and *In vitro* Directed Evolution of Enzymes using Droplet-based Microfluidics [disertacija]. Strasbourg: University of Strasbourg; 2013.
  82. Goren MA, Fox BG. Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearoyl-CoA desaturase complex. *Protein Expr Purif*. 2008;62(2):171-178. doi:10.1016/j.pep.2008.08.002
  83. Griffiths AD, Tawfik DS. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. *EMBO J*. 2003;22(1):24-35. doi:10.1093/emboj/cdg014
  84. Griffiths AD, Tawfik DS. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends Biotechnol*. 2006;24(9):395-402. doi:10.1016/j.tibtech.2006.06.009
  85. Gulliksen A, Solli L, Karlsen F, et al. Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes. *Anal Chem*. 2004;76(1):9-14. doi:10.1021/ac034779h
  86. Gupta R, Netherton M, Byrd TF, Rohde KH. Reporter-Based Assays for High-Throughput Drug Screening against *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol*. 2017;8:2204. doi:10.3389/fmicb.2017.02204
  87. Guttenberg Z, Müller H, Habermüller H, et al. Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump. *Lab Chip*. 2005;5(3):308-317. doi:10.1039/b412712a
  88. Hammond M, Homa F, Andersson-Svahn H, Ettema TJG, Joensson HN. Picodroplet partitioned whole genome amplification of low biomass samples preserves genomic diversity for metagenomic analysis. *Microbiome*. 2016;4(1):52. doi:10.1186/s40168-016-0197-7

89. Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.* 2014;588(17):2762-2773. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.061
90. Hillebrecht JR, Chong S. A comparative study of protein synthesis in *in vitro* systems: from the prokaryotic reconstituted to the eukaryotic extract-based. *BMC Biotechnol.* 2008;8(1):58. doi:10.1186/1472-6750-8-58
91. Hipolito CJ, Suga H. Ribosomal production and *in vitro* selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(1-2):196-203. doi:10.1016/j.cbpa.2012.02.014
92. Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem.* 1958;231(1):241-257
93. Hodgman CE, Jewett MC. Characterizing IGR IRES-mediated translation initiation for use in yeast cell-free protein synthesis. *N Biotechnol.* 2014;31(5):499-505. doi:10.1016/j.nbt.2014.07.001
94. Hodgman CE, Jewett MC. Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(10):2643-2654. doi:10.1002/bit.24942
95. Holstein JM, Gylstorff C, Hollfelder F. Cell-free Directed Evolution of a Protease in Microdroplets at Ultrahigh Throughput. *ACS Synth Biol.* 2021 Jan 27. doi: 10.1021/acssynbio.0c00538
96. Hong SH, Ntai I, Haimovich AD, Kelleher NL, Isaacs FJ, Jewett MC. Cell-free Protein Synthesis from a Release Factor 1 Deficient *Escherichia coli* Activates Efficient and Multiple Site-specific Nonstandard Amino Acid Incorporation. *ACS Synth Biol.* 2014;3(6):398-409. doi:10.1021/sb400140t
97. Horikoshi S, Serpone N. Introduction to Nanoparticles. In: *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. First edit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013:1-24. doi:10.1002/9783527648122.ch1
98. Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. *Sci Rep.* 2017;7(1):5199. doi:10.1038/s41598-017-05436-4
99. Hsieh K, Patterson AS, Ferguson BS, Plaxco KW, Soh HT. Rapid, Sensitive, and Quantitative Detection of Pathogenic DNA at the Point of Care through Microfluidic Electrochemical Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Angew Chemie.* 2012;124(20):4980-4984. doi:10.1002/ange.201109115
100. Huang H, Densmore D. Integration of microfluidics into the synthetic biology design flow. *Lab Chip.* 2014;14(18):3459-3474. doi:10.1039/c4lc00509k
101. Hunt JP, Yang SO, Wilding KM, Bundy BC. The growing impact of lyophilized cell-free protein expression systems. *Bioengineered.* 2017;8(4):325-330. doi:10.1080/21655979.2016.1241925
102. Hutchison CA, Smith HO, Pfannkoch C, Venter JC. Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(48):17332-17336. doi:10.1073/pnas.0508809102
103. Yang HL, Ivashkiv L, Chen HZ, Zubay G, Cashel M. Cell-free coupled transcription-translation system for investigation of linear DNA segments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7029-7033. doi: 10.1073/pnas.77.12.7029
104. Yang Z, Xu G, Reboud J, Ali SA, Kaur G, McGiven J, Boby N, Gupta PK, Chaudhuri P, Cooper JM. Rapid Veterinary Diagnosis of Bovine Reproductive Infectious Diseases from Semen Using Paper-Origami DNA Microfluidics. *ACS Sens.* 2018 Feb 23;3(2):403-409. doi: 10.1021/acssensors.7b00825
105. Invitrogen. Expressway™ Cell-Free. In: *Catalog*. [Vartotojo instrukcija] Invitrogen; 2011:40. www.thermofisher.com.
106. Jayanath NY, Nguyen LT, Vu TT, Tran LD. Development of a portable



- electrochemical loop mediated isothermal amplification (LAMP) device for detection of hepatitis B virus. *RSC Adv.* 2018;8(61):34954-34959. doi:10.1039/c8ra07235c
107. Jean J, Blais B, Darveau A, Fliss I. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5593-600. doi: 10.1128/AEM.67.12.5593-5600.2001.
  108. Jeong H-H, Yelleswarapu VR, Yadavali S, Issadore D, Lee D. Kilo-scale droplet generation in three-dimensional monolithic elastomer device (3D MED). *Lab Chip.* 2015;15(23):4387-4392. doi:10.1039/c5lc01025j
  109. Jewett MC, Calhoun KA, Voloshin A, Wu JJ, Swartz JR. An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. *Mol Syst Biol.* 2008;4:220. doi:10.1038/msb.2008.57
  110. Jewett MC, Swartz JR. Substrate replenishment extends protein synthesis with an *in vitro* translation system designed to mimic the cytoplasm. *Biotechnol Bioeng.* 2004;87(4):465-471. doi:10.1002/bit.20139
  111. John R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* 2009;17(5):205-211. doi:10.1016/j.tim.2009.02.004
  112. Juncker D, Schmid H, Delamarche E. Multipurpose microfluidic probe. *Nat Mater.* 2005 Aug;4(8):622-8. doi: 10.1038/nmat1435
  113. Kaigala GV, Lovchik RD, Drechsler U, Delamarche E. A vertical microfluidic probe. *Langmuir.* 2011 May 3;27(9):5686-93. doi: 10.1021/la2003639.
  114. Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Res.* 1997 May 15;25(10):1999-2004. doi: 10.1093/nar/25.10.1999.
  115. Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, et al. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. *Mol Cell.* 2004;16(4):609-618. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.019
  116. Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* 2005;23(3):150-156. doi:10.1016/j.tibtech.2005.01.003
  117. Kawasaki T, Gouda MD, Sawasaki T, Takai K, Endo Y. Efficient synthesis of a disulfide-containing protein through a batch cell-free system from wheat germ. *Eur J Biochem.* 2003;270(23):4780-4786. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03880.x
  118. Kelly BT, Griffiths AD. Selective gene amplification. *Protein Eng Des Sel.* 2007;20(12):577-581. doi:10.1093/protein/gzm060
  119. Kelwick R, Webb AJ, MacDonald JT, Freemont PS. Development of a *Bacillus subtilis* cell-free transcription-translation system for prototyping regulatory elements. *Metab Eng.* 2016;38:370-381. doi:10.1016/j.ymben.2016.09.008
  120. Kennedy S, Oswald N, editors. PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. Caister Academic Press; 2011.
  121. Kim DM, Choi CY. A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog.* Sep-Oct 1996;12(5):645-9. doi: 10.1021/bp960052l.
  122. Kim DM, Kigawa T, Choi CY, Yokoyama S. A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1996;239(3):881-886. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0881u.x
  123. Kim DM, Swartz JR. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74(4):309-316.
  124. Kim D-M, Swartz JR. Prolonging Cell-Free Protein Synthesis by Selective Reagent

- Additions. *Biotechnol Prog.* 2000;16(3):385-390. doi:10.1021/bp000031y
125. Kim H-C, Kim D-M. Methods for energizing cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng.* 2009;108(1):1-4. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.02.007
  126. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(3):917-930. doi:10.1007/s00253-011-3758-5
  127. Kim SC, Premasekharan G, Clark IC, Gameda HB, Paris PL, Abate AR. Measurement of copy number variation in single cancer cells using rapid-emulsification digital droplet MDA. *Microsystems Nanoeng.* 2017;3:17018. doi:10.1038/micronano.2017.18
  128. Kim T-W, Oh I-S, Keum J-W, et al. Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: Combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *Biotechnol Bioeng.* 2007;97(6):1510-1515. doi:10.1002/bit.21337
  129. Kirillova A, Marschelke C, Friedrichs J, Werner C, Synytska A. Hybrid Hairy Janus Particles as Building Blocks for Antibiofouling Surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(47):32591-32603. doi:10.1021/acsami.6b10588
  130. Kobayashi T, Machida K, Imataka H. Human Cell Extract-Derived Cell-Free Systems for Virus Synthesis. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1118. ; 2014:149-156. doi:10.1007/978-1-62703-782-2\_9
  131. Koenig SH, Brown RD, III. H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> as substrate for carbonic anhydrase in the dehydration of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(9):2422-2425. doi: 10.1073/pnas.69.9.2422
  132. Kojima T, Takei Y, Ohtsuka M, Kawarasaki Y, Yamane T, Nakano H. PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: application for high-throughput screening of transcription factor targets . *Nucleic Acids Res.* 2005 Oct 6;33(17):e150. doi: 10.1093/nar/gni143.
  133. Kovtun O, Mureev S, Johnston W, Alexandrov K. Towards the construction of expressed proteomes using a Leishmania tarentolae based cell-free expression system. *PLoS One.* 2010;5(12):e14388. doi:10.1371/journal.pone.0014388
  134. Kralj S, Makovec D. Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles. *ACS Nano.* 2015;9(10):9700-9707. doi:10.1021/acsnano.5b02328
  135. Krieg PA, Melton DA. *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 1987;155:397-415. doi: 10.1016/0076-6879(87)55027-3
  136. Kubick S, Gerrits M, Merk H, Stiege W, Erdmann VA. Chapter 2 *In Vitro* Synthesis of Posttranslationally Modified Membrane Proteins. *Curr Top Membr.* 2009;63:25-49. doi:10.1016/S1063-5823(09)63002-7
  137. Kumar G, Chernaya G. Cell-free protein synthesis using multiply-primed rolling circle amplification products. *Biotechniques.* 2009;47(1):637-639. doi:10.2144/000113171
  138. Kumaresan P, Yang CJ, Cronier SA, Blazej RG, Mathies RA. High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets. *Anal Chem.* 2008;80(10):3522-3529. doi:10.1021/ac800327d
  139. Kuruma Y, Ueda T. The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nat Protoc.* 2015;10(9):1328-1344. doi:10.1038/nprot.2015.082
  140. Lam L, Sakakihara S, Ishizuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber. *Biomed Microdevices.* 2008;10(4):539-546. doi:10.1007/s10544-008-9163-x
  141. Lanio T, Jeltsch A, Pingoud A. Automated purification of His6-tagged proteins allows exhaustive screening of libraries generated by random mutagenesis. *Biotechniques.* 2000;29(2):338-342. doi: 10.2144/00292rr01
  142. LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site

- selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev.* 1993;7(6):996-1007. doi: 10.1101/gad.7.6.996
143. Lee JB, Hong J, Bonner DK, Poon Z, Hammond PT. Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery. *Nat Mater.* 2012;11(4):316-322. doi:10.1038/nmat3253
  144. Lee JB, Peng S, Yang D, et al. A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(12):816-820. doi:10.1038/nnano.2012.211
  145. Lee PLM. DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(2):138-141. doi:10.1111/1755-0998.12548
  146. Lee SW, Cheon SA, Kim M II, Park TJ. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2015;13(1):54. doi:10.1186/s12951-015-0118-0
  147. Lee S-Y, Yang L-J, Meldrum DR, Lee C-N, Lin C-W. Miniature isothermal amplification reactor with an integrated optical detection unit. In: *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:648-650. doi:10.1007/978-3-540-36841-0\_150
  148. Leman M, Abouakil F, Griffiths AD, Tabeling P. Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale. *Lab Chip.* 2015;15:753-765. doi:10.1039/c4lc01122h
  149. Leng X, Yang CJ. Agarose Droplet Microfluidics for Highly Parallel and Efficient Single Molecule Emulsion PCR. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 949. ; 2013:413-422. doi:10.1007/978-1-62703-134-9\_26
  150. Li F, Guo L, Hu Y, Li Z, Liu J, He J, Cui H. Multiplexed chemiluminescence determination of three acute myocardial infarction biomarkers based on microfluidic paper-based immunodevice dual amplified by multifunctionalized gold nanoparticles. *Talanta.* 2020 Jan 15;207:120346. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120346
  151. Li J, Wang H, Kwon Y-C, Jewett MC. Establishing a high yielding *streptomyces* - based cell-free protein synthesis system. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(6):1343-1353. doi:10.1002/bit.26253
  152. Li J, Zhang C, Huang P, et al. Dissecting limiting factors of the Protein synthesis Using Recombinant Elements (PURE) system. *Translation.* 2017;5(1):e1327006. doi:10.1080/21690731.2017.1327006
  153. Li X, Zhang D, Zhang H, et al. Microwell Array Method for Rapid Generation of Uniform Agarose Droplets and Beads for Single Molecule Analysis. *Anal Chem.* 2018;90(4):2570-2577. doi:10.1021/acs.analchem.7b04040
  154. Lim J-M, Kim J-D, Yi G-R, et al. Controlled generation of submicron emulsion droplets via highly stable tip-streaming mode in microfluidic devices. *Lab Chip.* 2012;12(8):1446. doi:10.1039/c2lc00018k
  155. Lynch MDJ, Neufeld JD. SSUnique: Detecting Sequence Novelty in Microbiome Surveys. Caporaso JG, ed. *mSystems.* 2016;1(6):e00133-16. doi:10.1128/mSystems.00133-16
  156. Lizardi PM, Ward DC, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 1998;19(3):225-232. doi:10.1038/898
  157. Lopez-Bueno A, Tamames J, Velazquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A. High Diversity of the Viral Community from an Antarctic Lake. *Science (80- ).* 2009;326(5954):858-861. doi:10.1126/science.1179287
  158. Luk VN, Mo GC, Wheeler AR. Pluronic additives: A solution to sticky problems in digital microfluidics. *Langmuir.* 2008;24(12):6382-6389. doi:10.1021/la7039509
  159. Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):559-564. doi: 10.1073/pnas.97.2.559

160. Mager J, Lipmann F. Amino acid incorporation and the reversion of its initial phase with cell-free *tetrahymena* preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1958;44(4):305-309. doi: 10.1073/pnas.44.4.305
161. Malloggi F, Pannacci N, Attia R, et al. Monodisperse Colloids Synthesized with Nanofluidic Technology. *Langmuir*. 2010;26(4):2369-2373. doi:10.1021/la9028047
162. Marcy Y, Ishoey T, Lasken RS, et al. Nanoliter Reactors Improve Multiple Displacement Amplification of Genomes from Single Cells. *PLoS Genet*. 2007;3(9):e155. doi:10.1371/journal.pgen.0030155
163. Marcus JS, Anderson WF, Quake SR. Parallel Picoliter RT-PCR Assays Using Microfluidics. *Anal Chem*. 2006;78(3):956-958. doi:10.1021/ac0513865
164. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(8):1318-20. doi: 10.1002/anie.200603817.
165. Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, Treacy P, Kelly BT, Griffiths AD. High-Throughput Screening of Enzyme Libraries: *In Vitro* Evolution of a  $\beta$ -Galactosidase by Fluorescence-Activated Sorting of Double Emulsions. *Chem Biol*. 2005;12(12):1291-1300. doi:10.1016/j.chembiol.2005.09.016
166. Matsuura T, Yomo T. *In vitro* evolution of proteins. *J Biosci Bioeng*. 2006;101(6):449-456. doi:10.1263/jbb.101.449
167. Matthaei JH, Nirenberg MW. Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci*. 1961;47(10). doi: 10.1073/pnas.47.10.1580
168. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Sep 13; 91(19): 9022–9026. doi: 10.1073/pnas.91.19.9022
169. Mazutis L, Baret J-C, Treacy P, et al. Multi-step microfluidic droplet processing: kinetic analysis of an *in vitro* translated enzyme. *Lab Chip*. 2009;9(20):2902-2908. doi:10.1039/b907753g
170. Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc*. 2013;8(5):870-891. doi:10.1038/nprot.2013.046
171. Mazutis L, Griffiths AD. Selective droplet coalescence using microfluidic systems. *Lab Chip*. 2012;12(10):1800. doi:10.1039/c2lc40121e
172. McCaughan F. Molecular copy-number counting: potential of single-molecule diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(4):309-312. doi:10.1586/erm.09.14
173. Men Y, Fu Y, Chen Z, Sims PA, Greenleaf WJ, Huang Y. Digital Polymerase Chain Reaction in an Array of Femtoliter Polydimethylsiloxane Microreactors. *Anal Chem*. 2012;84(10):4262-4266. doi:10.1021/ac300761n
174. Mendez J, Blanco L, Salas M. Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J*. 1997;16(9):2519-2527. doi:10.1093/emboj/16.9.2519
175. Merk H, Gless C, Maertens B, Gerrits M, Stiege W. Cell-free synthesis of functional and endotoxin-free antibody Fab fragments by translocation into microsomes. *Biotechniques*. 2012;53(3):153-160. doi:10.2144/0000113904
176. Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab Eng*. 2004;6(3):197-203. doi:10.1016/j.ymben.2004.01.003
177. Miersch S, LaBaer J. Nucleic Acid Programmable Protein Arrays: Versatile Tools for Array-Based Functional Protein Studies. In: *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011:27.2.1-27.2.26. doi:10.1002/0471140864.ps2702s64
178. Mikami S, Kobayashi T, Machida K, Masutani M, Yokoyama S, Imataka H. N-

- terminally truncated GADD34 proteins are convenient translation enhancers in a human cell-derived *in vitro* protein synthesis system. *Biotechnol Lett.* 2010;32(7):897-902. doi:10.1007/s10529-010-0251-7
179. Mikami S, Kobayashi T, Masutani M, Yokoyama S, Imataka H. A human cell-derived *in vitro* coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 2008;62(2):190-198. doi:10.1016/j.pep.2008.09.002
  180. Mikami S, Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H. An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Protein Expr Purif.* 2006;46(2):348-357. doi:10.1016/j.pep.2005.09.021
  181. Miller OJ, Bernath K, Agresti JJ, et al. Directed evolution by *in vitro* compartmentalization. *Nat Methods.* 2006;3(7):561-570. doi:10.1038/nmeth897
  182. Minero GAS, Bagnasco M, Fock J, Tian B, Garbarino F, Hansen MF. Automated on-chip analysis of tuberculosis drug-resistance mutation with integrated DNA ligation and amplification. *Anal Bioanal Chem.* 2020 May;412(12):2705-2710. doi: 10.1007/s00216-020-02568-x
  183. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(1):150-154. doi:10.1006/bbrc.2001.5921
  184. Morisset D, Dobnik D, Hamels S, Zel J, Gruden K. NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(18):e118. doi:10.1093/nar/gkn524
  185. Morra M, Occhiello E, Garbassi F, Maestri M, Bianchi R, Zonta A. The characterization of plasma-modified polydimethylsiloxane interfaces with media of different surface energy. *Clin Mater.* 1990;5(2-4):147-156. doi: 10.1016/0267-6605(90)90014-m
  186. Morrison T, Hurley J, Garcia J, et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(18):e123. doi:10.1093/nar/gkl639
  187. Mureev S, Kovtun O, Nguyen UTT, Alexandrov K. Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression. *Nat Biotechnol.* 2009;27(8):747-752. doi:10.1038/nbt.1556
  188. Nagumo Y, Fujiwara K, Horisawa K, Yanagawa H, Doi N. PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies. *J Biochem.* 2016;159(5):519-526. doi:10.1093/jb/mvv131
  189. Narayanan J, Xiong J-Y, Liu X-Y. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *J Phys Conf Ser.* 2006;28(1):83-86. doi:10.1088/1742-6596/28/1/017
  190. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961;47(10):1588-1602. doi: 10.1073/pnas.47.10.1588
  191. Nishikawa Y, Hosokawa M, Maruyama T, Yamagishi K, Mori T, Takeyama H. Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. Chen T-Y, ed. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138733. doi:10.1371/journal.pone.0138733
  192. Noireaux V, Maeda YT, Libchaber A. Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(9):3473-3480. doi:10.1073/pnas.1017075108
  193. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
  194. Obexer R, Godina A, Garrabou X, et al. Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase. *Nat Chem.* 2016;9(1):50-56. doi:10.1038/nchem.2596

195. Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, et al. CIS display: *In vitro* selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2806-2810. doi:10.1073/pnas.0400219101
196. Ojima-Kato T, Nagai S, Nakano H. N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. 2017;123(5):540-546. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.12.004
197. Ono T, Ichiki T, Noji H. Digital enzyme assay using attoliter droplet array. *Analyst*. 2018;143(20):4923-4929. doi:10.1039/c8an01152d
198. Oza JP, Aerni HR, Pirman NL, et al. Robust production of recombinant phosphoproteins using cell-free protein synthesis. *Nat Commun*. 2015;6:8168. doi:10.1038/ncomms9168
199. Pan X, Urban AE, Palejev D, Schulz V, Grubert F, Hu Y, Snyder M, Weissman SM. A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 7;105(40):15499-504. doi:10.1073/pnas.0808028105
200. Paul S, Stang A, Lennartz K, Tenbusch M, Überla K. Selection of a T7 promoter mutant with enhanced *in vitro* activity by a novel multi-copy bead display approach for *in vitro* evolution. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 7;41(1):e29. doi:10.1093/nar/gks940
201. Pelham HR, Jackson RJ. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*. 1976;67(1):247-256. doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x
202. Peñalber-Johnstone C, Ge X, Tran K, Selock N, Sardesai N, Gurramkonda C, Pilli M, Tolosa M, Tolosa L, Kostov Y, Frey DD, Rao G. Optimizing cell-free protein expression in CHO: Assessing small molecule mass transfer effects in various reactor configurations. *Biotechnol Bioeng*. 2017 Jul;114(7):1478-1486. doi:10.1002/bit.26282
203. Picanco-Castro V, Biaggio RT, Cova DT, Swiech K. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. *Protein Pept Lett*. 2013;20(12):1373-1381. doi:10.2174/092986652012131112130322
204. Price AK, MacConnell AB, Paegel BM. *h v* SABR: Photochemical Dose-Response Bead Screening in Droplets. *Anal Chem*. 2016;88(5):2904-2911. doi:10.1021/acs.analchem.5b04811
205. Price AK, Paegel BM. Discovery in Droplets. *Anal Chem*. 2016;88(1):339-353. doi:10.1021/acs.analchem.5b04139
206. Qi X, Bakht S, Devos KM, Gale MD, Osbourn A. L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Nucleic Acids Res*. 2001;29(22):E116. doi:10.1093/nar/29.22.e116
207. Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4). doi:10.3390/s18041271
208. Reagin MJ, Giesler TL, Merla AL, Resetar-Gerke JM, Kapolka KM, Mamone JA. TempliPhi: A sequencing template preparation procedure that eliminates overnight cultures and DNA purification. *J Biomol Tech*. 2003;14(2):143-148.
209. Reisner AH, Macindoe H. Incorporation of Amino Acid into Protein by Utilizing a Cell-Free System from *Paramecium*. *J Gen Microbiol*. 1967;47(1):1-15. doi:10.1099/00221287-47-1-1
210. Ryckelynck M, Baudrey S, Rick C, et al. Using droplet-based microfluidics to improve the catalytic properties of RNA under multiple-turnover conditions. *RNA*. 2015;21(3):458-469. doi:10.1261/rna.048033.114
211. Ritchie TK, Grinkova Y V, Bayburt TH, et al. Chapter 11 - Reconstitution of

- membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol.* 2009;464:211-231. doi:10.1016/S0076-6879(09)64011-8
212. Roberts BE, Paterson BM. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(8):2330-2334. doi: 10.1073/pnas.70.8.2330
  213. Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12297-12302. doi: 10.1073/pnas.94.23.12297
  214. Rodríguez I, Lázaro JM, Blanco L, et al. A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(18):6407-6412. doi:10.1073/pnas.0500597102
  215. Ruggero D, Creti R, Londei P. *In vitro* translation of archaeal natural mRNAs at high temperature. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;107(1):89-94. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06009.x
  216. Sachse R, Wüstenhagen D, Šamálíková M, Gerrits M, Bier FF, Kubick S. Synthesis of membrane proteins in eukaryotic cell-free systems. *Eng Life Sci.* 2013;13(1):39-48. doi:10.1002/elsc.201100235
  217. Safavieh M, Ahmed MU, Tolba M, Zourob M. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron.* 2012;31(1):523-528. doi:10.1016/j.bios.2011.11.032
  218. Sakatani Y, Ichihashi N, Kazuta Y, Yomo T. A transcription and translation-coupled DNA replication system using rolling-circle replication. *Sci Rep.* 2015;5:10404. doi:10.1038/srep10404
  219. Salehi ASM, Smith MT, Bennett AM, Williams JB, Pitt WG, Bundy BC. Cell-free protein synthesis of a cytotoxic cancer therapeutic: Onconase production and a just-add-water cell-free system. *Biotechnol J.* 2016;11(2):274-281. doi:10.1002/biot.201500237
  220. Schmid L, Weitz DA, Franke T. Sorting drops and cells with acoustics: acoustic microfluidic fluorescence-activated cell sorter. *Lab Chip.* 2014;14(19):3710-3718. doi:10.1039/c4lc00588k
  221. Schoborg JA, Clark LG, Choudhury A, Hodgman CE, Jewett MC. Yeast knockout library allows for efficient testing of genomic mutations for cell-free protein synthesis. *Synth Syst Biotechnol.* 2016;1(1):2-6. doi:10.1016/j.synbio.2016.02.004
  222. Schoborg JA, Hershewe J, Stark JC, et al. A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases. *Biotechnol Bioeng.* November 2017. doi:10.1002/bit.26502
  223. Schoborg JA, Hodgman CE, Anderson MJ, Jewett MC. Substrate replenishment and byproduct removal improve yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol J.* 2014;9(5):630-640. doi:10.1002/biot.201300383
  224. Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, et al. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(18):10113-10119. doi:10.1073/pnas.170237197
  225. Sciambi A, Abate AR. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz. *Lab Chip.* 2015;15(1):47-51. doi:10.1039/c4lc01194e
  226. Sepp A, Tawfik DS, Griffiths AD. Microbead display by *in vitro* compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett.* 2002;532(3):455-458. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03740-7
  227. Shaklee PM, Semrau S, Malkus M, Kubick S, Dogterom M, Schmidt T. Protein Incorporation in Giant Lipid Vesicles under Physiological Conditions. *ChemBioChem.* 2010;11(2):175-179. doi:10.1002/cbic.200900669
  228. Shangguan D, Cao Z, Meng L, et al. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res.* 2008;7(5):2133-2139. doi:10.1021/pr700894d

229. Shangguan D, Li Y, Tang Z, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32):11838-11843. doi:10.1073/pnas.0602615103
230. Shembekar N, Hu H, Eustace D, Merten CA. Single-Cell Droplet Microfluidic Screening for Antibodies Specifically Binding to Target Cells. *Cell Rep*. 2018 Feb 20;22(8):2206-2215. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.071
231. Shemesh J, Bransky A, Khoury M, Levenberg S. Advanced microfluidic droplet manipulation based on piezoelectric actuation. *Biomed Microdevices*. 2010;12(5):907-914. doi:10.1007/s10544-010-9445-y
232. Shields D, Blobel G. Cell-free synthesis of fish preproinsulin, and processing by heterologous mammalian microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(5):2059-2063. doi: 10.1073/pnas.74.5.2059
233. Shim J, Ranasinghe R, Smith C, et al. Ultrarapid Generation of Femtoliter Microfluidic Droplets for Single-Molecule-Counting Immunoassays. *ACS Nano*. 2013;7(7):5955-5964. doi:10.1021/nn401661d
234. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*. 2001;19(August):751-755. doi:10.1038/90802
235. Shimizu Y, Kanamori T, Ueda T. Protein synthesis by pure translation systems. *Methods*. 2005;36(3):299-304. doi:10.1016/j.ymeth.2005.04.006
236. Shin J, Noireaux V, An E. coli Cell-Free Expression Toolbox: Application to Synthetic Gene Circuits and Artificial Cells. *ACS Synth Biol*. 2012;1(1):29-41. doi:10.1021/sb200016s
237. Shopsowitz KE, Roh YH, Deng ZJ, Morton SW, Hammond PT. RNAi-microsponges form through self-assembly of the organic and inorganic products of transcription. *Small*. 2014;10(8):1623-1633. doi:10.1002/smll.201302676
238. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*. 1992;13(3):444-449.
239. Sissons CH. Yeast protein synthesis. Preparation and analysis of a highly active cell-free system. *Biochem J*. 1974;144(1):131-140. doi: 10.1042/bj1440131
240. Smith MT, Berkheimer SD, Werner CJ, Bundy BC. Lyophilized *Escherichia coli* -based cell-free systems for robust, high-density, long-term storage. *Biotechniques*. 2014;56(4):186-193. doi:10.2144/000114158
241. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7. doi: 10.1126/science.4001944.
242. Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY, Alakhov YB. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*. 1988;242(4882):1162-1164. doi: 10.1126/science.3055301
243. Srinivasan V, Pamula VK, Fair RB. An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab Chip*. 2004;4(4):310-315. doi:10.1039/b403341h
244. Stapleton JA, Swartz JR. Development of an *In Vitro* Compartmentalization Screen for High-Throughput Directed Evolution of [ FeFe ] Hydrogenases. *PLoS One*. 2010;5(12):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0015275
245. Stech M, Hust M, Schulze C, Dübel S, Kubick S. Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering, and modification of scFv antibody fragments. *Eng Life Sci*. 2014;14(4):387-398. doi:10.1002/elsc.201400036
246. Stech M, Merk H, Schenk JA, et al. Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *J Biotechnol*. 2013;164(2):220-231. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.08.020
247. Stech M, Quast RB, Sachse R, Schulze C, Wüstenhagen DA, Kubick S. A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e96635.



- doi:10.1371/journal.pone.0096635
248. Stedman TL. *Stedman's Medical Dictionary*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
  249. Strzelecka TE, Davidson MW, Rill RL. Multiple liquid crystal phases of DNA at high concentrations. *Nature*. 1988;331(6155):457-460. doi:10.1038/331457a0
  250. Sun Y, Xia Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*. 2002;298(5601):2176-2179. doi:10.1126/science.1077229
  251. Sun J, Ge J, Liu W, et al. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*. 2014;6(1):255-262. doi:10.1039/c3nr04425d
  252. Sun ZZ, Yeung E, Hayes CA, Noireaux V, Murray RM. Linear DNA for Rapid Prototyping of Synthetic Biological Circuits in an *Escherichia coli* Based TX-TL Cell-Free System. *ACS Synth Biol*. 2014;3(6):387-397. doi:10.1021/sb400131a
  253. Tarui H, Murata M, Tani I, Imanishi S, Nishikawa S, Hara T. Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;55(4):446-453. doi: 10.1007/s002530000534
  254. Tawfik D, Griffiths A. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*. 1998;16:652-656. doi:10.1038/nbt0798-652
  255. Terry SC, Jerman JH, Angell JB. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Transactions on Electron Devices*. 1979;26(12):1880-1886. doi: 10.1109/T-ED.1979.19791
  256. Theberge AB, Courtois F, Schaerli Y, et al. Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology. *Angew Chemie Int Ed*. 2010;49(34):5846-5868. doi:10.1002/anie.200906653
  257. Thoring L, Dondapati SK, Stech M, Wüstenhagen DA, Kubick S. High-yield production of &quot;difficult-to-express&quot; proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Sci Rep*. 2017;7(1):11710. doi:10.1038/s41598-017-12188-8
  258. Tiemann-Boege I, Curtis C, Shinde DN, Goodman DB, Tavaré S, Arnheim N. Product length, dye choice, and detection chemistry in the bead-emulsion amplification of millions of single DNA molecules in parallel. *Anal Chem*. 2009;81(14):5770-5776. doi:10.1021/ac900633y
  259. Toriello NM, Liu CN, Mathies RA. Multichannel reverse transcription-polymerase chain reaction microdevice for rapid gene expression and biomarker analysis. *Anal Chem*. 2006;78(23):7997-8003. doi:10.1021/ac061058k
  260. Umbanhowar PB, Prasad V, Weitz DA. Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream. *Langmuir*. 2000;16:347-351. doi:10.1021/la990101e
  261. Uzawa T, Hamasaki N, Oshima T. Effects of novel polyamines on cell-free polypeptide synthesis catalyzed by *Thermus thermophilus* HB8 extract. *J Biochem*. 1993;114(4):478-486. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124203
  262. VanInsberghe M, Zahn H, White AK, Petriv OI, Hansen CL. Highly multiplexed single-cell quantitative PCR. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191601. doi:10.1371/journal.pone.0191601
  263. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9236-9241. doi: 10.1073/pnas.96.16.9236
  264. Wandera KG, Collins SP, Wimmer F, Marshall R, Noireaux V, Beisel CL. An enhanced assay to characterize anti-CRISPR proteins using a cell-free transcription-translation system *Methods*. 2020 Feb 1;172:42-50. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.05.014
  265. Wang L-B, Wang Y-C, He R, et al. A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance. *J Am Chem*

- Soc. 2013;135(4):1272-1275. doi:10.1021/ja3120136
266. Wang R, Iwakura Y, Araki K, Sotoyama H, Takei N, Nawa H. *In vitro* production of an active neurotrophic factor, neuregulin-1: Qualitative comparison of different cell-free translation systems. *Neurosci Lett.* 2011;497(2):90-93. doi:10.1016/j.neulet.2011.04.036
  267. Wang W, Ren Y, Lu Y, et al. Template-dependent multiple displacement amplification for profiling human circulating RNA. *Biotechniques.* 2017;63(1):21-27. doi:10.2144/000114566
  268. Wang X, Shi J, Li Z, et al. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(16):14522-14532. doi:10.1021/am503787h
  269. Wei Y, Yang R, Yu X-Y, Wang L, Liu J-H, Huang X-J. Stripping voltammetry study of ultra-trace toxic metal ions on highly selectively adsorptive porous magnesium oxide nanoflowers. *Analyst.* 2012;137(9):2183. doi:10.1039/c2an15939b
  270. Wesolowska O, Michalak K, Maniewska J, Hendrich AB. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(1):33-39.
  271. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018 Mar;124(3):626-643. doi: 10.1111/jam.13647
  272. Xu L, Qu H, Alonso DG, Yu Z, Yu Y, Shi Y, Hu C, Zhu T, Wu N, Shen F. Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples *Biosens Bioelectron.* 2021 Mar 1;175:112908. doi: 10.1016/j.bios.2020.112908. Epub 2020 Dec 17.
  273. Xu G, Nolder D, Reboud J, Oguike MC, van Schalkwyk DA, Sutherland CJ, Cooper JM. Paper-Origami-Based Multiplexed Malaria Diagnostics from Whole Blood. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 Dec 5;55(49):15250-15253. doi: 10.1002/anie.201606060
  274. Xu G, Zeng S, Zhang B, Swihart MT, Yong K-T, Prasad PN. New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine. *Chem Rev.* 2016;116(19):12234-12327. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00290
  275. Zampatis DE, Rutz C, Furkert J, et al. The protease-activated receptor 1 possesses a functional and cleavable signal peptide which is necessary for receptor expression. *FEBS Lett.* 2012;586(16):2351-2359. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.042
  276. Zapata-Pérez R, García-Saura AG, Jebbar M, Golyshin PN, Sánchez-Ferrer Á. Combined Whole-Cell High-Throughput Functional Screening for Identification of New Nicotinamidases/Pyrazinamidases in Metagenomic/Polygenomic Libraries. *Front Microbiol.* 2016;7:1915. doi:10.3389/fmicb.2016.01915
  277. Zawada JF, Yin G, Steiner AR, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(7):1570-1578. doi:10.1002/bit.23103
  278. Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem.* 2015;16(17):2420-2431. doi:10.1002/cbic.201500340
  279. Zhang Z, Zhang Y, Song R, et al. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sensors Actuators B Chem.* 2015;211:310-317. doi:10.1016/j.snb.2015.01.106
  280. Zhou Y, Asahara H, Gaucher EA, Chong S. Reconstitution of translation from *Thermus thermophilus* reveals a minimal set of components sufficient for protein synthesis at high temperatures and functional conservation of modern and ancient translation components. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):7932-7945. doi:10.1093/nar/gks568

281. Zhou W, Takeda H. Cell-Free Production of Proteoliposomes for Functional Analysis and Antibody Development Targeting Membrane Proteins *J Vis Exp*. 2020 Sep 22;(163). doi: 10.3791/61871
282. Zhou Q, Qi L, Yang H, Xu C. Hierarchical nanoporous platinum–copper alloy nanoflowers as highly active catalysts for the hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane. *J Colloid Interface Sci*. 2017;513:258-265. doi:10.1016/j.jcis.2017.11.040
283. Zhu B, Mizoguchi T, Kojima T, Nakano H. Ultra-high-throughput screening of an *in vitro*-synthesized horseradish peroxidase displayed on microbeads using cell sorter. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127479. doi:10.1371/journal.pone.0127479
284. Zhu G, Hu R, Zhao Z, Chen Z, Zhang X, Tan W. Noncanonical self-assembly of multifunctional DNA nanoflowers for biomedical applications. *J Am Chem Soc*. 2013;135(44):16438-16445. doi:10.1021/ja406115e
285. Zhu Y, Fang Q. Analytical detection techniques for droplet microfluidics—A review. *Anal Chim Acta*. 2013;787:24-35. doi:10.1016/j.aca.2013.04.064
286. Zilionis R, Nainys J, Veres A, Savova V, Zemmour D, Klein AM, Mazutis L. Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics. *Nat Protoc*. 2017 Jan;12(1):44-73. doi: 10.1038/nprot.2016.154
287. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W, Zhong XY, Jackson LG, Hahn S. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*. 2008;28(12):1087-1093. doi:10.1002/pd.2150
288. Zinchenko A, Devenish SRA, Kintses B, Colin P-Y, Fischlechner M, Hollfelder F. One in a million: flow cytometric sorting of single cell-lysate assays in monodisperse picolitre double emulsion droplets for directed evolution. *Anal Chem*. 2014;86(5):2526-2533. doi:10.1021/ac403585p
289. Zubay G. *In Vitro* Synthesis of Protein in Microbial Systems. *Annu Rev Genet*. 1973;7(1):267-287. doi:10.1146/annurev.ge.07.120173.001411
290. Zubaitė G. Baltymų *in vitro* raiška nuo emulsijoje pagamintų DNR nanodalelių [bakalaurinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas;2016.
291. Zubaite G, Simutis K, Galinis R, Milkus V, Kiseliovas V, Mazutis L. Droplet Microfluidics Approach for Single-DNA Molecule Amplification and Condensation into DNA-Magnesium-Pyrophosphate Particles. *Micromachines*. 2017;8(2):62. doi:10.3390/mi8020062

## SUMMARY

### Introduction

High throughput methods are frequently used to solve various scientific challenges. For instance, new drug discovery (Gupta and others, 2017), screening for novel enzymatic activities in genomic libraries (Zapata-Pérez and others, 2016) or optimal growth conditions (De Diego and others, 2017), identification of new species in microbiota or environmental samples (Lynch and Neufeld, 2016) by a large degree relies on high throughput methods. However, even when automated systems screening procedures are being used it can take long periods of time to accomplish a given task, which can be prohibitively costly (Price and Paegel, 2016). It is not only possible to reach much higher throughputs if droplet microfluidics technology is being used, as compared to the robotic systems, but also further reduce the expenses associated with reagent consumption (Huang and Densmore, 2014). Given these and other advantages, droplet microfluidics is becoming a preferable tool over other high throughput methods.

Microfluidics technology has been applied in many fields and disciplines such as molecule detection, medical and fluorescent imaging, drug transportation, diagnostics and cell research among others (Chou and others, 2015). A particularly appealing application of droplet-based microfluidics technology is direct protein evolution (Gielen and others, 2018, Obexer and others, 2016 and Ryckelynck and others, 2015). Compartmentalization of individual DNA molecules encoding a given protein into microscopic aqueous droplets establishes a linkage between the genotype (DNA molecule) and phenotype (protein encoded by that same DNA molecule). Repetitive rounds of DNA mutagenesis, compartmentalization, screening and selection (sorting of positive aqueous droplets) are then applied to identify improved catalytic functions. In this process, the amplification of genetic material is a critical step that is necessary because of the protein synthesis from a single DNA molecule template is often insufficient to obtain enough protein, even if few picoliter-volume droplets are being used (Fallah-Araghi and others, 2012 and Stapleton and Swartz, 2010).

This work focuses on developing a new method to improve protein synthesis *in vitro* from a single DNA template. It also exploits a unique

feature of phi29 DNA polymerase, which is capable to synthesize multiple (clonal) branches of DNA template that remain entangled in one large molecule. This work attempts to find optimal reaction conditions for purification and of phi29-amplified DNA product, so that it could be used in downstream enzymatic procedures. In the future a method like this could be used not only for direct evolution, but for cell imaging or for anticancer drug delivery too, as it was exemplified recently (Zhu and others, 2013 and Lee and others, 2012). With this thesis it was found that DNA template amplified by phi29 DNA polymerase formed condensed DNA particles composed of magnesium, pyrophosphate and nucleic acids. The microparticles are harmless to the environment or humans and therefore they may find some useful applications (Shopsowitz and others, 2014).

The purpose of this work was to develop a method for isothermal amplification of single DNA molecules and condensation of amplified material into microparticles. In addition to that this dissertation focuses on purification and characterization of microparticles composed of DNA-magnesium-pyrophosphate microparticles and their use for *in vitro* gene synthesis.

**This work had following objectives:**

1. Isolate single DNA molecules using droplet microfluidic and perform their clonal amplification;
2. Characterize the reaction conditions needed for DNA-magnesium-pyrophosphate particle formation during isothermal DNA amplification;
3. Separate DNA microparticles from the reaction mix and free-DNA that remains in solution;
4. Evaluate suitability of DNA particles for *in vitro* transcription and translation reaction.

## Scientific novelty

Isothermal DNA amplification method that converts single circular DNA molecules into a condensed DNA-magnesium-pyrophosphate microparticles was developed. Nuclei acid templates were amplified in 4 picoliter volume, aqueous microdroplets using phi29 DNA polymerase and other reaction components that are needed for DNA synthesis. Conditions that reduce DNA losses due to nonspecific adsorption on surfaces when nucleic acids are being highly diluted (less than 100 pg/ $\mu$ l) were found. Reaction conditions under which amplified DNA was incorporated into micrometer-sized particles containing magnesium and pyrophosphate were optimized. Although similar higher-order DNA structures were previously obtained from a mixture of DNA molecules (Zhu and others, 2013) to the best of our knowledge this work reports first case when DNA microparticles were generated from a single DNA template. We have also evaluated how heat inactivation of DNA amplification reaction affects microparticle size and formation. Up to this date there are no scientific reports showing that aforementioned DNA particles can be produced using multiply primed rolling-circle amplification (RCA) reaction with random hexanucleotides. We successfully purified DNA microparticles and showed that the *in vitro* synthesis of eGFP and  $\beta$ -galactosidase enzyme. In conclusion, a method developed during the course of this thesis enables efficient *in vitro* protein synthesis using condensed DNA microparticles composed of clonally amplified DNA, and eventually it could open new possibilities for directed protein evolution.

## Methods

This section contains only the most important methods. Please, see Lithuanian section for more detailed descriptions of methods (page 55).

### 1. Microfluidic chip manufacturing

Microfluidic chip production involves two major steps: mold production and microchip production.

#### **Mold production**

A typical production process begins with a design of a microfluidic chip. A selected geometry is drawn by using an AutoCAD software. The drawing is printed with a high resolution printer to create a mask which will be later placed onto a silica disc coated with photoresist. Silica disk is used as a substrate for mold production. The mold production process starts with an incubation at 200 °C to remove moisture. Then photoresist is transferred onto the substrate and is distributed evenly by spin-coating. Next the incubations at 65 °C and 95 °C are performed to harden photoresist. After these steps the substrate is transferred to the mask aligner, the mask is added on top hardened photoresist and an entire setup is exposed to the UV light. UV induces polymerisation of exposed regions. The setup can be heated to increase the speed of polymerisation. Finally, unpolymerised photoresist is being removed in the development step i.e. redundant parts of the photoresist are washed away leaving microfluidic mold on the silica chip. Mold production steps and more detailed conditions are described in Table 1.

**Table 1.** Conditions for mold production

Process	Value for SU8-2007 resist	Value for SU8-2015 resist
Incubation at 200°C	> 10 min	> 10 min
Substrate spinning	500 rpm/min, 10 s	500 rpm/min, 10 s
Substrate spinning	1700 rpm/min, 30 s	1715 rpm/min, 30 s
Incubation at 65°C	2 min	3 min
Incubation at 95°C	3 min	4 min
UV exposure	hard contact, 60 s	soft contact, 12 s
Incubation at 65°C	1 min	1 min
Incubation at 95°C	4 min	5 min
Development	3 min	3 min

### Microchip production

PDMS (polydimethylsiloxane) is being poured on top of the manufactured mould. This sample is degassed to remove bubbles and it is incubated at 65°C for 2 hours to harden PDMS. The hardened silicone is then being cut out, removed from the mold and holes are being punched with a biopsy needle. Then oxygen plasma is used to bond silicone onto a microscope glass surface. Finally, channels in the microchip are being treated with “Aquapel” to reduce wetting.

