

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS



MARIUS BALTRAMONAITIS

Biochemijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

Potencialiai termostablesnių T7 RNR polimerazės mutantų savybių tyrimas

Darbo vadovas: dr. Remigijus Skirgaila

Darbo konsultantas: Agnė Stašytė

Vilnius, 2022 m.

SANTRAUKA

Potencialiai termostabilesnių T7 RNR polimerazės mutantų savybių tyrimas

Biochemijos magistro studijų baigiamasis darbas

Fago T7 RNR polimerazė (T7 RNRP) yra fermentas, vykdomas transkripcijos reakciją ir plačiai naudojamas molekulinės biologijos įrankis RNR sintezėje *in vivo* ir *in vitro*. Vykdomas RNR molekulių sintezę *in vitro* be tiksline produkto reakcijoje aptinkami nepageidaujami pašaliniai produktai, pavyzdžiui, neįjungti nukleotidai, nutraukti bei nepilno ilgio transkriptai, kuriuos galima pašalinti gryninimo metu bei optimizuojant DNR matricą. Kitas pašalinis produktas – susidaranti dvigrandinė RNR molekulė (dgRNR), kurių pašalinimas sudėtingesnis. Pademonstruota, jog vykdomas IVT aukštesnėje temperatūroje, susidaro mažesnis kiekis dgRNR, tačiau tam reikalinga termostabili T7 RNRP.

Šio darbo metu tiriama potencialiai termostabilesni taškiniai T7 RNRP mutantai bei jų gebėjimas vykdyti *in vitro* transkripciją aukštesnėje temperatūroje. Atrinkti geresnėmis savybėmis pasižymintys mutantai gryninami ir toliau charakterizuojami vertinant jų termostabilumą bei tiriant dgRNR susidarymą atliekant *in vitro* transkripciją skirtingose temperatūrose. Identifikavus labiausiai fermento termostabilumą padidinančias mutacijas tikrinamas jų adityvumas konstruojant dvigubus mutantus ir tikrinant jų gebėjimą vykdyti IVT aukštesnėje temperatūroje.

SUMMARY

Analysis of Properties of Potentially Thermostable T7 RNA Polymerase Mutants

Master Thesis

Bacteriophage T7 RNA polymerase (T7 RNAP) is an enzyme that catalyses transcription reaction and is widely used tool in molecular biology for RNA synthesis *in vivo* and *in vitro*. During *in vitro* transcription in addition to the main RNA transcript, there are also by-products such as unincorporated nucleotides, abortive or partially synthesised transcripts that are formed and can be removed by optimising DNA template or during purification step. Other major by-product are double-stranded RNA (dsRNA) molecules that are more difficult to remove during purification. It was previously demonstrated that the level of such dsRNA by-products can be lowered by performing *in vitro* transcription at elevated temperatures which requires usage of thermostable T7 RNAP.

During this research properties of potentially thermostable point mutants of T7 RNAP were investigated such as their ability to perform *in vitro* transcription at elevated temperatures. Variants demonstrating improved properties were selected for protein purification and further experiments for determining their thermostability and the level of dsRNA that is formed during *in vitro* transcription in different temperatures. Mutations showing the largest improvement in increasing polymerase thermostability were combined into twofold mutants for investigation of mutation additivity and their ability to carry out *in vitro* transcription at elevated temperature.