

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

AUSTĖ IVANAUSKAITĖ

Mikrobiologijos studijų programa

**Magistro baigiamasis darbas**

**T7 ENDONUKLEAZĖS I SAVYBIŲ TYRIMAS**

Darbas atliktas įmonėje UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“,  
Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre

Darbo vadovė  
Dr. Renata Rimšalienė

Vilnius, 2023

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Austė Ivanauskaitė  
Magistro baigiamasis darbas

**T7 ENDONUKLEAZĖS I SAVYBIŲ TYRIMAS**

SANTRAUKA

T7 endonukleazė I (T7E1) - tai bakteriofago T7 koduojama endonukleazė, selektyvi DNR struktūrai. T7E1 atpažįsta ir katalizuoja endonukleolitinę įvairių šakotų DNR struktūrų hidrolizę abiejose DNR grandinėse – Holidėjaus jungtis, kryžminės DNR formas, antrines viengrandės DNR struktūras, ir kt., taip pat gali atpažinti nesutapimus, insercijas ar delecijas linijinėje dvigrandėje DNR. T7E1 naudojama genų sintezėje klaidų taisymui, mutacijų nustatymui genomo redagavimo ir viso genomo amplifikavimo tyrimuose. Literatūros duomenimis, skirtingus nesutapimus fermentas atpažįsta nevienodu efektyvumu. Nors fermento savybės yra gana detalios išnagrinėtos, detali baltymo gryninimo schema nėra publikuota.

Ankstesniuose tyrimuose buvo sukurti ir atrinkti keli producentai su didžiausia T7 endonukleazės I baltymo raiška. Šio darbo tikslas yra sukurti efektyvią T7E1 baltymo gryninimo schemą, parinkti sąlygas efektyviam įvairių heterodupleksinių substratų karpymui bei įvertinti fermento platesnio praktinio pritaikymo galimybes. Tyrimo metu buvo įvertinta baltymo raiška skirtinguose producentuose, sukurta preliminari T7E1 baltymo gryninimo schema, naudojant atrinktą producentą. Išgryninus baltymą, buvo įvertintas preparato fizinis ir funkcinis grynumai, bei baltymo aktyvumas, naudojant skirtingus sukonstruotus substratus. Darbo metu analizuotos T7 endonukleazės I baltymo savybės – baltymo savitasis aktyvumas, terminė inaktyvacija, terminis stabilumas, aktyvumas laike, bei įvertintos praktinio panaudojimo galimybės.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER

Austė Ivanauskaitė

Master thesis

**RESEARCH OF T7 ENDONUCLEASE I PROPERTIES**

SUMMARY

T7 endonuclease I (T7E1) is a structure-selective endonuclease encoded by bacteriophage T7. T7E1 recognizes and catalyzes the cleavage of various branched DNA structures on both DNA strands – Holliday junctions, cruciform DNA, secondary structures of single-stranded DNA, etc. It can also recognize mismatches, insertions, or deletions in linear double-stranded DNA. T7E1 is used in gene synthesis for error correction, mutation detection in genome editing studies, and whole genome amplification experiments. According to the literature, T7 endonuclease I can recognize various DNA mismatches with different efficiency. Although the properties of the enzyme have been studied in quite some detail, a detailed scheme for the purification of the protein has not been yet published.

In previous studies, several producer strains were created and the ones with the highest expression of recombinant T7 endonuclease I protein were selected. This work aims to create an efficient T7E1 protein purification scheme, analyze the cleavage of various heteroduplex substrates, and evaluate the potential use of the enzyme in a broader range of practical applications. During this work, the expression of the protein in different producer strains was evaluated, and a preliminary scheme for the purification of the T7E1 protein was created. After the protein was purified, the physical and functional purity was evaluated, as well as the activity of the protein using different constructed substrates. The properties of the T7 endonuclease I protein were analyzed, such as specific activity, thermal inactivation, thermal stability, activity over time, and the possibilities of practical use were evaluated as well.