#### 2. DNA amount estimation based on Poisson distribution

When the sample is emulsified, DNA molecules distribute into droplets following Poisson distribution:

$$P(k; \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$$

**Equation 1.** Equation for Poisson distribution

$\lambda$  is an average molecule number per droplet,  $e$  – Euler’s number equal to 2,718...,  $k$  is the number of DNA molecules per droplet and  $k!$  - is  $k$  factorial.  $P(k, \lambda)$  is a probability of finding  $k$  number of DNA molecules in a droplet. An example of the calculation results can be seen in the table below:

**Table 2.** DNA molecules distribution in droplets, when  $\lambda = 1$

DNA molecule amount in droplets, units or k	Percentage of droplets containing k amount of DNA molecules, %
0	36,8
1	36,8
2	18,4
3	6,1
4	1,5
$\geq 5$	0,4



### 3. DNA amplification in droplets

Conditions for DNA amplification in microfluidic droplets are presented in the table below:

**Table 3.** DNA amplification reaction components

Component	Final concentration
Exonuclease resistant random hexanucleotide	50 $\mu$ M
Poloxamer 407	0,4 % (w/v)
DNA	-
Water	-
dNTP (mix)	1 mM
phi29 DNA polymerase buffer (NEB)	1 X
phi29 DNA polymerase	0,8 U/ $\mu$ L

An average amount of DNA per single droplet varied depending on the experiment from  $\lambda = 0,1$  to  $\lambda = 2$ . Hexanucleotides (containing phosphorothioate bonds), poloxamer 407, DNA and water were added to a tube. The tube was then incubated at 95°C for 30 to 60 seconds. After cooling down the tube other reagents were added. Then the sample was emulsified and incubated at 30°C for 15-17 hours (usually 16 hours). After that DNA amplification phi29 was heat inactivated by incubating sample at 65°C for 10 minutes.

### 4. *In vitro* transcription and translation

Two *in vitro* transcription and translation kits were used: ThermoFisher Scientific kit is based on purified components and NEB kit is based on crude *E. coli* extract. Both kits were stored at -70°C and the required number of components from the kit was transported to +4°C for thawing ~0,5-1 h before sample preparation. IVTT reaction was prepared according to manufacturer's recommendations. In addition, reaction mix was supplemented with RiboLock or mouse RNase inhibitor to a final concentration of 1 U/ $\mu$ l.

DNA amount varied depending on the experiment. *In vitro* transcription and translation reaction was transferred to a microtiter plate or emulsified after being prepared. Incubation was carried out at 37°C for NEB or at 30°C for

ThermoFisher Scientific mixture. If a reaction was carried out in a microtiter plate, eGFP protein fluorescence was recorded directly on a plate reader. LacZ was first synthesized in a separate tube and then 1  $\mu\text{l}$  of this reaction was mixed with 9  $\mu\text{l}$  of FDG (Fluorescein di( $\beta$ -D-galactopyranoside)) analysis buffer. As LacZ hydrolysed FDG to fluorescein, fluorescence was recorded. If a reaction was carried out in droplets, they were spread on a hemocytometer, and fluorescence was recorded. In case of LacZ synthesis in droplets FDG was added before protein synthesis (0,8 - 1  $\mu\text{M}$ ). DNA was stained in droplets by adding EtBr (added before synthesis) or SYTO 84 (added to the emulsion after synthesis).

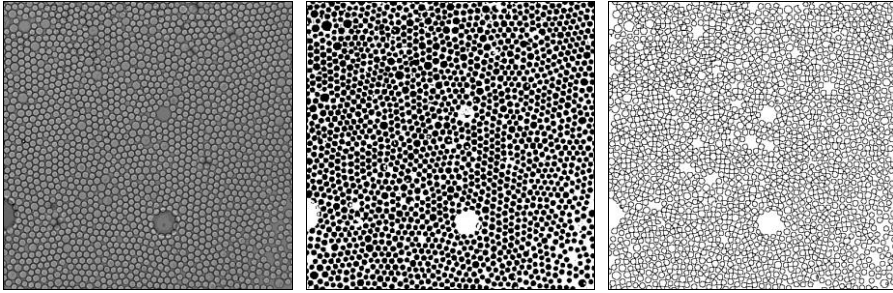
### *5. Droplet production*

Reaction mixture and oil phase were injected into microfluidic chip with syringes and syringe pumps. The syringe was filled with liquid and connected to the microfluidic chip with a PTFE tubing. The oil phase syringe was filled with HFE7500 oil supplemented with 2 % (w/v) EA1 surfactant. Water phase syringe was filled with 200-400  $\mu\text{l}$  HFE7500 oil and a reaction mixture was added on top of oil. Syringe pump for the water phase was set to 50  $\mu\text{l}/\text{h}$  for a 11  $\mu\text{m}$ -high microchip and to 100  $\mu\text{l}/\text{h}$  for a 19  $\mu\text{m}$ -high microchip. Syringe for the oil phase was often set to 150  $\mu\text{l}/\text{h}$  and occasionally set to a range of 250-300  $\mu\text{l}/\text{h}$  for the 11  $\mu\text{m}$ -high microchip. For the 19  $\mu\text{m}$ -high microchip it was set up to 250  $\mu\text{l}/\text{h}$ .

### *6. Evaluation of fluorescent droplet quantity*

A monolayer of droplets was spread on a hemocytometer. Brightfield and fluorescence images were taken from the same spot using 10X objective. For a single sample images were recorded from three different spots. ImageJ software was used for image analysis. First, by applying an intensity threshold a brightfield image was modified, and then transformed into negative and into inverted image (Figure 1). Afterwards morphologic operations “Open” and “Watershed” were used. Droplet quantity was retrieved with a tool “Analyze Particles”.

Similarly, fluorescence images were modified first by applying a threshold and then by the morphological operation “Watershed”, which separated connected droplets (Figure 2). Droplet quantity was obtained with the ImageJ tool “Analyze Particles”.



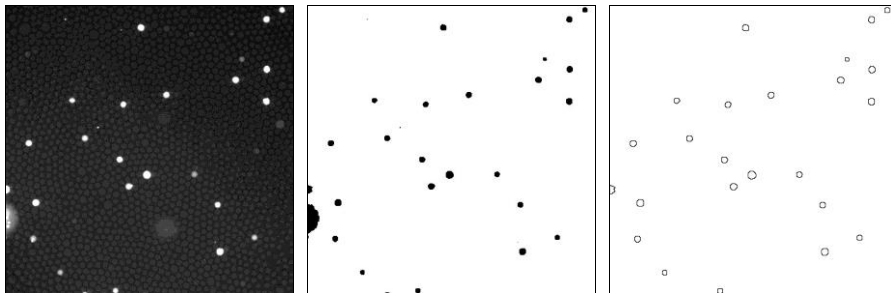
**Figure 1.** Brightfield image analysis.

**On the left** is a brightfield image taken with a 10 X objective.

**In the centre** is a brightfield image after applying threshold, inversion, “Open” and “Watershed” operations.

**On the right** is an image, where we see which droplets were counted by the “Analyze Particles” tool.

Brightfield images were used to determine the total quantity of droplets per image. For example, in Figure 1 one can observe 1778 droplets recorded. The fluorescence images were then used to determine the fraction of fluorescent droplet. Figure 2 shows 24 fluorescent droplets, which constitutes 1,3 % of the total quantity recorded in Figure 1.



**Figure 2.** Fluorescent image analysis.

**On the left** is a fluorescent image taken with a 10 X objective.

**In the centre** is a fluorescent image after threshold and “Watershed” operations.

**On the right** is an image, where we see which droplets were counted by the “Analyze Particles” tool.

## 7. Particle purification

After DNA amplification, emulsion fractions were separated by mixing 1 part of emulsion with 2 parts of PFO (1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol).

### **DNA particle purification with restriction endonuclease**

After emulsion was broken up into fractions, water phase was diluted up to 400  $\mu\text{L}$  and centrifuged at 10 000 g for 10 minutes. Particles were digested by adding 10  $\mu\text{l}$  of 10 X R restriction buffer, 10  $\mu\text{l}$  of restriction endonuclease and water up to a level of 100  $\mu\text{L}$ . Restriction endonuclease should cut DNA outside the region coding a signalling protein. Incubation took 15 - 20 minutes at 37°C. The sample was then diluted up to 400  $\mu\text{L}$  and centrifuged at 10 000 g for 10 minutes. Washing and centrifugation was repeated twice. Particles were diluted to 15 – 25  $\mu\text{L}$  and counted by using hemocytometer and fluorescence microscope.

### *8. Particle size measurement using TEM*

A sample of emulsion was taken after DNA amplification. It was divided into two parts. One of the parts was heat treated at 65°C for 10 minutes. Both samples were used for transmission electron microscopy (TEM). After emulsion was broken up 4  $\mu\text{l}$  of sample was transferred on a TEM grid. After ~1 minute of incubation the grid was dried by using filter paper. 4  $\mu\text{l}$  of 2 mM uranyl acetate was added on top and left for ~1 minute. By using filter paper, the grid was dried. Five images were recorded for randomly selected areas of the grid. Then the ImageJ software was used to measure particle sizes from the TEM images.

## Results

Proteins act as a catalyst of chemical reactions. Some of these reactions are very efficient and are only limited by molecule diffusion (Berg and others, 2002). A good example of high efficiency is  $\beta$ -lactamase, which protects *Azospirillum lipoferum* from  $\beta$ -lactam antibiotics (Boggio and Roveri, 2003). However, not all enzymes are so efficient. On the contrary, most of the proteins in nature possess “mediocre” catalytic efficiency, which is defined by a  $k_{cat}/K_M$  constant. Catalytic efficiency of “mediocre” enzymes is around  $10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . If enzyme  $k_{cat}/K_M$  constant would be limited by molecule diffusion only, it could be 10 000 times higher, i.e.  $10^8$ - $10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Koenig and Brown, 1972). Limited efficiency of enzymes is a result of natural evolution – a cell does not need to have maximum catalytic efficiency for every enzyme in order to survive. In principle catalytic efficiency of many enzymes could be improved with the help of natural or artificial evolution (Bar-Even and others, 2011).

In a laboratory setting protein biochemical properties can be tuned by using rational design, directed evolution or semi-rational design-based methods. When rational design is used, one relies on available knowledge about protein structures or catalytic mechanisms to determine how amino acid sequence should be changed (e. g., amino acids in active side). Directed protein evolution is used more often, when there is little knowledge of which changes to make in the sequence to reach a desired change in the enzyme activity. In this case amino acid sequence is amended with many random changes, therefore, one aims to test a mutant library as large as possible. Semi-rational design users attempt to combine both methods.

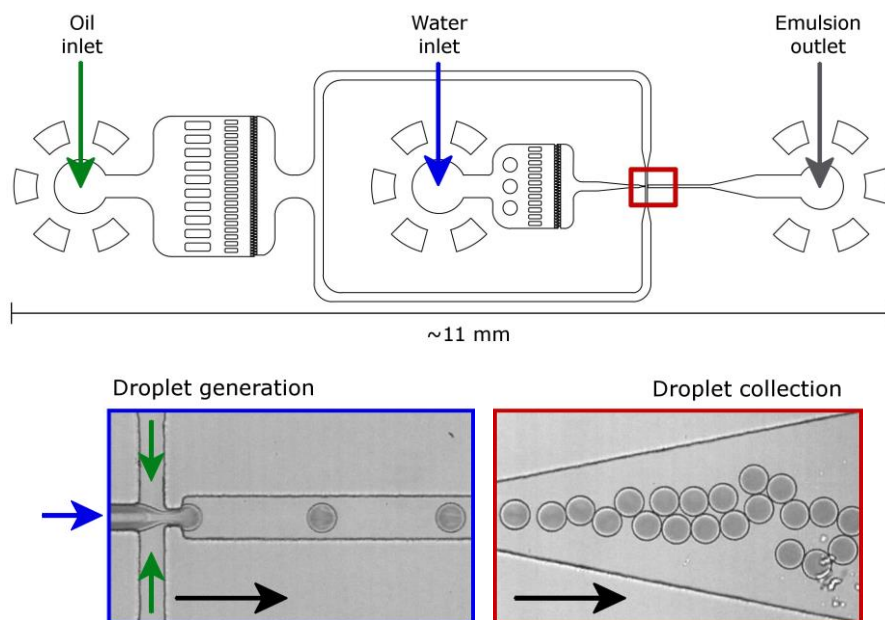
Now there are many methods for *in vitro* directed protein evolution. Some of them use cells or viruses in one of the steps (therefore they are referred to as *in vivo* methods) to relate protein with his DNA sequence. However, an *in vivo* step is not always beneficial in *in vitro* evolution methods as it may reduce mutant library size or *in vitro* evolution can be carried out only if a cell can survive, i.e., evolution conditions are not harmful for a living cell. It is possible to use evolution methods without the *in vivo* step to avoid the disadvantages, but one must find another way to link phenotype with its genotype. In some cases, this issue can be solved by linking mRNA with the protein coded inside of it via puromycin (Roberts and Szostak, 1997) or over ribosome (Mattheakis and others, 1994). Equally, it is possible to synthesize every single protein separately (e. g., in a 96-well

plate) (Lanio and others, 2000). Though, these molecule complexes lack stability and micro-well plate method is often limited by small mutant library size. For this reason, *in vitro* evolution methods are getting more popular, as they can test large mutant libraries and can link phenotype with genotype by encapsulating them into a single droplet.

We wanted to create a more efficient method for protein synthesis *in vitro*. The research project started with single DNA molecule synthesis in microfluidic droplets. However, in this way it was impossible to detect protein synthesis. To improve our results, we amplified DNA molecules first which was followed by protein synthesis. DNA quantity can increase at least 1000 times after amplification, so one can expect a subsequent increase in *in vitro* synthesized protein amount. It was surprising for us to find microparticles containing DNA after amplification in droplets. Based on this observation it was concluded that the amplified DNA might be incorporated in the microcrystals composed of magnesium and pyrophosphate (Shopsowitz and others, 2014). Magnesium and pyrophosphate are generated as the by-products of DNA synthesis reaction (Mori and others, 2001). During this work, several methods for separation of DNA incorporated in the particles from the DNA not incorporated in the particles were tested. Purified DNA microparticles were successfully used as a matrix for protein synthesis *in vitro*. Microparticles were used to synthesize two proteins: green fluorescent protein (eGFP) and  $\beta$ -lactamase (LacZ). The results presented in this PhD thesis started a new research direction in Microtechnology laboratory, Institute of Biotechnology, and created a new method that will supplement the list of protein engineering methods.

### *1. Manufacturing and testing of microfluidic modules*

In this work a DNA synthesis and a protein *in vitro* transcription and translation were carried out in microfluidic droplets. The droplets were generated in microfluidic chips. Detailed production of these microfluidic modules is described in chapter 1, Methods section. Microfluidic chips that have been produced had to surpass certain requirements: they had to generate small droplets similar to a size of a single cell ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ), droplet production process should be stable for at least one hour or longer and created droplets had to be as monodisperse (similar volume) as possible.



**Figure 3.** Droplet generation design.

Overall arrangement of microfluidic channels in the microfluidic chip is shown **above**. Oil phase inlet is marked with the green arrow on the left, water phase inlet for the reagents is marked with the blue arrow in the middle and outlet, where emulsion is collected, is marked on the right side with the grey arrow. Blue square marks the channel junction, where oil phase mixes with water phase i.e., the emulsion is generated. Red square marks microfluidic module part, where generated droplets travel towards outlet.

**Bottom left corner image (outlined in blue)** shows droplet generation junction called nozzle. The reagents flow from the left side (marked with blue arrow) and oil flows from above and below (marked with green arrows). In the junction oil splits water into separate droplets. Black arrow marks droplet flow direction.

**Bottom right corner image (outlined with red)** shows separate droplets flowing in the direction of outlet. In this section droplets surface is covered with sufficient amount of surfactant so that they can touch each other without fusing. Black arrow marks droplet flow direction.

Microfluidic modules that have similar design were used for encapsulation of DNA amplification mixture and for encapsulation of *in vitro* transcription and translation mixture (Figure 3). Reaction mixtures had different viscosity. This parameter affects the flow through the channels and was considered when designing microchannels. Microfluidic module with 11  $\mu\text{m}$  high microchannels was used to emulsify DNA amplification mixture. Microfluidic module with 19  $\mu\text{m}$  high microchannels was used to emulsify

*in vitro* transcription and translation reaction mixture. The droplet volume was ~4 pl and ~20 pl for 11  $\mu\text{m}$  and 19  $\mu\text{m}$  high channels, respectively.

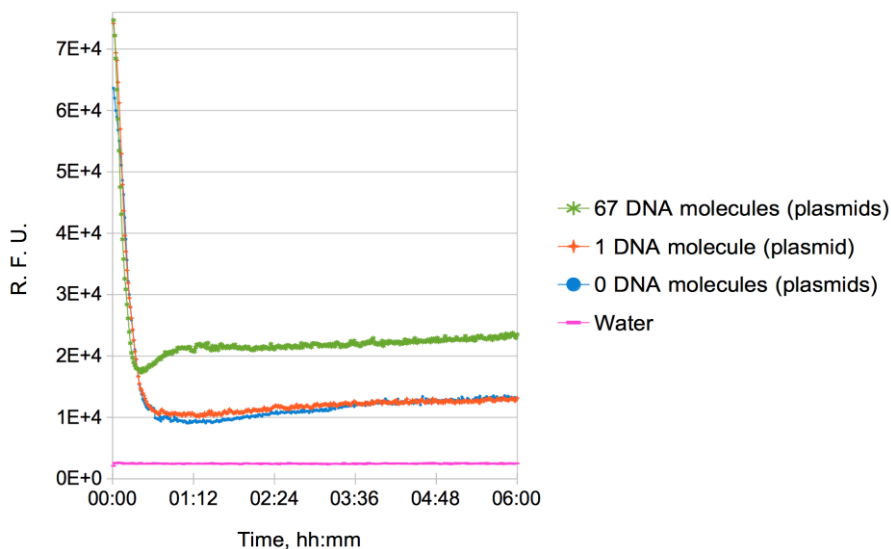
## 2. Protein synthesis from single molecule

To perform an *in vitro* evolution experiment, one must be able to synthesize a protein in a microfluidic droplet. In this experiment a droplet performs two key functions: it acts as a barrier and as a link. Firstly, a droplet must link one single phenotype with a specific genotype that codes this protein. Secondly, a droplet should also act as a barrier by separating one genotype and corresponding phenotype from other genotypes and phenotypes. Only when these conditions are met, one can expect to sort droplets according to phenotype while simultaneously selecting a matching genotype. A droplet acts as a barrier only if it contains single type genetic material. In other words, the barrier function fails when a blend of different genetic materials is present in a single droplet. When eGFP protein synthesis experiment from single DNA molecule was performed in droplets, no fluorescence was detected. To test if the lack of signal was caused by any of microfluidic system component, we repeated the experiment in a microtiter plate. In this test experiment different dilutions were prepared. They correspond to 67, 1 or 0 DNA molecules per droplet if an equivalent experiment was performed in the microfluidic system (Figure 4). The dilution of 67 molecules per droplet showed fluorescence, whereas the dilutions of 1 and 0 molecules per droplet showed no signal. This confirmed that fluorescent signal from the eGFP cannot be received due to reduced amount of DNA.

*In vitro* transcription and translation in microfluidic droplets are limited by low DNA concentration, but it is possible to overcome this issue. One way is to reduce droplet volume and thereby to increase DNA concentration. Courtois et al suggest that change in oil type might help (Courtois and others, 2008). Third option is to increase DNA concentration in reaction mixtures.

As explained earlier the aim is to have a single molecule of DNA per droplet, on the other hand an increase in DNA concentration could improve fluorescence signal level. An increase in concentration by decreasing reaction volume of a droplet appears to be the best option. Channel dimensions limit droplet size (for instance, the smallest possible drop





**Figure 4.** eGFP protein synthesis in microtiter plate. eGFP protein was synthesized using Thermo Fisher Scientific *in vitro* transcription-translation mix, using DNA amount, which corresponds to 67, 1 or 0 DNA molecules per droplet.

diameter in our microfluidic system is  $\sim 10 \mu\text{m}$ , which corresponds to 0,5 pl). A concentration of a single molecule in this volume is 3 pM. It is possible to produce smaller drops (Shim and others, 2013; Lim and others, 2012) so that DNA concentration would be increased. The drawback of this approach is that it is much easier to produce smaller droplets than to manipulate them afterwards, i.e., to sort, fuse, split and perform other manipulations. Microfluidic modules were optimised to work with bigger droplets. Only recently new publication appeared, where an entire set of microfluidic modules for femtoliter droplets was presented (Leman and others, 2015). At the time of the experiment this option was unavailable.

Other scientists (Courtois and others, 2008) reported successful GFP protein synthesis from a single DNA molecule. They have used mineral oil instead of fluorinated and Abil EM 90 surfactant instead of EA1. This kind of microfluidic system suffers from higher droplet instability. Also, mineral oil is more viscous than fluorinated oil, as a result, all microfluidic steps turn to be slower. For example, a droplet production rate might decrease from 30 000 to 440 drops per second (Theberge and others, 2010 and Courtois and

others, 2008). Higher viscosity makes it more difficult to get monodisperse droplets and thus complicates work with the system.

Facing the difficulty of getting protein synthesis from a single DNA molecule, one often chooses to amplify DNA in advance. A single DNA molecule can be amplified in a single microfluidic droplet. Later on this droplet can be fused with another droplet containing reaction mixture for *in vitro* transcription and translation (Mazutis and others, 2009). Another possibility is to attach amplified DNA to a single microparticle carrier. Afterwards the emulsion can be broken and recovered microparticle carriers can be emulsified one more time together with the reagents for *in vitro* protein synthesis (Stapleton and Swartz, 2010).

We tested for eGFP protein synthesis in microfluidic droplets. Two samples were prepared. One sample was a positive control sample containing ~13 000 copies of DNA molecules per single droplet (the DNA amount was chosen according to manufacturer recommendations). Another sample was a negative control sample, where no DNA was added. Both samples were emulsified and incubated for 6 hours at 30 °C. After that incubation droplets from both samples were mixed, spread on a hemocytometer and imaged (Figure 5).

