

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos magistrantė

Iveta KAURYNAITĖ

Magistro darbas

Ant magnetinių dalelių imobilizuotos DNazėsI tyrimai

Darbo vadovė:

Dr. Vaida Šeputienė

Vilnius, 2017 m.

Ant magnetinių dalelių imobilizuotos DNazėsI tyrimai

Santrauka

Fermentų imobilizacija yra jau daugelį metų biotechnologijoje plačiai naudojamas metodas, suteikiantis eilę privalumų. Pastaruoju metu sparčiai vystoma sritis – baltymų imobilizavimas ant magnetinių dalelių konjugacijos su giminingais ligandais metodu. Tyrimai rodo, kad šiuo metodu imobilizuojant baltymus yra pasiekiami puikių rezultatų, nes baltymai patiria minimalius konformacinius pokyčius, jų aktyvieji centrai išlieka nepažeisti, ir jie pasižymi didesniu stabilumu bei katalizės efektyvumu.

Šiame darbe buvo siekiama ant magnetinių dalelių imobilizuoti DNazėsI laukinio tipo ir sumažinto aktyvumo mutantinius baltymus bei sukurti fermentinę DNR hidrolizės sistemą, kurią naudojant būtų galima fragmentuoti ilgas DNR molekules iki tam tikro ilgio fragmentų.

Darbo metu buvo sukonstruoti DNazėsI laukinio tipo ir mutantinių baltymų raiškos vektoriai. Afininės chromatografijos būdu išgryninus *in vivo* biotininčius baltymus, buvo įvertintas DNazėsI laukinio tipo ir mutantinių baltymų aktyvumas *in vitro*. Panaudojant biotino-streptavidino sąveiką baltymai buvo imobilizuoti ant skirtingų rūšių magnetinių dalelių, nustatytas jų aktyvumas - įvertintas DNR hidrolizės efektyvumas bei atlikti imobilizuotų baltymų stabilumo tyrimai.

Study of immobilised DnaseI

Summary

Immobilization of enzymes has been used in biotechnology for many years and provides numerous advantages. One of the developing areas in biotechnology these days is immobilization of enzymes on magnetic beads through affinity interactions. This method shows great results since it causes minimal changes in the conformation of enzymes and does not affect their active sites. As a result, immobilized enzymes demonstrate high stability and catalytic efficiency.

The aim of this study was to immobilize wild-type and reduced activity mutants of DNaseI proteins and to create an enzymatic DNA hydrolysis system, which could be used in fragmentation of genomic DNA to fixed-length fragments.

In this work, expression vectors of wild-type and reduced activity mutants of DNaseI proteins were created. *In vivo* biotinylated proteins were purified using affinity chromatography and their activities were evaluated *in vitro*. Purified wild-type and reduced activity mutants of DNaseI proteins were immobilized on different types of streptavidin coated magnetic beads using strong biotin-streptavidin interactions. The DNase activity of immobilized proteins was measured and DNA hydrolysis was evaluated.