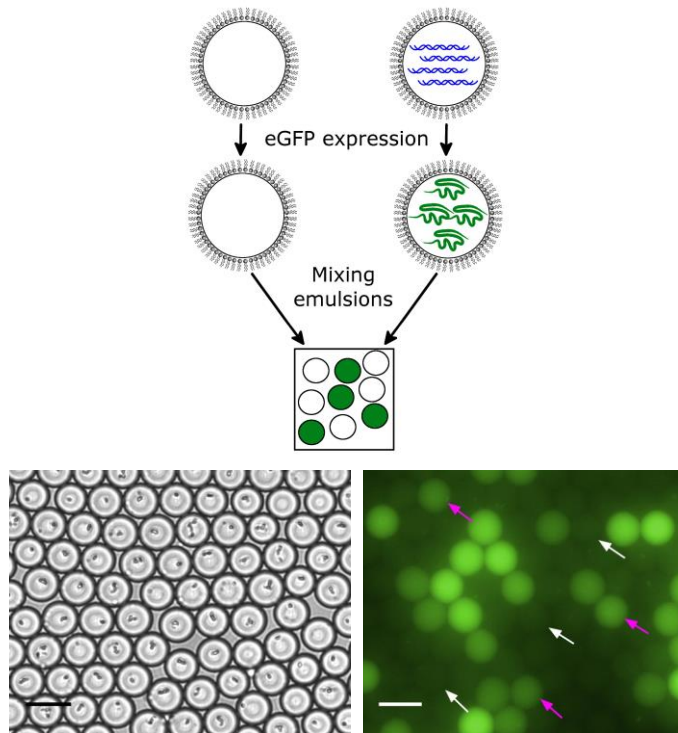
Figure 5 shows two distinct droplet populations: the bright ones and the pale ones. The bright droplets are fluorescent, and the pale ones are non-fluorescent. These results suggest that enough DNA per droplet is important to get successful protein synthesis.

### *3. Amplification of single DNA molecule and DNA-magnesium-pyrophosphate particle formation*

#### *a. Conditions for DNA amplification and particle synthesis*

DNA was amplified using phi29 DNA polymerase and isothermal amplification cycle. Isothermal condition was chosen, because microfluidic droplets tend to be more stable in a constant temperature than in a conventional PCR thermal cycling regime (Kennedy and Oswald, 2011). Composition of DNA amplification mixture was as follows:

After amplification emulsion was stained with SYBR Safe fluorescent dye. Droplets were spread on a hemocytometer, and fluorescent images were taken. In addition to the fluorescent droplets, bright dots within the droplets can also be observed (Figure 6).



**Figure 5.** eGFP protein synthesis in microfluidic droplets.

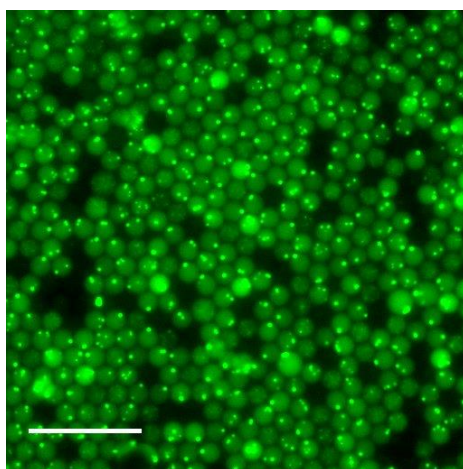
**Above** is shown the schematic of experimental workflow. Two samples were prepared. One contained only IVTT mix (on the left) and another (on the right) contained IVTT mix with added DNA (represented in blue). After incubation protein was synthesized only in the droplets containing DNA. Both samples were mixed together, and fluorescent images were taken (image at the bottom of the scheme).

**Below** are the actual microscopy images taken after the experiment. On the left side there is a brightfield image and on the right side a corresponding fluorescent image. The image on right side shows two droplet populations. One droplet population is bright because of synthesized eGFP protein fluorescence (where ~13 thousand DNA molecules were added) – marked with purple arrows. Another part of the droplets is due to the lack of protein – marked with white arrows. Scale bar on the images is equal to 25  $\mu\text{m}$ .

Further the origin of bright spots within the droplets was investigated. The emulsion was broken up into fractions after DNA amplification and samples were imaged with a transmission electron microscope (TEM) as well as with a scanning electron microscope (SEM, images were done by dr. Vaidotas Kiseliovas). A network of threads and dark spots were observed in

**Table 4.** Composition of DNA amplification mixture

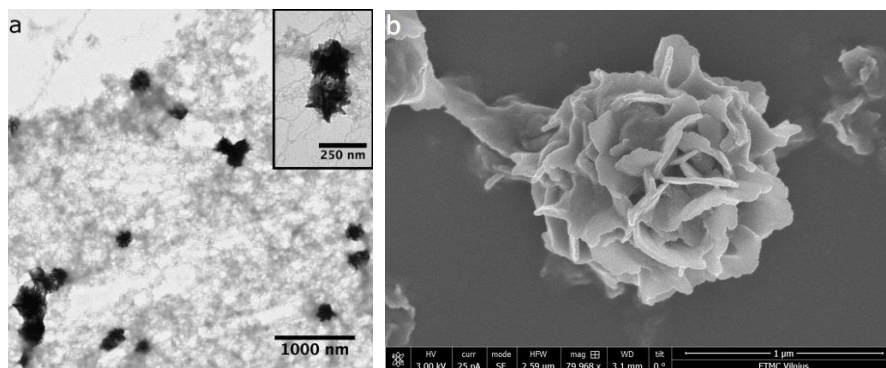
Component	Final concentration
Exonuclease resistant random hexanucleotide	50 $\mu$ M
dNTP (mix)	1 mM
phi29 DNA polymerase buffer (NEB)	1 X
BSA	0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L
phi29 DNR polymerase	0,8 U/ $\mu$ L
poloxamer 407	0,4 % (w/v)
DNA	-
Water	-



**Figure 6.** DNA amplification in microfluidic drops. The image shows droplets that are fluorescent due to amplified DNA inside of them. Also, many droplets contain bright fluorescent dot. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

TEM images, which visually appeared like polymorphic crystals (Figure 7, a). SEM images revealed detailed surface structures of these objects (Figure 7, b).

Other group has recorded similar particles (Zhu and others, 2013). Zhu et al have also used phi29 DNA polymerase for DNA amplification too. On the other hand, two experiments used different modes of DNA amplification. In this work multiply-primed rolling circle amplification was preferred while Zhu et al chose rolling circle amplification. Another difference in our case



**Figure 7.** Sample was taken after DNA amplification. TEM image of the sample is shown in (a) and SEM image in (b).

was that the reaction took place in microfluidic droplets compared to bulk reaction reported in literature. Similar polymorphic crystals were also reported after RNA amplification (Shopsowitz and others, 2014). The RNA was amplified using T7 RNA polymerase. It showed that the core of the particle is composed from  $Mg_2P_2O_7 \times 3,5 H_2O$  and the shell is mostly coated with RNA. RNA constituted about 15-21 % of entire particle mass. Based on this literature it was assumed that the particles are of similar nature. It is well known that magnesium pyrophosphate forms during DNA amplification. Therefore, the assumption was made that DNA might behave in a similar manner to RNA – DNA should attach to the surface of the particle. This way magnesium pyrophosphate particle naturally acts as a nucleic acid carrier. The carrier function could in principle benefit the transportation of amplified DNA to new emulsion with IVTT mixture. This advantage could simplify the work, i.e., to avoid additional microfluidic steps like droplet fusion (Mazutis and others, 2009) or picoinjection (Abate and others, 2010). The carrier function is also supported by research work of Drmanac and others, 2010. It was shown successfully that similar particles work as a matrix in DNA sequencing.

It was seen that the number of particles present in each fluorescent droplet varied from 1,5 to 0,1. Though an explanation for this behaviour was not found. Perhaps particle quantity correlated with the quality of polymerase or DNA, or it was due to heat inactivation or other factors.

After amplification an expected number of fluorescent drops was calculated by using Poisson distribution and by knowing DNA concentration. Even though the reaction conditions were optimised, an

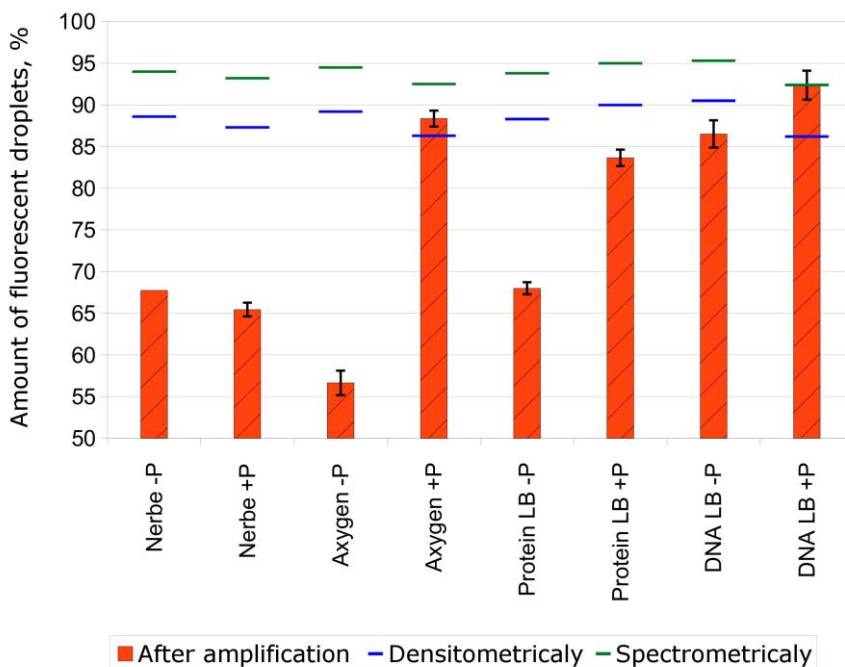
expected number of fluorescent drops was not received. Some of the DNA might get lost due to non-specific adsorption on the surfaces.

### *b. Nonspecific adsorption*

In the previous section it was hypothesised that some of the DNA might be lost due to non-specific adsorption on the surfaces. It is known that common polypropylene tubes can adsorb more than 10 ng of DNA and if DNA concentration is below 100 pg/ $\mu$ l, one might lose up to 95 % of material due to nonspecific adsorption (Gaillard and Strauss, 1998). This information was especially important to this work, as DNA solutions were diluted down to 10-50 pg/ $\mu$ l. To reduce nonspecific adsorption in significantly diluted solutions several different tube types were tested as well as an additive of chemical origin to reduce adsorption.

By preparing a new stock of DNA the experiment was started. The DNA concentration was determined by using two different methods: spectrometry and densitometry. Then the stock solution was being used to prepare diluted solutions. The dilutions were done with either water or poloxamer 407 0,4 % (w/v) solution down to 40 pg/ $\mu$ l of DNA. Obtained solutions were aliquoted into different types of tube: “Nerbe Plus”, “Axygen MAXIMUM RECOVERY”, “Eppendorf Protein LoBind” and “Eppendorf DNA LoBind”. Prepared samples were incubated at 37°C for 3 hours to reach maximum nonspecific adsorption (Gaillard and Strauss, 1998). After incubation, the solutions stored in different tubes were used to prepare DNA amplification mixtures. DNA amplification was carried out in droplets.

Based on DNA concentration, determined spectrometrically and densitometrically, and on produced drop size an expected number of fluorescent droplets was estimated according to Poisson distribution model (Figure 8, green and blue dashes respectively). Factually obtained fluorescent drop quantity was retrieved from images (red bars with dashes, Figure 8). The poloxamer 407 surfactant decreased non-specific adsorption as expected. Samples where poloxamer 407 was added had more fluorescent droplets than samples where surfactant was not added. The only exception was the “Nerbe Plus” tubes, where the difference between the samples with and without poloxamer 407 was insignificant. The lowest nonspecific adsorption was observed in “Axygen MAXIMUM RECOVERY” and “Eppendorf DNA LoBind” tubes when poloxamer 407 was used.



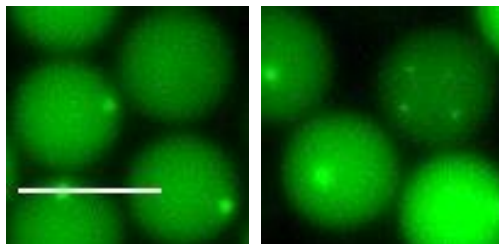
**Figure 8.** DNA amplification results, when diluted DNA solutions were kept in different tubes. DNA solutions were diluted inside different tubes and were then used for DNA amplification reactions. An expected droplet number was calculated using Poisson distribution. DNA concentration for the calculations were determined spectrometrically (green dash) or densitometrically (blue dash). DNA quantity derived from images after amplification is presented in red bars. Calculated DNA quantity varied among the samples due to the slight variation in droplet size. Error bars show one standard deviation. „+/-P“ – marks whether poloxamer 407 was used during DNA dilutions. “Nerbe” marks Nerbe Plus, “Axygen” - Axygen MAXYMUM RECOVERY, “Protein LB” - Eppendorf Protein LoBind or “DNA LB” - Eppendorf DNA LoBind tubes.

According to Axygen and Eppendorf tube specifications and absent chemical treatment of tubes as explained by the manufacturer it is likely that nonspecific adsorption might be caused by physical surface defects.

### *c. Heat inactivation*

Microfluidic droplet can contain either a single bright fluorescent dot or multiple less bright fluorescent dots. It was noticed that this behaviour depends on phi29 DNA polymerase heat inactivation step. When emulsion was not heat inactivated droplets contained single bright dots or no dots at

all. Most of the drops contained particles when heat inactivation was done at 65°C for 10 minutes. Single bright particles or few weaker fluorescent particles per droplet were observed (Figure 9). Therefore, it was decided to evaluate particle size distribution in more detail.

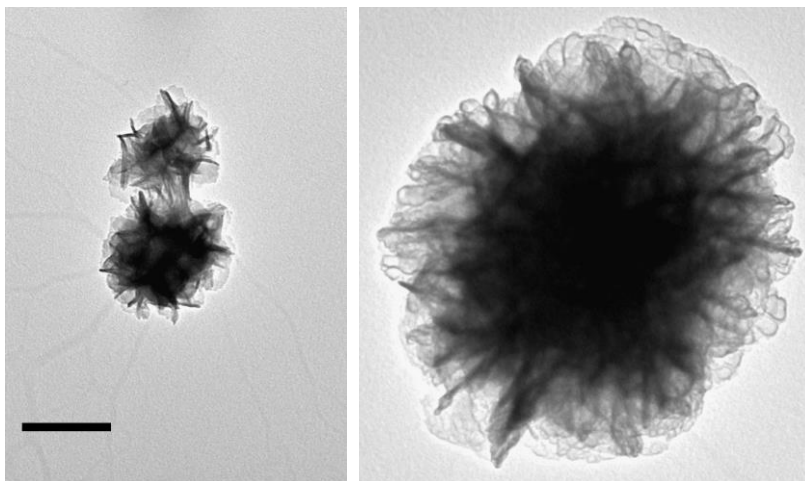


**Figure 9.** Images of droplet fluorescence after DNA amplification. Droplets in emulsion shown on the left side were not heat treated (65°C 10 minutes) and droplets in emulsion shown on the right side were heat treated. Non-heated droplets (left) have either one bright dot or no dot at all. Whereas heated droplets (right) have either a single bright dot and or several less bright dots. The scale bar corresponds to 20  $\mu\text{m}$ . The images were recorded by Karolis Simutis.

Size distribution of bright fluorescence spots was assessed using TEM imaging. After 16 hours of DNA amplification in droplets emulsion was divided into two separate tubes. One of them was heat treated at 65°C for 10 minutes. Afterwards both tubes were transferred back to 30°C. Samples from both tubes were taken after 17, 38 and 66 hours as of DNA amplification reaction started. Emulsion was broken up and particles were imaged using transmission electron microscopy (TEM) (Figure 10). ImageJ was used to evaluate particle size and particle size distribution (Figure 11).

Emulsion unaffected by heat had an average particle size of about 1300 nm and almost all particles were bigger than 700 nm (Figure 11, graphs on the left side). When DNA polymerase was heat inactivated (Figure 11, graphs on the right side), the size distribution transformed into a binomial distribution. A significant size of the population remerged in the smaller sizes range below 700 nm. Only 18-30 % remained above 700 nm level. The average size of all particles below 700 nm was 350 nm (Figure 11, graphs on the right side and Figure 10, image on the left). Using dynamic light scattering (DLS) method (Figure 12) Vaidotas Kiseliovas obtained similar





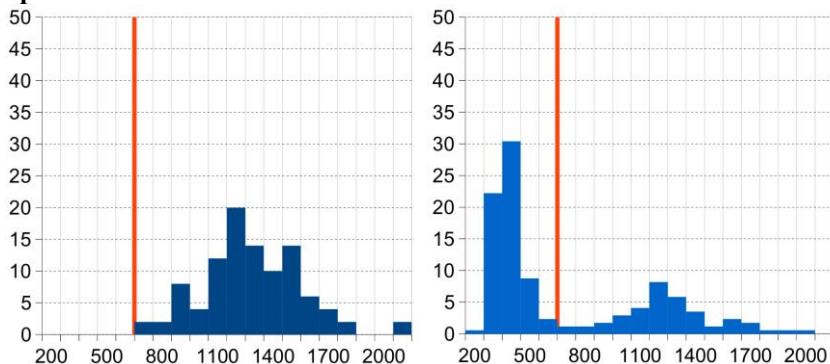
**Figure 10.** TEM images of different size particles. On the left side there are smaller particles (310 and 356 nm), which were heat inactivated at 65°C for 10 minutes. On the right side a single 1212 nm size particle is imaged. This sample was not heat treated. The scale bar is equal to 250 nm.

results. DLS measurement was recorded for the heat-treated sample. The average size of smaller particles (below 700 nm) was  $152 \pm 37$  nm, which included 93,5 % of all the particles. Particle above 700 nm limit had the average size of  $1669 \pm 645$  nm (6,5% of all the particles). The size difference between DLS and TEM measurements is likely to be caused by the uncertainty of DLS method. It is expected to be higher due to inhomogeneous samples. Likewise, the DLS measurement is done in liquid phase, where bigger particles can sediment faster than smaller particles.

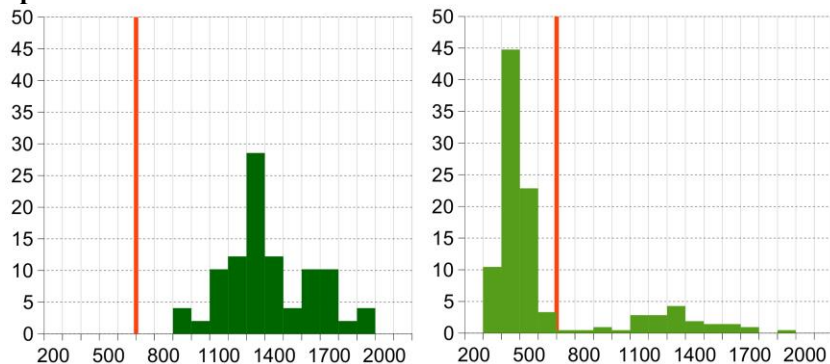
The results confirmed that smaller particles appear once heat treatment is applied, however it is unclear how these particles are formed. A possible explanation is that larger particles break up into smaller particles upon heating. Another possible explanation is that heat stimulates the speed of crystallization resulting in formation of smaller particle, which would have happened eventually without heating after a longer period.

An increase in total quantity of particles was also observed after particle purification step for the heat-treated sample. The total particle count was 1,4 – 3 times higher.

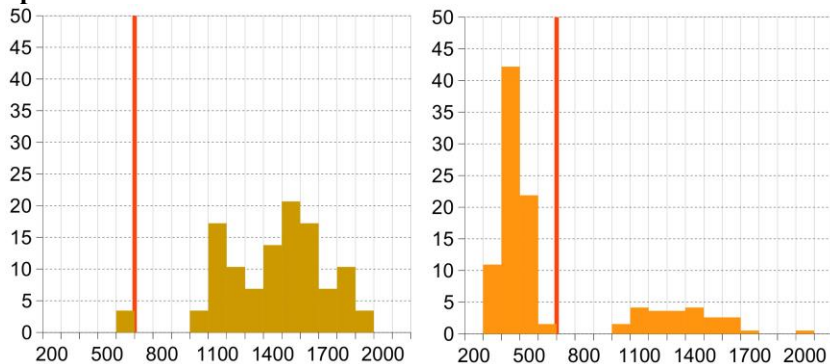
**Sample taken after 17 hours:**



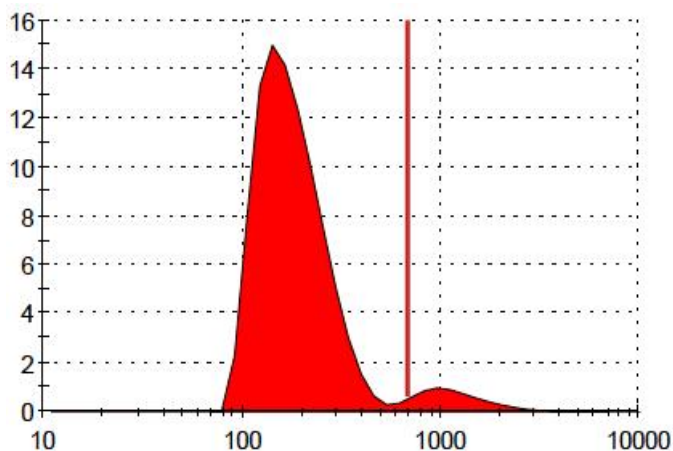
**Sample taken after 38 hours:**



**Sample taken after 66 hours:**



**Figure 11.** Particles size distributions after DNA amplification. Graphs shown on the left-hand side represent the particle size distribution of non-heat-treated samples and graphs on the right hand side – when emulsions were incubated at 65°C for 10 minutes. Size measurements were taken 17, 38 and 66 hours after the beginning of the DNA amplification reaction (shown in blue, green and orange colours, respectively). X-axes denote particle sizes in nanometres and y-axes show particle number in percentage. The red line in every graph marks the 700 nm point.



**Figure 12.** Particle size distribution after DNA amplification. The size distribution was measured using dynamic light scattering method. X-axis in the graph represents particle size in nanometres (scale is logarithmic) and y-axis shows particle fraction synthesized in percentage. The vertical red line marks 700 nm point.

#### *4. Best conditions for particle purification*

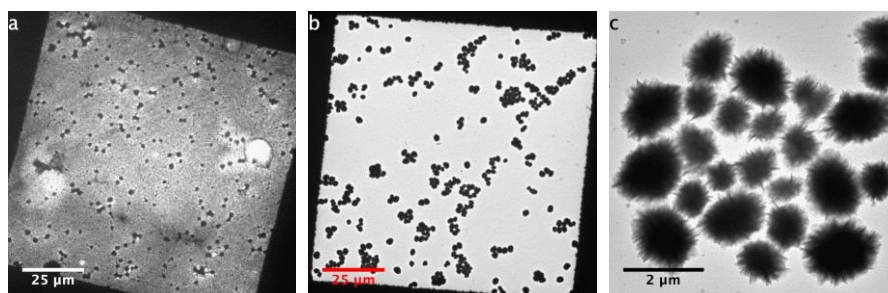
DNA amplification performed in droplet resulted in microparticles coated with DNA as well as free floating DNA molecules. Purification process is the next step to separate the coated microparticles from the free-floating DNA molecules to acquire good quality samples. For this purpose, we developed two separate methods: one of them uses electrophoresis in low melting point agarose while the other one uses DNA cleavage method with diluted restriction endonuclease and centrifugation.

The electrophoresis particle purification had a low yield and was hard to perform. On contrary, particle purification undertaken by the means of restriction endonuclease and centrifugation proved to be a better option. It showed higher yield and was easier to perform. This method was suggested and optimised by Greta Zubaitė (Zubaite, 2016).

The DNA cleavage method was the preferred method. The experimental procedure is described in this paragraph or in section 7. First, the emulsion after amplification is broken up, then microparticles are collected at the bottom of a tube by centrifugation at 10000 g for 10 minutes. Pellet is suspended in a smaller volume and DNA is cleaved for a short time by using diluted restriction endonuclease. Afterwards particles are washed three times

with water and collected by centrifugation. The endonuclease preferentially cleaves free floating DNA so that microparticles remain almost unaffected. Cleaved DNA is discarded during washing and centrifuging cycles.

DNA microparticle purification results were recorded with TEM. The image in (Figure 13, a) shows a matrix of free DNA and black dots are DNA coated particles inside this matrix. Upon purification the matrix is removed and only coated microparticles are visible on the TEM grid (Figure 13, b and c). Particle purification efficiency of up to 100 % was achieved.

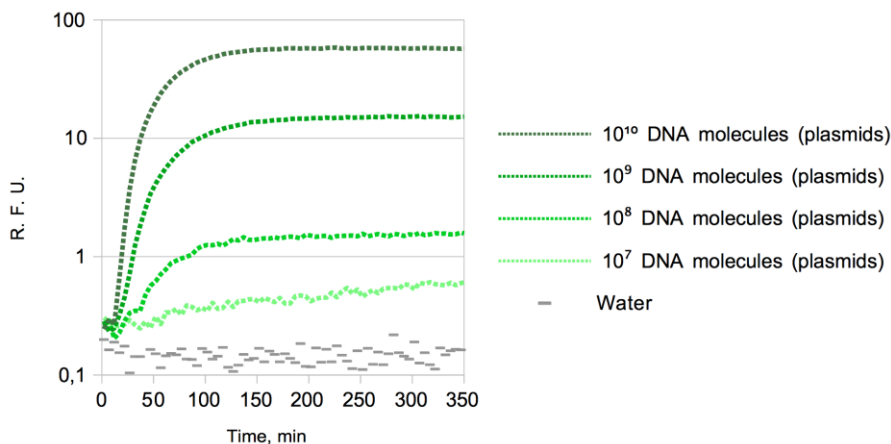


**Figure 13.** TEM images of DNA-magnesium-pyrophosphate particles. (a) shows the TEM image before particle purification. (b) shows the TEM image after particle purification using restriction endonuclease and centrifugation. TEM Image (c) displays a close-up of purified particles.

### 5. *In vitro* protein synthesis from particles

The magnesium-pyrophosphate particle coated with DNA can be used as a DNA carrier. One has yet to test if DNA on the particles can be used as a matrix in *in vitro* transcription and if DNA is accessible for proteins. To answer these questions, the particles were tested by synthesis eGFP and enzyme  $\beta$ -galactosidase (LacZ).

First a green fluorescent protein (eGFP) was used as a reporter. It was shown that the synthesized protein quantity is directly proportional to the number of DNA on the particles (Figure 14). At low DNA quantities it might be difficult to detect fluorescent signal of this protein. Therefore, another reporter system was also used, where reporter protein is an enzyme  $\beta$  galactosidase (LacZ). LacZ system is more effective when protein yields are low. Even low amounts of translated enzyme can generate enough fluorescent products. The downside is that this system might be less suitable to quantify DNA accessible for the proteins.

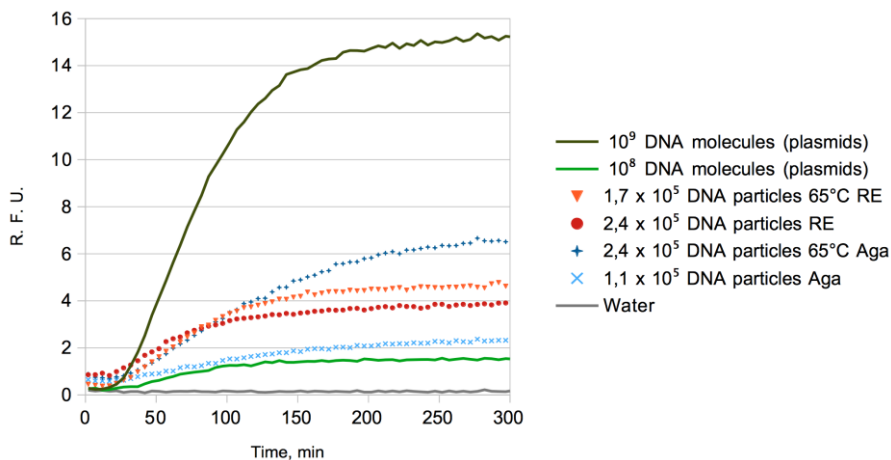


**Figure 14.** The calibration curves of eGFP protein synthesis. eGFP protein synthesis was done for various amounts of plasmid (from  $10^7$  to  $10^{10}$ ) as a matrix. The fluorescence of proteins is presented on a logarithmic scale.

### a. eGFP protein synthesis

Originally eGFP protein synthesis was carried out on a microtiter plate. For this synthesis DNA-magnesium-pyrophosphate particles, which were purified using two different methods, were tested as a matrix in NEB *in vitro* transcription and translation kit (Figure 15). Derived particle quantity was determined with hemocytometer. The fluorescent signal intensity obtained from the particles was compared to the fluorescent signal intensity from a known number of plasmids. Based on these numbers an approximate number of gene copies within DNA residing on the particles and accessible to proteins was determined. It was calculated that each particle should contain  $\sim 10^3 - 10^4$  gene copies. These calculations assume that the amount of synthesized protein is directly proportional to the number of DNA molecules present on the particles.

eGFP protein synthesis was carried out in droplets (Figure 16, a and c). For this experiment particles were prepared in two different ways. One set of particles was heat treated at  $65^\circ\text{C}$  for 10 minutes and purified from agarose (Figure 16, c and d). Another set was not heat treated and was purified using 10 times diluted XagI restriction endonuclease (Figure 16, a and b). There



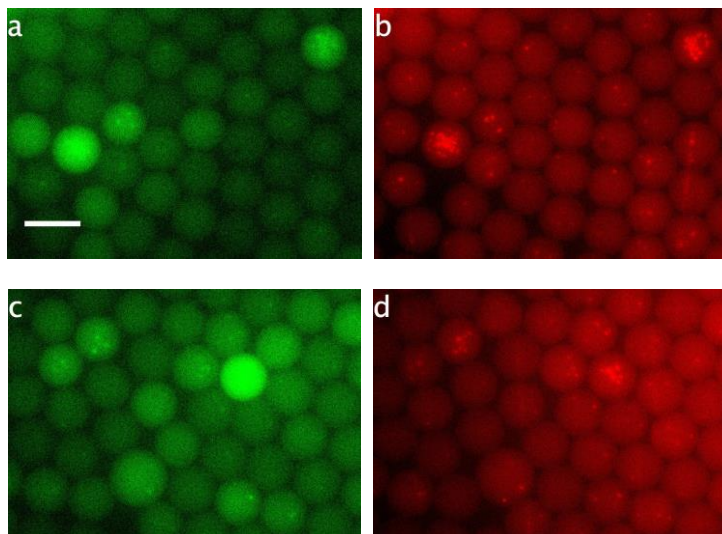
**Figure 15.** Fluorescence signal of eGFP protein synthesis, which was undertaken on a microtiter plate using microparticles. The eGFP protein synthesis was carried out for a known quantity of plasmid (“molecules”) and the acquired fluorescence signal was compared to the eGFP protein synthesis from particles purified using different methods. “65°C” stands for the synthesis with particles, which were heat treated at 65°C for 10 minutes. “RE” annotates the synthesis reaction for particles purified with restriction endonuclease and centrifugation. “Aga” means synthesis for particles, which were purified using low melting point agarose.

was no significant difference between the results. eGFP protein synthesis was undertaken with both types of particles. Most intense eGFP fluorescent signal was received for droplets containing multiple particles.

Many droplets contained particles, which can be seen in images (b and d, Figure 16), however, not all of the corresponding droplets in images (a and c, Figure 16) showed strong fluorescence of synthesized protein. Possible explanation is that nucleases degraded DNA when particles were kept at +4°C which led to a decreased quantity of DNA available on each particle. Keeping particles at -20°C can solve DNA degradation issue at the cost of increased agglomeration.

In *in vitro* protein evolution experiments a single droplet should contain DNA of only one mutant, i.e., a single droplet should contain only one particle. If one would like to carry out an *in vitro* evolution experiment with protein, where detection relies only on its fluorescence, one might need to increase an amount of the DNA per single particle. Yet another option is to

use different type of reporter system, which is more sensitive to lower DNA amounts.



**Figure 16.** Images of fluorescent droplets after eGFP protein synthesis using particles as a matrix. Protein synthesis was carried out using particles prepared in two different ways. The first set of particles was not heat treated for 65°C for 10 minutes and was purified using XagI restriction endonuclease (a and b) and the second set of particles was heat treated for 65°C for 10 minutes and was purified using low melting point agarose (c and d). Images (a) and (c) show eGFP fluorescence and (b) and (d) show particle fluorescence (stained with SYTO 84 dye). The scale bar is equal to 25  $\mu\text{m}$ .

### *b. LacZ protein synthesis*

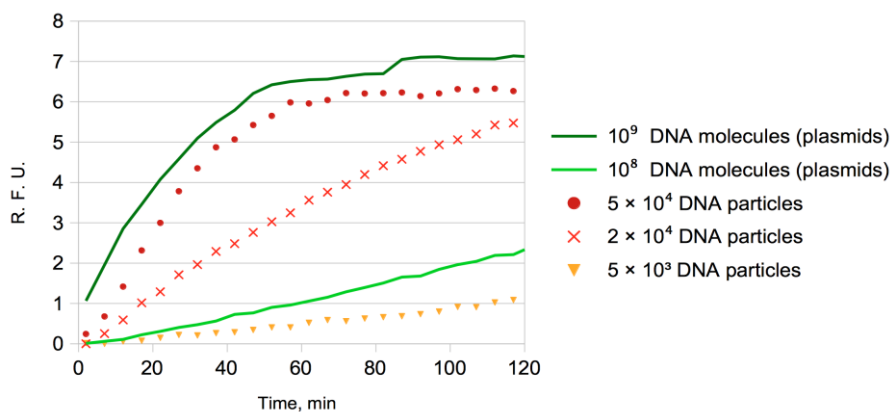
In addition to the eGFP synthesis DNA covered particles were also used for protein *in vitro* transcription and translation with another reporter system. This time the reporter is an enzyme  $\beta$ -galactosidase (LacZ). The eGFP system fluorescent signal is directly proportional to the synthesized amount of protein, while the enzyme-based-system fluorescent signal is less dependent on protein quantity. It rather correlates with reaction duration and added substrate quantity. Fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside (FDG) was used in LacZ system as a substrate, because  $\beta$ -galactosidase can hydrolyse it.

After DNA amplification phi29 DNA polymerase was heat inactivated by incubating emulsion at 65°C for 10 minutes. Restriction endonuclease was

used for cleaving and DNA-magnesium-pyrophosphate microparticles were then collected by centrifugation. Initial experiment was done on a microtiter plate. The results indicate that a single particle should contain  $\sim 10^4$  -  $10^5$  copies of genes (Figure 17).

LacZ was also synthesized in microfluidic droplets. Microparticles were prepared in the same way as for the microtiter plate experiment. Fluorescence images were recorded 1 hour as of start of protein synthesis experiment (Figure 18). 1 hour incubation period was limited by diffusion time of fluorescein from droplets (Courtois and others, 2009).

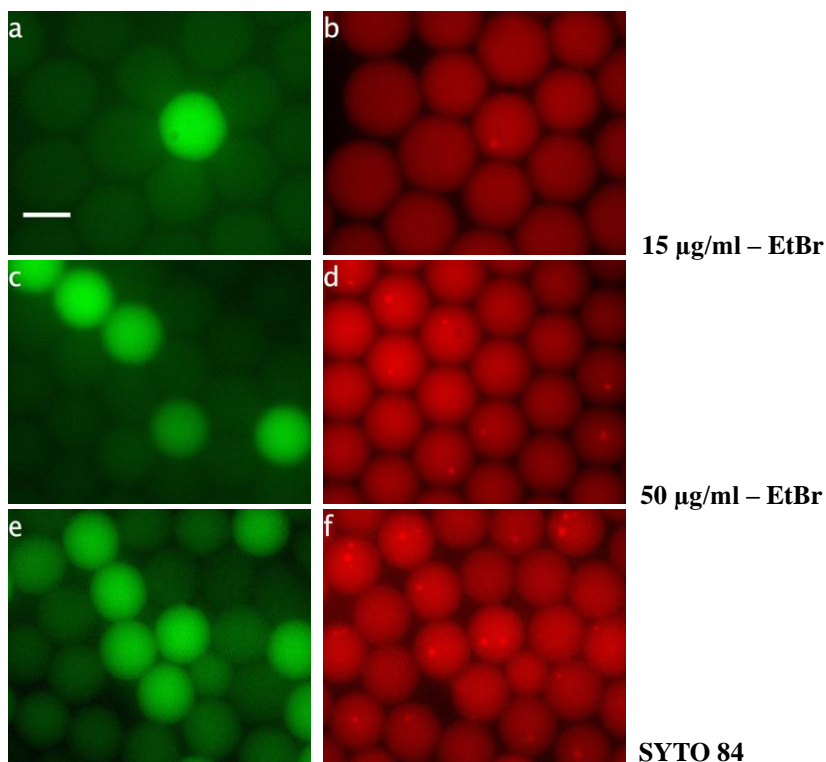
During initial *in vitro* transcription and translation experiments  $15 \mu\text{g/ml}$  of ethidium bromide (EtBr) was added to the reaction mixture. Under these conditions microparticles were seen (Figure 18, b) only in the droplets, where FDG was hydrolysed to fluorescein (Figure 18, a). Since particle fluorescence signal was very weak, EtBr concentration was increased to  $50 \mu\text{g/ml}$  (Figure 18, c and d). This time microparticles were better visible.



**Figure 17.** Results of LacZ protein synthesis, which was performed on a microtiter plate with plasmids and microparticles. *In vitro* synthesized LacZ was mixed with a buffer, which contained an FDG substrate. Particles, which were incubated at  $65^\circ\text{C}$  for 10 minutes and were purified using restriction endonuclease were being used in this experiment.

Droplets, that contain single or multiple particles were started to be seen, but the fluorescein signal was weak (Figure 18, compare fluorescent droplets in c with droplets with particles in d). First hypothesis was that high EtBr concentration might have negative effect on *in vitro* transcription and





**Figure 18.** Fluorescence images of LacZ protein synthesis in droplets from microparticles. Particles were incubated at 65°C for 10 minutes and were purified with restriction endonuclease. Images (a), (c) and (e) show fluorescence of fluorescein after FDG hydrolysis. Nucleic acids were stained with EtBr (b) and (d) or SYTO 84 – (f). The scale bar is equal to 25 µm.

translation (personal communication with ThermoFisher Scientific representative). LacZ synthesis in droplets was repeated with SYTO 84 instead (which was added after protein synthesis undertaken at 37°C for 1 hour). SYTO 84 is a nucleic acid specific fluorescent dye that got into droplets and stained DNA attached to the particle surface (Figure 18, e and f). The result was the same, i.e., some droplets contained single or multiple microparticles, but showed no fluorescein fluorescence. The key question is why not all droplets with particle inside of them show signal of successful LacZ protein synthesis. One possible explanation is a lack of time for protein synthesis. One hour might be too short to synthesise enough protein in every droplet. Another possible explanation is a variation of particle sizes. Particles of different sizes can populate varying amount of DNA that

subsequently determines the number of synthesized proteins – smaller particles carry less DNA. This argument also relates to the previous observation that the size distribution of microparticle is affected by heat. Typically, after an incubation at 65°C for 10 minutes particles sizes decreased – most (~80-70 %) of the particles were smaller than 700 nm.

### *Result overview*

All in all, reaction conditions for preparation of magnesium pyrophosphate microparticles covered with DNA were found. The preparation technique complements other published methods to make flower-like DNA particles. The method that has been developed during this work is also unique. One of the advantages of this approach is that synthesis can be started from supercoiled plasmid and there is no need to perform DNA ligation into a circle. Another advantage is that single particle is formed from single DNA molecule so that the microparticles can be used as carriers of one type of DNA for *in vitro* evolution experiments as well as for DNA sequencing. Moreover, it was learnt how to reduce DNA loss due to nonspecific adsorption on the surfaces in a very dilute solution (<10 pg/μl). The effect of heat treatment on particle size distribution was also investigated. Further work should be undertaken on improving purification, acquiring higher DNA quantities per particle as well as to investigate possible DNA degradation sources.

## Conclusions

- Nonionic surface active material poloxamer 407 can reduce DNA losses caused by unspecific molecule adsorption on surfaces, which is important when working with diluted DNA samples ( $\leq 10$  pM);
- Isothermal amplification of single DNA molecules leads to  $\sim 1$   $\mu\text{m}$  size rose petal resembling structure made of magnesium pyrophosphate and amplified DNA;
- Single DNA particle produced inside 4 pl droplet contains from  $10^3$  to  $10^5$  copies of amplified DNA;
- DNA particles can be separated from the reaction mixture while maintaining their compact structure and can be used as a substrate for *in vitro* transcription and translation reaction;
- The amount of eGFP protein synthesized from a single DNA particle is comparable to the protein amount obtained from  $\sim 10^3$ - $10^4$  copies of plasmid DNA.

## Summary about PhD student

### **PhD study subjects:**

- “Biostatistik / Biostatistics” (2 ECTS credits);
- “Embedded MEMS Lab” (5 ECTS credits);
- “Introductory Programming in MATLAB” (2 ECTS credits);
- “Quantitative Big Imaging: From Images to Statistics” (6 ECTS credits);
- “Molecular biology” (12 ECTS credits);
- “Mechanisms of protein and DNA interaction” (9 ECTS credits);

### **Received qualification:**

- Training on microfluidic chip production: from drawing a design to hand making the chip itself and using it;
- Training on production and characterisation of microelectromechanical systems;

### **Working experience:**

- Experience in image analysis by using manual and automatic approaches;
- Experience on using microfluidics to solve scientific problems;

### **Internships:**

- 3 months internship at ESPCI ParisTech (France) in Biochemistry and microfluidics laboratory (2012-11-14 – 2013-02-13);
- 18 months internship at ETH Zürich (Switzerland) in Protein evolution laboratory (2013-10-01 – 2015-03-31).

## PADEKA

Esu dėkingas savo darbo vadovui dr. Linui Mažučiui už suteiktą galimybę atlikti darbą jo vadovaujamoje laboratorijoje, už palaikymą ir skatinimą dirbti garsiose užsienio laboratorijose bei nepailstamą ryžtą redaguoti ruošiamas ataskaitas, straipsnius ir šią disertaciją.

Ypač dėkoju prof. dr. Donald Hilvert (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Organinės chemijos laboratorija, Ciurichas, Šveicarija) už galimybę dirbti jo grupėje, už išvalgas ir patarimus bei visokeriopą palaikymą. Taip pat prof. dr. Peter Kast už klausimus, išvalgas ir patarimus planuojant eksperimentus. Esu dėkingas ir kitiems Organinės chemijos laboratorijos grupės nariams: dr. Richard Obexer už nepaliaujamas idėjas, išvalgas ir pagalbą, dr. Sabine Studer už plazmidę pET-29b(+)\_EGFP ir pagalbą pradėdant darbus naujoje vietoje, dr. Eita Sasaki už TEM nuotraukas, René Fischer ir Leyla Hernandez už šiltą bendravimą ir nuolatinį dalinimąsi savo darbo vieta ir įranga.

Dėkoju prof. dr. Petra Dittrich (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Bioanalizės laboratorija, Ciurichas, Šveicarija) už galimybę naudotis fluorescenciniu mikroskopu ir jos grupės nariui dr. Felix Kurth už pagalbą, patarimus bei diskusijas.

Taip pat dėkoju prof. dr. Andrew Griffiths (École supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris, Biochemijos laboratorija, Paryžius, Prancūzija) už galimybę dirbti jo grupėje. Taip pat dr. Marcel Reichen už pagalbą ir praktinius mokymus, gilinant žinias mikroskopsčių srityje ir dr. I Putu Mahendra Wijaya už supažindinimą su FPGA moduliu ir mokymus dirbti su LabView programine įranga.

Dėkoju kitiems Mikrotechnologijų sektorius nariams: Gretai Zubaitei, Karoliui Simučiu, Gretai Stonytei, Justinai Rutkauskaitei, Valdemarui Milkui ir dr. Remigijui Vasiliauskui.

Šių darbų vykdymui gauta finansinė parama:

- Prancūzijos ambasados stipendija, suteikusi galimybę mokytis dirbti su mikroskopsčiais ir galimybę pasigaminti mikroskopsčių gardelių liejimo formas bei pačias gardeles;

- Šveicarijos valstybės Sciex-NMS<sup>ch</sup> stipendija, Nr. 13.014, leidusi stažuotis ETH Ciuriche, kur buvo padaryta didžioji dalis darbų;
- Lietuvos-Šveicarijos bendradarbiavimo programai, projekto numeris CH-3-SMM-01/03, finansavusiai kitas projekto veiklas.

Robertas,  
Vilnius, 2021

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS

### **Publikacijos paskelbtos moksliniuose žurnaluose:**

**Galinis R**, Stonyte G, Kiseliovas V, Zilionis R, Studer S, Hilvert D, Janulaitis A, Mazutis L. DNA Nanoparticles for Improved Protein Synthesis *In Vitro*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Feb;55(9):3120-3. doi: 10.1002/anie.201511809. Epub 2016 Jan 28.

Zubaite G, Simutis K, **Galinis R**, Milkus V, Kiseliovas V, Mazutis L. Droplet microfluidics approach for single-DNA molecule amplification and condensation into DNA-magnesium-pyrophosphate nanoparticles. *Micromachines*. 2017 Feb; 8(2), 62;. doi: 10.3390/mi8020062.

### **Pranešimai tarptautinėse konferencijose:**

**Galinis R**. Microfluidics for directed protein evolution. VitaScientia 2014 - konferencija. Vilnius, Lietuva. 2014 01 03. Žodinis pranešimas.

**Galinis R**. Microfluidics for Protein Evolution: Preparatory Issues. COINS – konferencija. 2014 03 03 - 08. Žodinis pranešimas.

**Galinis R**, Hilvert D ir Mazutis L. DNA amplification in microfluidic droplets using phi29 DNA polymerase. EMBL Conference Series Microfluidics 2014. 2014 07 23 – 25. Stendinis pranešimas.

### **Patentinė paraiška:**

Mazutis L, Stonyte G, Kiseliovas V, Zilionis R, Janulaitis A, **Galinis R**, Studer S, Hilvert D, inventor. System and method for synthesis of DNA particles and use thereof. Patent application PCT/IB2017/050124 WO2017122128A2. 2016 01 11

### **Kiti pristatymai ir konferencijos:**

**Galinis R**, Akartuna I, Klein A ir Mazutis L. Microfluidics based assay for single cell gene expression monitoring. EMBO praktinis kursas “Vienos ląstelės genų ekspresijos analizė”. Heidelberg, Vokietija. 2013 06 29 – 07 05. Stendinis pranešimas.

Microdroplets in action symposium 2013. Cambridge, Jungtinė Karalystė. 2013 07 26.

1

# DNA Nanoparticles for Improved Protein Synthesis In Vitro

**Galiniš R, Stonyte G, Kiseliovas V, Zilionis R, Studer S, Hilvert D, Janulaitis A, Mazutis L.**

Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Feb 24;55(9):3120-3. doi:  
10.1002/anie.201511809



## DNA Nanoparticles for Improved Protein Synthesis In Vitro

Robertas Galinis<sup>†</sup>, Greta Stonyte<sup>†</sup>, Vaidotas Kiseliovas, Rapolas Zilionis, Sabine Studer, Donald Hilvert, Arvydas Janulaitis, and Linas Mazutis\*

**Abstract:** The amplification and digital quantification of single DNA molecules are important in biomedicine and diagnostics. Beyond quantifying DNA molecules in a sample, the ability to express proteins from the amplified DNA would open even broader applications in synthetic biology, directed evolution, and proteomics. Herein, a microfluidic approach is reported for the production of condensed DNA nanoparticles that can serve as efficient templates for in vitro protein synthesis. Using phi29 DNA polymerase and a multiple displacement amplification reaction, single DNA molecules were converted into DNA nanoparticles containing up to about 10<sup>4</sup> clonal gene copies of the starting template. DNA nanoparticle formation was triggered by accumulation of inorganic pyrophosphate (produced during DNA synthesis) and magnesium ions from the buffer. Transcription–translation reactions performed in vitro showed that individual DNA nanoparticles can serve as efficient templates for protein synthesis in vitro.

Compartmentalization and amplification of single DNA molecules inside nano- or picoliter-sized wells<sup>[1]</sup> and droplets<sup>[2]</sup> has opened up new opportunities for biomedical and biological sciences. The discrete nature of compartments enables digital quantification of absolute numbers of nucleic acids in a sample,<sup>[3]</sup> accurate estimation of copy-number variation,<sup>[4]</sup> detection of pathogens<sup>[5]</sup> and rare cancer mutations,<sup>[6]</sup> as well as other applications.<sup>[7]</sup>

The most common method of amplifying DNA in a sample involves the polymerase chain reaction (PCR). However, for droplet microfluidics experiments, the large temperature gradient required for PCR is a major drawback that can cause droplet coalescence and loss of compartmentalization. In addition, amplification of long (> 1 kb) templates is often inefficient, leading to decreased reaction yields. In contrast, DNA amplification under isothermal reaction conditions has been shown to generate large amounts of

material from a single-copy DNA template,<sup>[8]</sup> circumventing potential problems associated with emulsion stability. Moreover, the ability to amplify DNA and then express proteins from the clonally amplified template would greatly increase the scope of potential applications. For example, synthetic biology, directed evolution, and large-scale proteomics screens would benefit from techniques that do not rely on protein expression in living systems.

A major challenge for in vitro expression of proteins is the relatively large amounts of DNA template needed—on the order of 500 ng DNA ( $\approx 10^9$  gene copies) per 50  $\mu$ L reaction<sup>[9]</sup>—since protein synthesis from a single DNA copy is rather inefficient. An alternative approach is to compartmentalize single DNA molecules in droplets and perform clonal amplification followed by the in vitro transcription–translation (IVTT) step.<sup>[10]</sup> However, the need for sophisticated microfluidic chips to perform complex droplet manipulations on-chip restricts broader use and further applications.

Herein we report a new approach for in vitro synthesis of proteins using condensed DNA nanoparticles comprising up to about 10<sup>4</sup> copies of the clonally amplified DNA template. We employed a droplet microfluidics approach to convert single DNA molecules into DNA nanoparticles by a multiple displacement amplification (MDA) reaction driven by the bacteriophage phi29 DNA polymerase. Intriguingly, we found that inorganic pyrophosphate (produced during isothermal DNA synthesis) and magnesium ions are a prerequisite for DNA condensation into the crystalline-like globular structures. This process was enhanced when the DNA amplification reaction was performed inside droplets, which we attribute to the confined volumes and spatial accumulation of the reaction products. To demonstrate the biological functionality of the DNA nanoparticles, we used them in IVTT reactions and observed improved protein expression yields relative to standard assay conditions.

We first encapsulated pUC19 plasmid DNA in monodisperse 3 pL droplets together with phi29 DNA polymerase, exo-resistant random DNA primers, pyrophosphatase, and other reaction components (see the Supporting Information, Materials and Methods section) necessary for DNA synthesis by an MDA mechanism.<sup>[8]</sup> The plasmid concentration was adjusted so that one droplet contained one DNA molecule on average ( $\lambda = 1.0$ ). The microfluidics device used for encapsulation (Figure 1) was operated at a frequency of 4.6 kHz, allowing collection of 10<sup>6</sup> droplets in less than an hour.<sup>[10]</sup> The collected emulsion was incubated at 30 °C for 15 h to allow the isothermal DNA amplification reaction to occur and was then stained with the cyanine dye SYBR Green I, which becomes fluorescent upon binding double-stranded DNA (dsDNA; Figure 1c).

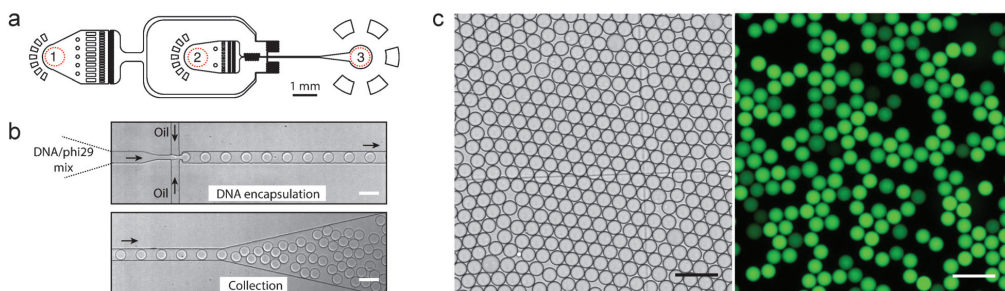
[\*] R. Galinis,<sup>[†]</sup> G. Stonyte,<sup>[†]</sup> V. Kiseliovas, R. Zilionis, Prof. A. Janulaitis, Dr. L. Mazutis  
Institute of Biotechnology Vilnius University  
8 Graiciuno street, 02241 Vilnius (Lithuania)  
E-mail: linas.mazutis@bti.vu.lt

S. Studer, Prof. D. Hilvert  
Laboratory of Organic Chemistry, ETH Zurich  
Vladimir-Prelog-Weg 1–5, 8093 Zurich (Switzerland)

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201511809>.

© 2016 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

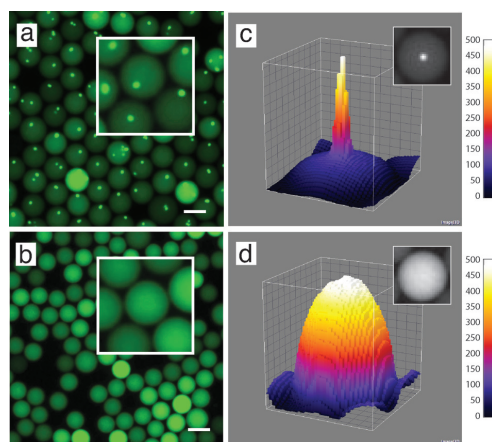


**Figure 1.** Design and operation of the microfluidics device. a) The microfluidics device, showing 1) the inlet for the continuous phase, 2) the inlet for the MDA reaction mix, and 3) the droplet collection outlet. b) Still images of droplet production and collection. c) Bright field and fluorescence images of an emulsion after an MDA reaction. Droplets containing amplified DNA exhibit green fluorescence, whereas droplets lacking a template are dark. Scale bars in (b) and (c) = 50  $\mu\text{m}$ .

The Poisson equation predicts that random partitioning of 0.57 pM DNA template into 3 pL droplets ( $\lambda = 1.0$ ) will afford a population of 37% empty and 63% occupied droplets, with about 37% of the droplets containing one DNA molecule and about 26% containing two or more. Digital fluorescence analysis of the emulsion revealed that about 58% of the droplets were fluorescent after isothermal amplification. Additionally, serial dilutions of the DNA sample confirmed that droplet occupancy followed a Poisson distribution (see Figure S1 in the Supporting Information). The small differences in occupancy between the experimental results and theoretical predictions can be attributed to abortive amplification of damaged DNA plasmids, losses caused by non-specific adsorption in the system, or pipetting errors. As expected, negative controls having no DNA template afforded few fluorescent droplets (about 0.4%), corresponding to about 2.0 fM ambient DNA.

Fluorescence imaging of an emulsion after the MDA reaction revealed a mean fluorescence intensity of  $440 \pm 88$  RFU (RFU = relative fluorescence units) for occupied droplets, which translates to  $110 \pm 30$  ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA, or about a  $10^5$ -fold amplification of the starting template (Figure S2). Previous reports found a similar degree of amplification when phi29 reactions were performed in bulk<sup>[8]</sup> and in droplets.<sup>[10]</sup>

Unexpectedly, during the course of DNA amplification, we noticed that excluding pyrophosphatase (PPase) from the reaction mix leads to the formation of highly fluorescent nanoparticles inside the droplets (Figure 2a). PPase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of inorganic pyrophosphate into two orthophosphate molecules<sup>[11]</sup> and is used to increase the amplification yields of nucleic acids.<sup>[8]</sup> To confirm that inorganic pyrophosphate is indeed a prerequisite for formation of condensed DNA nanoparticles, we encapsulated pUC19 DNA (0.23  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda = 4 \times 10^5$ ) dissolved in 8 mM Tris-HCl buffer (8 mM; pH 7.6) containing sodium pyrophosphate (4 mM) and  $\text{MgCl}_2$  (10 mM), while excluding other components such as the phi29 enzyme, primers, and deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) from the reaction mix. As expected, we observed formation of fluorescent precipitants in the droplets (Figure S3), confirming that inorganic pyrophos-

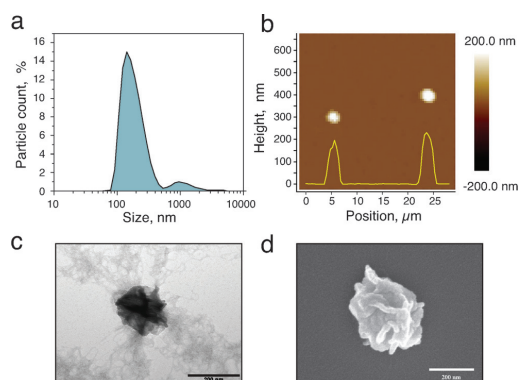


**Figure 2.** DNA nanoparticle generation. a) DNA nanoparticle formation induced by inorganic pyrophosphate and magnesium ions during a phi29-catalyzed DNA polymerization reaction in the absence of the PPase enzyme. For visualization purposes, the initial DNA template concentration was set at  $\lambda \approx 1.0$ , and as a result, a small fraction of droplets appears with two or more DNA particles. b) The same reaction as in (a), but in the presence of the PPase enzyme. Insets in (a) and (b): magnified views of the emulsions; the DNA nanoparticles are evident as localized and intensely fluorescent objects within the droplets. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ . The composition of reaction mixtures is described in the Material and Methods section in the Supporting Information. c) A 3D fluorescence intensity profile of a single droplet containing a single DNA nanoparticle. d) A 3D fluorescence intensity profile of a droplet with  $\approx 10^5$  copies of a DNA template. Color bars indicate an approximate DNA copy number per single pixel (0.66  $\mu\text{m}$  size).

phate and magnesium ions are major triggers for the formation of DNA nanoparticles. In agreement with our observations, others have recently reported the formation of DNA/RNA:pyrophosphate:Mg complexes under PCR/RCA conditions (RCA = rolling-circle amplification).<sup>[12]</sup> Taken together, our findings and the literature data allow us to conclude that inorganic pyrophosphate, produced during the

phi29-driven DNA amplification reaction, associates with magnesium ions and promotes condensation of newly synthesized DNA in the particle.

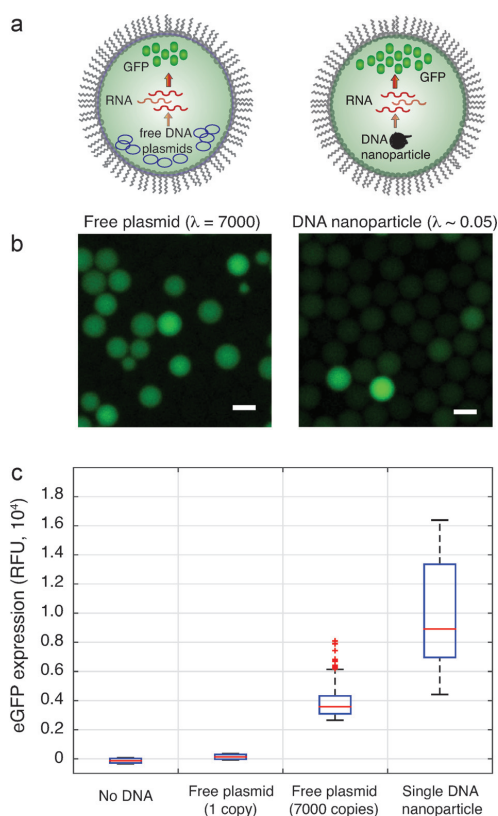
Electrophoretic analysis confirmed that DNA amplification, with or without PPase, was specific (Figure S4). We used digital image analysis to quantify the number of DNA copies and found that single DNA nanoparticles contained about 6000 copies of the original template (Figure 2c; Note S1 in the Supporting Information). To gain further insight into the structural features of the DNA material produced during isothermal amplification, we broke the droplets and analyzed the released material by transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and dynamic light scattering (DLS). The DLS measurements confirmed the presence of particles with a diameter of  $152 \pm 37$  nm (Figure 3a), in good agreement



**Figure 3.** DNA nanoparticle characterization. a) DLS measurements, showing that 93.5% of the particles have diameters of  $152 \pm 37$  nm. b) AFM measurements on two representative DNA nanoparticles. The size of the DNA nanoparticles was estimated to be approximately 200 nm (yellow trace overlaid on the AFM image). c) TEM and d) SEM images of single DNA nanoparticles. Scale bars in (c) and (d) = 200 nm.

with the AFM measurements (Figure 3b). The TEM and SEM analysis revealed individual, densely packed nanoparticles of uniform size and a petal-like surface structure (Figure 3c and 3d). Similar crystalline-like, globular microstructures were recently generated from short, circular DNA<sup>[13]</sup> and RNA<sup>[14]</sup> templates. Nevertheless, despite detailed microscopic characterization of these DNA/RNA microstructures, the importance of pyrophosphate:magnesium complexes for the nucleation and condensation process remained unappreciated. Performing the MDA reaction in bulk at different template concentrations (0.1–100  $\mu$ M) led to the formation of DNA aggregates, albeit without clearly defined structures (Figure S5).

To test whether individual DNA nanoparticles (DNA-NPs) could serve as templates for gene expression, we performed IVTT reactions (Figure 4). To monitor protein production, we used a pET29b(+) expression plasmid encod-



**Figure 4.** IVTT reactions to produce eGFP. a) Schematic of an IVTT reaction carried out in droplets. b) Fluorescence images of an IVTT emulsion prepared with free DNA plasmid at  $\lambda \approx 7000$  (left) and DNA nanoparticles at  $\lambda \approx 0.05$  (right). For visualization purposes, droplets containing plasmids were mixed with droplets lacking DNA (left panel). Droplets without DNA showed no fluorescence and appear as dark droplets interspersed among bright droplets. Scale bars = 20  $\mu$ m. c) The median yield of eGFP expression. The results are displayed as a box-plot, with median values indicated as red lines. The differences detected for eGFP expression in droplets containing free plasmid (7000 copies of the template) and a single DNA nanoparticle (carrying about 6000 copies of the template) were statistically significant ( $P = 3.2 \times 10^{-3}$ ) as judged by the Student's *t*-test.

ing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the T7 promoter. DNA-NPs were first prepared from this plasmid encapsulated in droplets and were then purified by preparative agarose gel electrophoresis and centrifugation. The purified material largely retained its densely packed structure, judging from TEM images of purified particles (Figure S6). Additionally, electrophoretic analysis of the sample confirmed highly specific amplification of the original template (Figure S7).

To evaluate the in vitro biological functionality of the synthesized material we added purified DNA-NPs to the IVTT mix and created 5  $\mu$ L droplets using the same microfluidics device shown in Figure 1. We used diluted suspensions

of DNA-NPs ( $\lambda = 0.05$ ) to ensure that each droplet contains no more than a single DNA nanoparticle. The collected emulsion was incubated at 37 °C for 3 h to allow *in vitro* gene expression to occur. Fluorescence analysis confirmed that droplets containing single DNA-NPs expressed high levels of the eGFP, as evidenced by the appearance of highly fluorescent droplets (Figure 4b; Figure S8). Considering that a single DNA-NP carries approximately 6000 copies of an initial template (Note S1 in the Supporting Information), we compared eGFP yields for droplets containing similar amounts of free plasmid (7000 copies) to droplets containing a single DNA-NP and found that the latter gave about 2.5-times higher eGFP expression (Figure 4c). Traces of free DNA molecules that co-purified with the DNA-NPs showed negligible levels of eGFP expression (background droplets in the right panel of Figure 4b). Importantly, although the protein levels produced using a single DNA nanoparticle as a template were broadly distributed (coefficient of variation,  $CV = 0.33$ ), the overall yield of *in vitro* expressed protein was much higher than could be obtained from a single DNA plasmid (Figure 4c). These results indicate that a DNA nanoparticle produced from a single-copy template contains a sufficiently large number of functional gene copies to afford high yields of protein.

Condensed DNA structures, in the form of hydrogels, have similarly been shown to increase RNA and protein yields *in vitro*.<sup>[15]</sup> Taking advantage of the densely packed DNA structure, conventional DNA purification techniques can be used to separate DNA-NPs from the original reaction components (salts, enzymes). Such an option will be important for performing sequential multi-step reactions<sup>[16]</sup> that are inhibited or incompatible with standard biochemical conditions. As exemplified previous work,<sup>[10]</sup> the DNA amplification mix may inhibit the subsequent protein synthesis step because of differences in salt concentration, pH values, and other components. Nonetheless, purified DNA-NPs not only retain their compact structure but also, by virtue of the large number of clonal gene copies, significantly increase the yield of protein produced *in vitro*.

The importance of *in vitro* protein synthesis is easy to appreciate in the context of directed evolution, proteomics, synthetic biology, or various types of screening assays that rely on cell-free systems. In addition, DNA nanoparticles can be combined with hydrophobic materials to exploit numerous drug-delivery applications.<sup>[17]</sup> Consequently, this type of biomaterial may offer attractive possibilities for a range of biochemical and biomedical applications.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Eita Sasaki for support with TEM imaging, Algirdas Selskis for assistance with SEM, and Lina Mikoliunaite for help with AFM imaging. R.G. holds a Sciex-NMS fellowship. This work was supported by a Lithuanian-Swiss Research and Development cooperation program (grant no. CH-3-SMM-01/03).

**Keywords:** DNA · microfluidics · nanoparticles · protein expression · pyrophosphate

**How to cite:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3120–3123  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 3172–3175

- [1] E. A. Ottesen, J. W. Hong, S. R. Quake, J. R. Leadbetter, *Science* **2006**, *314*, 1464–1467.
- [2] N. R. Beer, B. J. Hindson, E. K. Wheeler, S. B. Hall, K. A. Rose, I. M. Kennedy, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8471–8475.
- [3] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9236–9241.
- [4] K. A. Heyries, C. Tropini, M. VanInsberghe, C. Doolin, O. I. Petriv, A. Singhal, K. Leung, C. B. Hughesman, C. L. Hansen, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 649–U664.
- [5] A. S. Devonshire, I. Honeyborne, A. Gutteridge, A. S. Whale, G. Nixon, P. Wilson, G. Jones, T. D. McHugh, C. A. Foy, J. F. Huggett, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3706–3713.
- [6] D. Pekin, Y. Skhiri, J. C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C. Ben Salem, F. Millot, A. El Harrak, J. B. Hutchison, J. W. Larson, D. R. Link, P. Laurent-Puig, A. D. Griffiths, V. Taly, *Lab Chip* **2011**, *11*, 2156–2166.
- [7] F. Bizouarn, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1160*, 27–41.
- [8] F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken, *Genome Res.* **2001**, *11*, 1095–1099.
- [9] a) Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751–755; b) H. Asahara, S. Chong, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e141; c) S. A. Lesley, M. A. Brow, R. R. Burgess, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2632–2638.
- [10] L. Mazutis, A. F. Araghi, O. J. Miller, J. C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B. J. Miller, J. B. Hutchison, D. Link, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4813–4821.
- [11] J. W. Sperow, O. A. Moe, J. W. Ridlington, L. G. Butler, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2062–2065.
- [12] a) V. N. Danilevich, V. V. Artemov, S. S. Smith, R. V. Gainutdinov, A. L. Mulyukin, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2014**, *32*, 1979–1992; b) V. N. Danilevich, A. V. Machulin, A. V. Lipkin, T. V. Kulakovskaya, S. S. Smith, A. L. Mulyukin, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2015**, *33*, 1–15; c) K. E. Shopsowitz, Y. H. Roh, Z. J. Deng, S. W. Morton, P. T. Hammond, *Small* **2014**, *10*, 1623–1633.
- [13] a) G. Z. Zhu, R. Hu, Z. L. Zhao, Z. Chen, X. B. Zhang, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16438–16445; b) R. Hu, X. B. Zhang, Z. L. Zhao, G. Z. Zhu, T. Chen, T. Fu, W. H. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5821–5826; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5931–5936.
- [14] J. B. Lee, J. Hong, D. K. Bonner, Z. Poon, P. T. Hammond, *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 316–322.
- [15] N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. Xu, D. Luo, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 432–437.
- [16] a) L. Mazutis, J. C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A. F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2902–2908; b) M. Ryckelynck, S. Baudrey, C. Rick, A. Marin, F. Coldren, E. Westhof, A. D. Griffiths, *RNA* **2015**, *21*, 458–469.
- [17] a) K. Ding, F. E. Alemdaroglu, M. Borsch, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1172–1175; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1191–1194; b) F. E. Alemdaroglu, J. Wang, M. Borsch, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 974–976; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 988–991.

Received: December 21, 2015

Published online: January 28, 2016

2

## Droplet Microfluidics Approach for Single-DNA Molecule Amplification and Condensation into DNA-Magnesium-Pyrophosphate Particles

**Zubaite G, Simutis K, Galinis R, Milkus V, Kiseliovas V, Mazutis L.**

Micromachines. 2017;8(2):62. doi:10.3390/mi8020062





Article

# Droplet Microfluidics Approach for Single-DNA Molecule Amplification and Condensation into DNA-Magnesium-Pyrophosphate Particles

Greta Zubaite <sup>†</sup>, Karolis Simutis <sup>†</sup>, Robertas Galinis, Valdemaras Milkus, Vaidotas Kiseliovas and Linas Mazutis <sup>\*</sup>

Institute of Biotechnology, Vilnius University, Saulėtekio Avenue 7, LT-02571 Vilnius, Lithuania; greta.zubaite@gmail.com (G.Z.); karolis.simutis@gmail.com (K.S.); robertas.galinis@bti.vu.lt (R.G.); valdemaras.milkus@gmail.com (V.M.); vaidotas.kiseliovas@bti.vu.lt (V.K.)

<sup>\*</sup> Correspondence: linas.mazutis@bti.vu.lt; Tel.: +370-5-223-4356

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Andrew J. deMello

Received: 7 December 2016; Accepted: 14 February 2017; Published: 20 February 2017

**Abstract:** Protein expression in vitro has broad applications in directed evolution, synthetic biology, proteomics and drug screening. However, most of the in vitro expression systems rely on relatively high DNA template concentrations to obtain sufficient amounts of proteins, making it harder to perform in vitro screens on gene libraries. Here, we report a technique for the generation of condensed DNA particles that can serve as efficient templates for in vitro gene expression. We apply droplet microfluidics to encapsulate single-DNA molecules in 3-picoliter (pL) volume droplets and convert them into 1  $\mu\text{m}$ -sized DNA particles by the multiple displacement amplification reaction driven by phi29 DNA polymerase. In the presence of magnesium ions and inorganic pyrophosphate, the amplified DNA condensed into the crystalline-like particles, making it possible to purify them from the reaction mix by simple centrifugation. Using purified DNA particles, we performed an in vitro transcription-translation reaction and successfully expressed complex enzyme  $\beta$ -galactosidase in droplets and in the 384-well format. The yield of protein obtained from DNA particles was significantly higher than from the corresponding amount of free DNA templates, thus opening new possibilities for high throughput screening applications.

**Keywords:** in vitro expression; DNA condensation; droplet microfluidics; phi29 DNA polymerase

## 1. Introduction

Droplet microfluidics offers a powerful tool to isolate, amplify and quantify nucleic acid molecules in a massively parallel manner [1,2]. For biological assays in particular, the droplet format provides not only significant savings for the cost of the reagents, but also increased analytical sensitivity and ultra-high throughput capabilities [3,4]. These features have led to a growing number of applications of droplet microfluidics technology for DNA amplification and detection [5–7], library preparation [8,9], in vivo directed evolution [10–12], single-cell assays [13–15] and others [16–18]. Droplet-based approaches also have shown promising results for screening protein crystallization conditions [19] and for studying nucleation events during amyloid aggregation [20]. Compartmentalization of reagents into microscopic droplets can shift reaction equilibrium towards product formation and as a result improve the efficacy of chemical reactions [21]. As was shown recently, in the case of the DNA isothermal amplification reaction, the compartmentalization enhances amplified nucleic acid condensation into crystalline-like structures [22]. It was shown that during the multiple displacement amplification (MDA) reaction, the magnesium ions from the buffer and DNA replication reaction byproduct inorganic

pyrophosphate trigger amplified DNA condensation into DNA-magnesium-inorganic pyrophosphate (DNA-Mg-PP<sub>i</sub>) particles. These particles can be purified from the reaction mix preserving their compact structure and serve as a template for an improved protein synthesis *in vitro* [21]. However, the conditions that affect DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particle's size have not been fully understood. Moreover, the purification of DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles from the MDA reaction mix using preparative agarose gel electrophoresis followed by centrifugation has led to significant losses of starting material, which could limit broader applications.

Herein, we extend our previous studies and report generation of ~1300 nm-sized DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles that retain significantly higher amounts of clonally-amplified DNA and afford the *in vitro* expression of multi-subunit enzymes, such as β-galactosidase. We describe an improved approach for performing single DNA molecule amplification and condensation into micrometer-sized particles and their use for protein synthesis *in vitro*. The purification procedure described here recovers ~60%–90% of DNA particles in comparison to ~0.5%–1.0% from the previous work [21]. The purified particles can be re-encapsulated and serve as a template for the *in vitro* transcription-translation (IVTT) reaction in microdroplets. In addition, we found that the heat-inactivation step, which is typically used to stop the MDA reaction, actually breaks DNA particles into smaller, ~200 nm-sized globular structures. Finally, we measured the catalytic activity of *in vitro* synthesized protein in a 384-well plate and found that the IVTT reaction supplemented with  $\sim 5 \times 10^4$  DNA particles produces similar yields of functional enzyme, as many as  $\sim 10^9$ – $10^{10}$  molecules of native DNA template.

The approach reported here, in principle, could be adapted to a variety of proteins or enzymes when their *in vivo* expression is inefficient or incompatible with living functions. It is important to emphasize that single DNA molecule isolation, amplification and condensation into particles inside droplets prevents the newly-synthesized DNA from forming catenated structures with DNA particles from other droplets, which is an important consideration when preparing clonally-amplified gene libraries. Since purified DNA particles retain sufficiently large numbers of functional gene copies ( $\sim 10^5$  copies per particle), it leads to a considerable improvement of the IVTT reaction of complex proteins. The reported technique should benefit biological applications relying on completely *in vitro* assays, such as directed evolution or drug and enzyme screening.

We postulate that the formation of crystalline-like DNA-Mg-PP<sub>i</sub> structures inside droplets is defined by the phase transition from a dissolved (disordered) state into an ordered state [23]. For the nucleic acids, such a transition is typically enhanced in the presence of positively-charged agents (cations, polymers or electrostatic surfaces) that neutralize the negative charge of the phosphodiester bond and facilitate DNA condensation [24]. Interestingly, in the case of the DNA amplification reaction by DNA polymerase, the DNA incorporation into crystalline-like particles occurs during the accumulation of a reaction byproduct, inorganic pyrophosphate (PP<sub>i</sub>), which is negatively charged [22]. It is well known that in the presence of magnesium ions, the PP<sub>i</sub> precipitates into insoluble and heat-resistant Mg<sub>2</sub>(PP<sub>i</sub>) spherulitic particles [25–27]. In our case, the inorganic Mg<sub>2</sub>(PP<sub>i</sub>) particle may act as a substrate for the adsorption of newly-synthesized DNA strands. The DNA condensation theory [24] suggests that magnesium ions chelated by inorganic pyrophosphate should decrease the electrostatic repulsion between the newly-synthesized DNA strands, thereby facilitating self-assembly into crystalline-like structures. When the DNA amplification reaction is confined in a small volume, the conditions for DNA condensation become quickly satisfied because of continuous accumulation of reaction products: the newly-synthesized DNA strands and magnesium-pyrophosphate crystals. The resulting DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles can be purified from the reaction mix and still retain significant amounts of clonally-amplified DNA, thus offering attractive possibilities for biomedical and biochemical applications.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microfluidic Device Fabrication and Operation

Polydimethylsiloxane (PDMS)-glass microfluidics devices having rectangular microfluidic channels 10 or 20  $\mu\text{m}$  deep were obtained from Droplet Genomics. Sterile 1-mL syringes (Braun, Bad Arolsen Germany) mounted on syringe pumps (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) and connected to the microfluidics device via 27 G needle and 0.56 mm  $\times$  1.07 mm polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing were used to infuse fluids into the microfluidics chip. Three-picoliter droplets were generated by adjusting flow rates to 100  $\mu\text{L}/\text{h}$  for the reaction mix and 300  $\mu\text{L}/\text{h}$  for the continuous phase. The droplet stabilization oil (Droplet Genomics, Vilnius, Lithuania) was used as the continuous phase to stabilize droplets against coalescence. During encapsulation, samples were kept at 4  $^{\circ}\text{C}$  using an ice-cold jacket and collected in the form of an emulsion in a 0.2-mL polymerase chain reaction (PCR) tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) prefilled with 80  $\mu\text{L}$  of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO, USA) and placed in an ice-rack (Eppendorf).

### 2.2. Single-DNA Molecule Encapsulation and Amplification

The MDA reaction mix contained pIVEX2.2-lacZ-his plasmid,  $1 \times$  phi29 reaction buffer (33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate, 0.1% (*v/v*) Tween 20, 1 mM dithiothreitol (DTT)), 50  $\mu\text{M}$  exo-nuclease resistant hexanucleotide primers, 1 mM of each deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 0.4% (*w/v*) Pluronic F-127 and 0.8 U/ $\mu\text{L}$  phi29 DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The reaction components were mixed in DNA LoBind tubes (Eppendorf) by adding DNA template, nuclease-free water, Pluronic F-127 and hexamers and then heated to 90  $^{\circ}\text{C}$  for 20 s to allow primer annealing. Next, the mixture was quickly transferred onto ice and, following the addition of the remaining components, encapsulated using the microfluidic device. Fluids were injected into the microfluidics device at 100  $\mu\text{L}/\text{h}$  for the aqueous phase and 300  $\mu\text{L}/\text{h}$  for the carrier oil. The encapsulation step typically took  $\sim 60$  min and generated  $\sim 10^7$  monodisperse 3-pL droplets, which were collected off-chip in the form of an emulsion, incubated for 16–18 h at 30  $^{\circ}\text{C}$  and heated at 65  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min to inactivate phi29 DNA polymerase.

### 2.3. Staining of Droplets and Fluorescence Analysis

The droplets were stained with SYBR Green dye I (Life Tech, Rockland, ME, USA) by adding 2  $\mu\text{L}$  of 100 $\times$  dye solution to 2  $\mu\text{L}$  of droplet stabilization oil. The dye passively migrates between the droplets and stains dsDNA. Fluorescence images were recorded with a 1.5 megapixel digital camera (Ds-Qi1, Nikon, Tokyo, Japan) on an inverted microscope (Nikon Ti-U Eclipse). Fluorescence excitation was set at  $470 \pm 20$  nm (with a 100-ms exposure) and emitted light collected at  $525 \pm 25$  nm. Recorded images were processed with open-source software Fiji [28] to count the total number of droplets, the number of fluorescent droplets, mean fluorescence intensity values and the coefficient of variation.

### 2.4. Transmission Electron Microscopy Imaging

Transmission electron microscopy images were recorded on a FEI Morgagni 268 instrument (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). A 4- $\mu\text{L}$  sample was placed on a grid (100 Formvar/Carbon Films, Cu 400 mesh, QUANTIFOIL, Großlöbichau, Germany) and incubated for 1 min at room temperature. After draining excess liquid, the sample was washed twice with Milli-Q purified water, stained with 2% (*w/v*) uranyl acetate for 20 s and then imaged.



### 2.5. DNA Particle Purification

After the DNA amplification reaction, samples were digested with restriction endonuclease (REase) for 15 min at 37 °C to remove the loose DNA that has not been incorporated into the DNA particles. The RE was chosen such that it would cleave the plasmid once and outside the encoded gene. Then, 1 U/ $\mu$ L of HindIII was used to cleave DNA particles generated from pIVEX2.2-lacZ-his plasmid. Following digestion by REase, the DNA particles (100  $\mu$ L) were washed with 400  $\mu$ L of nuclease-free distilled water and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm at room temperature. The supernatant was removed, and the DNA particle pellet was re-suspended in 400  $\mu$ L of nuclease-free distilled water. This was followed by two additional washes after which the DNA particle pellet was re-suspended in a final volume of 50  $\mu$ L nuclease-free distilled water. The purified DNA particles were then stained with 10 $\times$  SYBR Green I dye, loaded onto a hemocytometer, imaged under fluorescence microscope and counted using Fiji software. Purified DNA particles were stored at 4 °C.

### 2.6. Coupled In Vitro Transcription and Translation

$\beta$ -galactosidase enzyme expression was performed using an IVTT system purchased from New England Biolabs (PURExpress<sup>®</sup> in vitro Protein Synthesis Kit, NEB, Ipswich, MA, USA) in the presence of RNase inhibitor Ribolock (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania).

IVTT reaction in 384-well format: The in vitro expression of lacZ in a 384-well format (10  $\mu$ L/well) was performed by preparing two sets of IVTT reaction mixtures. The first set of reactions was supplemented with 0.5 to 500 ng of pIVEX2.2-lacZ-his plasmid, which translated into 10<sup>11</sup>–10<sup>8</sup> copies of free DNA molecules per 10  $\mu$ L. The second set of reactions contained purified DNA particles diluted down to 46,000, 23,000 and 5000 particles per well. Reactions were then incubated at 37 °C for 3 h to allow gene expression to occur. The catalytic activity of in vitro synthesized lacZ enzyme was recorded by mixing 1  $\mu$ L of IVTT mix with 9  $\mu$ L of 1 $\times$  phi29 buffer (NEB) supplemented with 1  $\mu$ M fluorescein-di- $\beta$ -D-galactopyranoside (FDG). The fluorescence signal was measured in a 384-well microtiter plate (polypropylene, black, flat, clear-bottom, Corning Inc., Corning, NY, USA) using a Synergy H4 plate reader set at 488 nm  $\times$  20 nm excitation and 530 nm  $\times$  20 nm emission wavelengths (gain 75 and 50).

IVTT reaction in droplets: Purified DNA particles stained with ethidium bromide (15  $\mu$ g/mL) were mixed with the IVTT solution containing 1  $\mu$ M of  $\beta$ -galactosidase substrate FDG and encapsulated in 18-pL droplets using the 20- $\mu$ m microfluidics device. The flow rates for IVTT reaction encapsulation were 100  $\mu$ L/h for the aqueous phase and 250  $\mu$ L/h for the carrier oil. The encapsulation time typically took  $\sim$ 20 min, at 4 °C. Protein synthesis in vitro was evaluated after incubating the emulsion at 37 °C for 1 h. The fluorescence was recorded using an excitation wavelength at 475 nm  $\times$  12 nm and an emission wavelength at 559 nm  $\times$  17 nm.

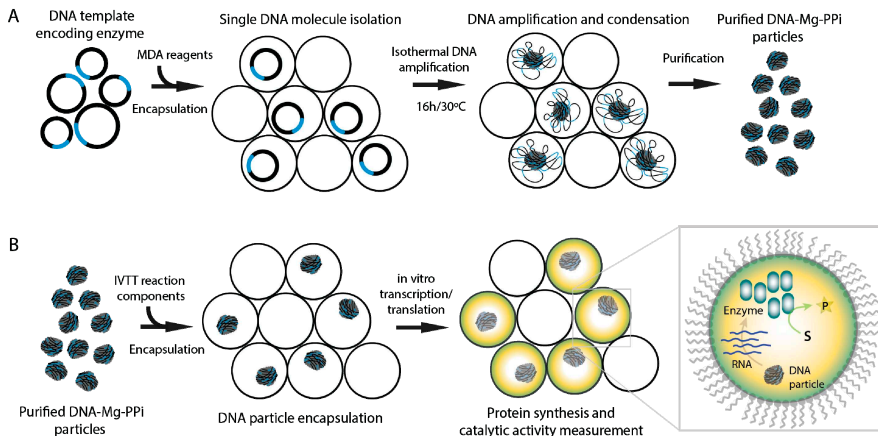
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Single DNA Molecule Encapsulation and Amplification

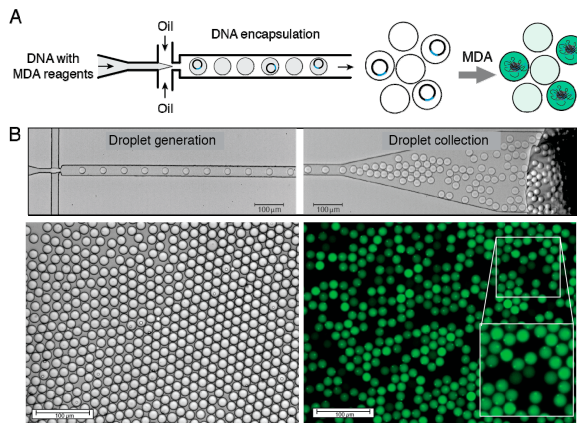
Droplet microfluidics has opened new analytical possibilities for biological sciences, diagnostics and biomedicine [29]. Single-DNA molecule isolation, amplification and digital quantification have gained broad interest for the evaluation of rare diseases [30–32], quantifying the absolute number of nucleic acids in a sample [33,34] or disease diagnostics [35,36]. In these and others examples, the sample containing diluted suspension of nucleic acids is encapsulated in microfluidic droplets and amplified using the PCR reaction followed by fluorescence readout. However, the template size in most of the reports is in the range of  $\sim$ 200–300 nucleotides, which prevents their use for other important applications, such as directed evolution or drug screening. In addition, droplets can experience coalescence during thermocycling [34], thus imposing certain limitations on the experimental design. In this context, DNA amplification driven by phi29 DNA polymerase provides an alternative approach to amplify long DNA molecules and because of isothermal reaction conditions [37,38], the potential

problems associated with emulsion stability become irrelevant. Moreover, the ability not only to amplify individual DNA molecules, but also to express genes from the amplified template opens many interesting possibilities for high throughput screening applications.

The overall experimental strategy of this work is summarized in Figure 1. We first emulsified 3.6 kb circular nucleic acid molecules and multiple displacement amplification (MDA) reagents into 3-pL droplets using 10  $\mu\text{m}$ -deep microfluidics device. The MDA reaction mix contained DNA template (pIVEX2.2-lacZ-his plasmid encoding enzyme  $\beta$ -galactosidase), phi29 DNA polymerase, exo-resistant oligonucleotides and other reagents needed for efficient isothermal DNA amplification reaction (see the Materials and Methods). We used diluted DNA concentrations (0.63 pM) so that one droplet would contain one molecule on average ( $\lambda \sim 1.0$ ). The portioning of DNA molecules into droplets follows the Poisson equation,  $P(X = k) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$ , which describes the probability  $P$  of having  $k$  DNA molecules per droplet ( $k = 0, 1, 2 \dots$ ), where  $\lambda$  is the average DNA molecule number per droplet. Using the reaction mix containing 0.63 pM DNA, the Poisson equation predicts 36.7% of 3-pL droplets being empty, 36.7% having one and 26.6% having  $\geq 2$  DNA molecules. High droplet generation speed ( $\sim 4000 \text{ s}^{-1}$ ) allowed the collection of over  $10^7$  droplets in the form of an emulsion in less than 1 h. Droplets loaded with MDA reaction mix were collected off-chip into a collection tube and incubated for 16 h at 30  $^\circ\text{C}$  to initiate the isothermal DNA amplification reaction by phi29 DNA polymerase. After, off-chip incubation droplets were heated for 10 min at 65  $^\circ\text{C}$  and stained with SYBR Green I dye, which passively migrates between the droplets and becomes fluorescent upon binding dsDNA (Figure 2). In agreement with our previous studies [22], the amplified DNA formed condensed particles clearly visible under the fluorescent microscope (Figure 2B, inset).



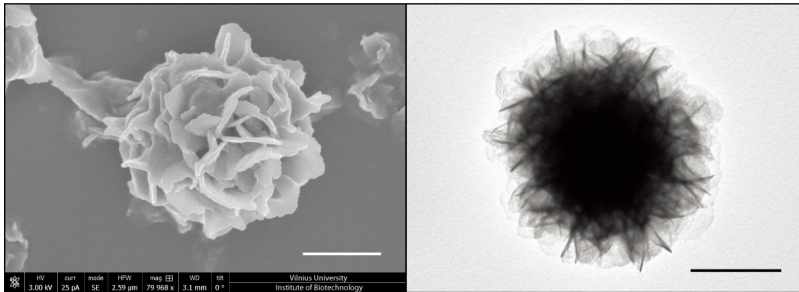
**Figure 1.** Schematics of the experimental platform. **(A)** Single-DNA molecule amplification. DNA template encoding an enzyme is encapsulated in microfluidic droplets and converted into condensed DNA-magnesium-inorganic pyrophosphate (DNA-Mg-PP<sub>i</sub>) particles during the multiple displacement amplification (MDA) reaction. After the MDA step, the resulting DNA particles are released, briefly digested with endonuclease and separated by centrifugation. **(B)** The in vitro transcription-translation (IVTT) reaction using purified DNA particles as a template. DNA particles are encapsulated with IVTT components to initiate protein synthesis in vitro in droplets. The catalytic activity of translated enzyme is then measured by fluorescence readout.



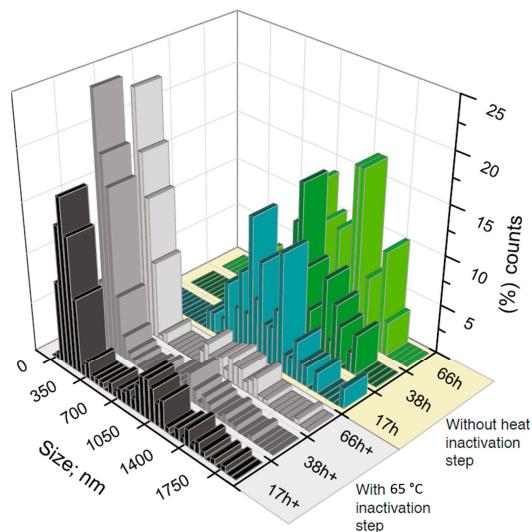
**Figure 2.** DNA encapsulation and amplification using droplet microfluidics. (A) Schematic representation of single-DNA molecule isolation and condensation into DNA particles. (B) Top: still images showing droplet generation and collection. Bottom: the bright field and fluorescence micrographs showing emulsion droplets after MDA reaction. The bright fluorescent objects are visible in droplets. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ .

The transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed densely packed globular shape particles having the average size of  $1233 \pm 266$  nm (Figure 3). Since the amount of amplified DNA during the MDA reaction increases geometrically over time [37], it would be reasonable to assume that longer incubations should increase the size of DNA particles. However, extended incubations have not affected the DNA nanoparticle's size, suggesting that MDA reaction in 3-pL droplets has been largely completed in the 16-h window (Figure 4). Similar studies have shown that the yield of amplified DNA in droplets is limited by the available dNTPs and primers [39]. In addition, it appears that the 65 °C heat-inactivation step, which terminates the MDA reaction by denaturing phi29 DNA polymerase, causes DNA particles to break into smaller pieces, as witnessed by the appearance of two particle subpopulations (Figure 4). We further investigated the external features of the DNA particles by TEM and compared them to the inorganic Mg-PP<sub>i</sub> particles lacking DNA template. To produce inorganic Mg-PP<sub>i</sub> particles, we mixed 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM sodium pyrophosphate (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) in deionized water, heated the reaction mix for 5 min at 70 °C and, after cooling down to room temperature (21 °C), immediately imaged the sample under TEM. The TEM analysis revealed spiky spherulites of approximately ~200 nm in size (Figure 5), resembling calcium orthophosphate cements [40]. When the same Mg-PP<sub>i</sub> particles were mixed with 56 nM of plasmid DNA (~300 ng/ $\mu\text{L}$ ), the spiky features turned into the petal-like structures closely resembling those DNA particles that were synthesized during the MDA reaction (see Figure 3). As expected, staining the latter particles with DNA stain (SYBR Green I dye) produced a highly fluorescent signal, whereas Mg-PP<sub>i</sub> particles that were not incubated with DNA remained completely dark. Altogether, our results suggest that inorganic Mg-PP<sub>i</sub> particles adsorb DNA and, therefore, may act as a seed for DNA assembly into condensed macromolecular structures during the MDA reaction. In support of this notion, Shopsowitz et al. showed that RNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles produced during rolling circle transcription can be stripped off the surface-bound RNA to retain the inorganic Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·3.5H<sub>2</sub>O scaffold core [26]. The fraction of RNA per single particle was found to be around 20 wt %, which we anticipate to be of a similar level for the DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles produced in this work. Others have also shown the generation of various macromolecular nucleic acid structures that are likely to be mediated through multiple ion bridges coordinated by magnesium ions and pyrophosphate [41–45]. Given our results and previous reports, it is appealing to think that under certain environmental

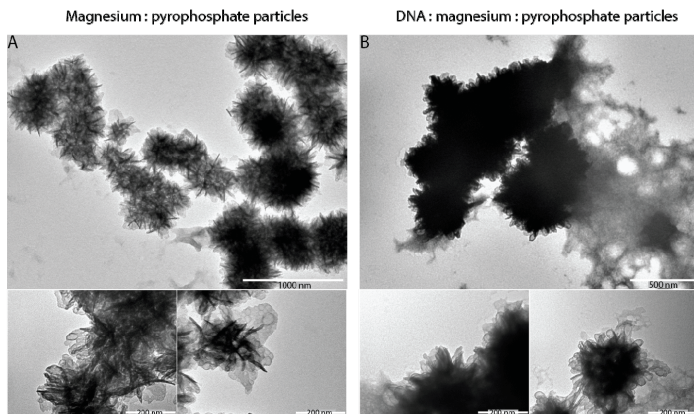
conditions, the inorganic pyrophosphate and divalent ions (magnesium, calcium, etc.) complexes may also induce genomic DNA condensation in cells. Interestingly, earlier research has described bacterial chromosomal DNA condensation (crystallization) induced by negatively-charged Dps proteins and divalent cations [46,47], suggesting that inorganic pyrophosphate possibly could mimic the function of the Dps protein.



**Figure 3.** Electron microscopy analysis of DNA-magnesium-pyrophosphate particles produced during the multiple displacement amplification reaction. Scanning electron microscopy (A) and transmission electron microscopy (B) images of a DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particle produced in a 3-pL droplet during the MDA reaction (excluding the heat-inactivation step at 65 °C). To reveal the petal-like structure of a DNA particle, the transmission electron microscopy (TEM) image was recorded without staining with uranyl acetate. Scale bars, 500 nm.



**Figure 4.** Size distribution of DNA-magnesium-pyrophosphate particles as a function of multiple displacement amplification reaction times, with and without the heat-inactivation step. At different time points (17, 38 and 66 h) of the MDA reaction in 3-pL droplets at 30 °C, the resulting DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles were released from droplets and imaged under TEM to measure their size. The first set of measurements (green) was made without heat-inactivation step. The second set of measurements (grey) was made with heat-inactivation step at 65 °C for 15 min that is typically used to inactivate phi29 DNA polymerase and terminate the MDA reaction.



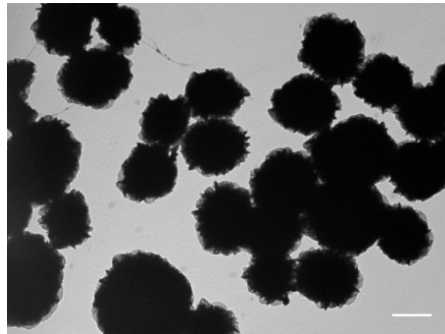
**Figure 5.** Transmission electron microscopy images of magnesium-pyrophosphate and DNA-magnesium-pyrophosphate particles produced in bulk by mixing individual components. (A) Inorganic magnesium-pyrophosphate particles produced by mixing 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5 mM sodium pyrophosphate ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) in deionized water. (B) Particles from (A) mixed with 56 nM plasmid DNA (300 ng/ $\mu\text{L}$ ) and imaged under TEM. Denser staining with uranyl acetate suggests DNA adsorption. No DNA amplification was involved. The particles in (B) stained with DNA dye (SYBR Green I) became fluorescent, whereas the particles in (A) remained dark. Both types of particles were resistant to treatment by yeast enzyme inorganic pyrophosphatase.

### 3.2. Biological Functionality of Condensed DNA Particles

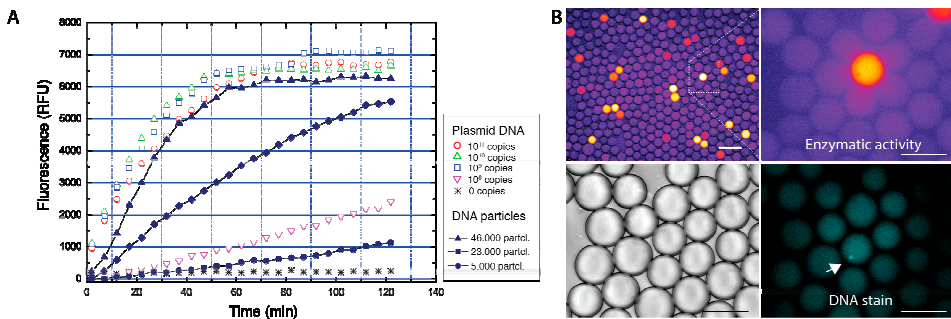
To verify whether clonally-amplified DNA template condensed into DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles support the *in vitro* transcription-translation reaction, we have amplified DNA carrying the lacZ gene by performing the MDA reaction in droplets as described above. After the MDA reaction, DNA particles were released from droplets and purified by brief digestion with restriction endonuclease followed by centrifugation (see Section 2.5). TEM analysis showed that DNA particles retained their condensed structure during purification process (Figure 6). The purified DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles were then added to the IVTT reaction mixture in a 384-well plate and incubated for 3 h to allow lacZ protein synthesis to occur. As a control, we performed IVTT reactions having varying amounts of pIVEX2.2-lacZ plasmid ranging from  $10^{11}$ – $10^8$  template copies in a 10- $\mu\text{L}$  reaction volume. The enzymatic activity of the synthesized protein was then evaluated using a fluorogenic assay, which is based on hydrolysis of FDG (fluorescein-di- $\beta$ -D-galactopyranoside) substrate to produce fluorescent product (fluorescein). Results presented in Figure 7 support the notion that DNA particles can serve as a template for protein synthesis *in vitro*, in agreement with previous work [22]. The yield of *in vitro* synthesized protein from only  $\sim 5 \times 10^4$  DNA particles was approximately equal to the amount of protein produced from as many as  $\sim 10^9$ – $10^{10}$  copies of free DNA plasmid, thus suggesting that after purification, the single DNA particle retains  $\sim 10^4$ – $10^5$  copies of a functional gene. Alternatively, it could be that condensed DNA structures enhance the transcription-translation reaction, similarly to the DNA microgels reported previously [48]. To further validate the feasibility of DNA particles use as a biomaterial for the droplet-based assays, we co-encapsulated purified DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles, the IVTT reaction mix and FDG substrate in 18-pL droplets using the 20  $\mu\text{m}$ -deep microfluidics device depicted in Figure 2B. The collected IVT droplets were incubated at 37 °C for 1 h to allow lacZ gene expression to occur and emulsion imaged under fluorescent microscope. We used DNA particle dilution at  $\lambda \sim 0.1$  to reduce the chance of having two particles in a droplet: in these conditions,  $\sim 89\%$  of droplets would contain zero particles, 10% would contain one DNA particle and  $\sim 0.5\%$  of all droplets would contain  $\geq 2$  DNA particles. As expected, the microscopic analysis revealed a droplet subpopulation ( $\sim 10\%$ )



with bright fluorescent signal, thus indicating the reaction product formation due to the catalytic activity of  $\beta$ -galactosidase. The fluorescence signal corresponding to the enzymatic activity varied among droplets (coefficient of variation  $\sim 20\%$ ) and could be attributed to the differences of purified particle size (Figure 6) or varying amounts of DNA template incorporated into a particle. Nonetheless, considering early microfluidic systems [39] in which droplet reinjection and fusion steps were needed to perform protein synthesis from the amplified DNA template, this work significantly simplifies the use of in vitro expression assays and, therefore, could open new possibilities for directed evolution and synthetic biology fields. Finally, the better understanding of a mechanism by which amplified DNA is incorporated into macromolecular DNA-Mg-PP<sub>i</sub> structures during the DNA amplification reaction may facilitate the improvement of whole genome amplification [49] and other isothermal nucleic acid amplification techniques [38].



**Figure 6.** TEM image of purified DNA-magnesium-pyrophosphate particles. DNA particles produced during the MDA reaction were released from droplets, digested with diluted restriction endonuclease enzyme and purified by centrifugation followed by TEM imaging. Scale bar, 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure 7.** LacZ expression in vitro using purified DNA-magnesium-pyrophosphate particles as a template. **(A)** Evaluation of the catalytic activity of the in vitro synthesized  $\beta$ -galactosidase enzyme. Protein synthesis was performed in a 384-well format using different dilutions of pIVEX-lacZ-his plasmid ( $10^{11}$ – $10^8$  copies in a 10- $\mu\text{L}$  IVTT reaction) and purified DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles (46,000, 23,000 and 5000 particles in a 10- $\mu\text{L}$  IVTT reaction). The corresponding amount of plasmid DNA and DNA particles is indicated on the right side of the graph. Solid symbols indicate the enzymatic activity of lacZ protein synthesized from the DNA particles, whereas open symbols indicate protein synthesized from the plasmid DNA. **(B)** Evaluation of the IVTT reaction and enzymatic activity in droplets. Purified DNA particles were encapsulated in 18-pL droplets ( $\lambda \sim 0.1$ ), and lacZ expression levels were measured by the accumulation of fluorescent product (fluorescein). To visualize DNA particles in droplets, the DNA stain (ethidium bromide) was used. Scale bars denote 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Conclusions

An in vitro gene expression provides an important advantage for various screening applications as it enables the expression of proteins or enzymes that are toxic to the cells or that interfere with cell metabolic functions. The use of in vitro transcription-translation (IVTT) systems that rely on purified transcription and translation machinery components provide an attractive possibility to circumvent screening limitations imposed by living systems [50]. IVTT systems have been successfully applied for the expression of various recombinant proteins from the DNA templates [51,52]. Yet, to achieve sufficient amounts of in vitro synthesized protein, relatively high DNA template concentrations are needed ( $\sim 10^9$  of DNA molecules per 10- $\mu$ L reaction), and as a result, in vitro screening options for new catalytic activities in the synthetic gene libraries become largely restricted. Therefore, gene pre-amplification is often used before an in vitro expression step in order to circumvent the limited efficiency of IVTT systems [39,51]. For droplet microfluidics in particular, the DNA amplification by means of PCR can prove challenging, since long amplicons (>500 bp) are not amplified efficiently, and droplets' integrity could be affected during thermocycling. Moreover, since biochemical conditions for the DNA amplification and IVTT reaction are different, the expression of proteins from the amplified DNA template would require precise fusion of individual droplets containing amplified DNA with droplets having IVTT reaction mix [39]. In this context, encapsulation of the DNA-Mg-PP<sub>i</sub> particles carrying high amounts of clonally-amplified template provides a straightforward approach to increase the yield of in vitro expressed proteins in droplets without the need of performing complex, multi-step fluidic operations. Finally, the microfluidic approach reported here is likely to provide a promising method for the preparation of condensed DNA particles with encoded biological functionality for directed evolution, proteomics and synthetic biology applications.

**Acknowledgments:** This work was supported by a Lithuanian-Swiss Research and Development cooperation program, Grant No. CH-3-SMM-01/03. Linas Mazutis holds a Marie Curie fellowship funded by the H2020-MSCA-IF-2015 program (Grant No. 705791). The authors are grateful to Juozas Nainys for critically reading the manuscript and Saulius Grazulis for valuable comments.

**Author Contributions:** L.M. conceived and designed the experiments; G.Z., K.S., R.G. and V.K. performed the experiments; all authors analyzed the data; V.M. contributed reagents/materials/analysis tools; L.M. wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The results of this work have been submitted for patent application (PCT/IB2017/050124). L.M. and V.M. are affiliated with Droplet Genomics.

#### References

1. Theberge, A.B.; Courtois, F.; Schaerli, Y.; Fischlechner, M.; Abell, C.; Hollfelder, F.; Huck, W.T.S. Microdroplets in microfluidics: An evolving platform for discoveries in chemistry and biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5846–5868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Guo, M.T.; Rotem, A.; Heyman, J.A.; Weitz, D.A. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab Chip* **2012**, *12*, 2146–2155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Niu, X.; Gielen, F.; Edel, J.B.; deMello, A.J. A microdroplet dilutor for high-throughput screening. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 437–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Eastburn, D.J.; Sciambi, A.; Abate, A.R. Ultrahigh-throughput mammalian single-cell reverse-transcriptase polymerase chain reaction in microfluidic drops. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8016–8021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pekin, D.; Skhiri, Y.; Baret, J.C.; Le Corre, D.; Mazutis, L.; Ben Salem, C.; Millot, F.; El Harrak, A.; Hutchison, J.B.; Larson, J.W.; et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2156–2166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zhong, Q.; Bhattacharya, S.; Kotsopoulos, S.; Olson, J.; Taly, V.; Griffiths, A.D.; Link, D.R.; Larson, J.W. Multiplex digital PCR: Breaking the one target per color barrier of quantitative pcr. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2167–2174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hindson, B.J.; Ness, K.D.; Masquelier, D.A.; Belgrader, P.; Heredia, N.J.; Makarewicz, A.J.; Bright, I.J.; Lucero, M.Y.; Hiddessen, A.L.; Legler, T.C.; et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8604–8610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Tewhey, R.; Warner, J.B.; Nakano, M.; Libby, B.; Medkova, M.; David, P.H.; Kotsopoulos, S.K.; Samuels, M.L.; Hutchison, J.B.; Larson, J.W.; et al. Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1025–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lan, F.; Haliburton, J.R.; Yuan, A.; Abate, A.R. Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kintsès, B.; Hein, C.; Mohamed, M.F.; Fischlechner, M.; Courtois, F.; Laine, C.; Hollfelder, F. Picoliter cell lysate assays in microfluidic droplet compartments for directed enzyme evolution. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1001–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Romero, P.A.; Tran, T.M.; Abate, A.R. Dissecting enzyme function with microfluidic-based deep mutational scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 7159–7164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Agresti, J.J.; Antipov, E.; Abate, A.R.; Ahn, K.; Rowat, A.C.; Baret, J.C.; Marquez, M.; Klivanov, A.M.; Griffiths, A.D.; Weitz, D.A. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4004–4009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Debs, B.E.; Utharala, R.; Balyasnikova, I.V.; Griffiths, A.D.; Merten, C.A. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11570–11575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J.B.; Rothberg, J.M.; Link, D.R.; Perrimon, N.; Samuels, M.L. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14195–14200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mazutis, L.; Gilbert, J.; Ung, W.L.; Weitz, D.A.; Griffiths, A.D.; Heyman, J.A. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 870–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Miller, O.J.; El Harrak, A.; Mangeat, T.; Baret, J.C.; Frenz, L.; El Debs, B.; Mayot, E.; Samuels, M.L.; Rooney, E.K.; Dieu, P.; et al. High-resolution dose-response screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 378–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Del Ben, F.; Turetta, M.; Celetti, G.; Piruska, A.; Bulfoni, M.; Cesselli, D.; Huck, W.T.; Scoles, G. A method for detecting circulating tumor cells based on the measurement of single-cell metabolism in droplet-based microfluidics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *128*, 8723–8726.
18. Ryckelynck, M.; Baudrey, S.; Rick, C.; Marin, A.; Coldren, F.; Westhof, E.; Griffiths, A.D. Using droplet-based microfluidics to improve the catalytic properties of RNA under multiple-turnover conditions. *RNA* **2015**, *21*, 458–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Shim, J.U.; Cristobal, G.; Link, D.R.; Thorsen, T.; Fraden, S. Using microfluidics to decouple nucleation and growth of protein crystals. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2192–2194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Knowles, T.P.; White, D.A.; Abate, A.R.; Agresti, J.J.; Cohen, S.I.; Sperling, R.A.; De Genst, E.J.; Dobson, C.M.; Weitz, D.A. Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14746–14751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Fallah-Araghi, A.; Meguellati, K.; Baret, J.C.; El Harrak, A.; Mangeat, T.; Karplus, M.; Ladame, S.; Marques, C.M.; Griffiths, A.D. Enhanced chemical synthesis at soft interfaces: A universal reaction-adsorption mechanism in microcompartments. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Galinis, R.; Stonyte, G.; Kiseliovas, V.; Zilionis, R.; Studer, S.; Hilvert, D.; Janulaitis, A.; Mazutis, L. DNA nanoparticles for improved protein synthesis in vitro. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 3120–3123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. McPherson, A. Introduction to protein crystallization. *Methods* **2004**, *34*, 254–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bloomfield, V.A. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269–282. [[CrossRef](#)]
25. Oetting, F.L.; McDonald, R.A. The thermodynamic properties of magnesium orthophosphate and magnesium pyrophosphate. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2737–2743. [[CrossRef](#)]
26. Shopsowitz, K.E.; Roh, Y.H.; Deng, Z.J.; Morton, S.W.; Hammond, P.T. RNAi-microsponges form through self-assembly of the organic and inorganic products of transcription. *Small* **2014**, *10*, 1623–1633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lambert, S.M.; Watters, J.I. The complexes of magnesium ion with pyrophosphate and triphosphate ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5606–5608. [[CrossRef](#)]
28. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



29. Casadevall I Solvas, X.; deMello, A. Droplet microfluidics: Recent developments and future applications. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1936–1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chen, W.W.; Balaj, L.; Liao, L.M.; Samuels, M.L.; Kotsopoulos, S.K.; Maguire, C.A.; Loguidice, L.; Soto, H.; Garrett, M.; Zhu, L.D.; et al. Beaming and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Miotke, L.; Lau, B.T.; Rumma, R.T.; Ji, H.P. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2618–2624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Beck, J.; Bierau, S.; Balzer, S.; Andag, R.; Kanzow, P.; Schmitz, J.; Gaedcke, J.; Moerer, O.; Slotta, J.E.; Walson, P.; et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 1732–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hindson, C.M.; Chevillet, J.R.; Briggs, H.A.; Gallichotte, E.N.; Ruf, I.K.; Hindson, B.J.; Vessella, R.L.; Tewari, M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 1003–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Beer, N.R.; Hindson, B.J.; Wheeler, E.K.; Hall, S.B.; Rose, K.A.; Kennedy, I.M.; Colston, B.W. On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8471–8475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Taly, V.; Pekin, D.; Benhaim, L.; Kotsopoulos, S.K.; Le Corre, D.; Li, X.; Atochin, I.; Link, D.R.; Griffiths, A.D.; Pallier, K.; et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 1722–1731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Taly, V.; Pekin, D.; El Abed, A.; Laurent-Puig, P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 405–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dean, F.B.; Nelson, J.R.; Giesler, T.L.; Lasken, R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1095–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12491–12545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mazutis, L.; Araghi, A.F.; Miller, O.J.; Baret, J.C.; Frenz, L.; Janoshazi, A.; Taly, V.; Miller, B.J.; Hutchison, J.B.; Link, D.; et al. Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4813–4821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dorozhkin, S.V. Self-setting calcium orthophosphate formulations. *J. Funct. Biomater.* **2013**, *4*, 209–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Yata, T.; Takahashi, Y.; Tan, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H.; Endo, M.; Takakura, Y.; Nishikawa, M. Efficient amplification of self-gelling polypod-like structured DNA by rolling circle amplification and enzymatic digestion. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Roh, Y.H.; Deng, J.Z.; Dreaden, E.C.; Park, J.H.; Yun, D.S.; Shopsowitz, K.E.; Hammond, P.T. A multi-RNAi microsphere platform for simultaneous controlled delivery of multiple small interfering RNAs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 3347–3351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhu, G.Z.; Hu, R.; Zhao, Z.L.; Chen, Z.; Zhang, X.B.; Tan, W.H. Noncanonical self-assembly of multifunctional DNA nanoflowers for biomedical applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16438–16445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lee, S.Y.; Kim, K.R.; Bang, D.; Bae, S.W.; Kim, H.J.; Ahn, D.R. Biophysical and chemical handles to control the size of DNA nanoparticles produced by rolling circle amplification. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 1314–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kahn, J.S.; Ruiz, R.C.H.; Sureka, S.; Peng, S.M.; Derrien, T.L.; An, D.; Luo, D. DNA microgels as a platform for cell-free protein expression and display. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2019–2026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Frenkiel-Krispin, D.; Levin-Zaidman, S.; Shimoni, E.; Wolf, S.G.; Wachtel, E.J.; Arad, T.; Finkel, S.E.; Kolter, R.; Minsky, A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: A non-enzymatic pathway for generic DNA protection. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1184–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wolf, S.G.; Frenkiel, D.; Arad, T.; Finkel, S.E.; Kolter, R.; Minsky, A. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **1999**, *400*, 83–85. [[PubMed](#)]

48. Park, N.; Um, S.H.; Funabashi, H.; Xu, J.; Luo, D. A cell-free protein-producing gel. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 432–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sidore, A.M.; Lan, F.; Lim, S.W.; Abate, A.R. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Tawfik, D.S.; Griffiths, A.D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mazutis, L.; Baret, J.C.; Treacy, P.; Skhiri, Y.; Araghi, A.F.; Ryckelynck, M.; Taly, V.; Griffiths, A.D. Multi-step microfluidic droplet processing: Kinetic analysis of an in vitro translated enzyme. *Lab Chip* **2009**, *9*, 2902–2908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Asahara, H.; Chong, S. In vitro genetic reconstruction of bacterial transcription initiation by coupled synthesis and detection of rna polymerase holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 9 egz.