



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Gytis Miliauskas

Magistro baigiamasis darbas

Fermentinės reakcijos ant kietų paviršių

Darbas atliktas UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ Vilniaus padalinyje

Darbo vadovas:
Dr. Arūnas Lagunavičius

Vilnius
2017

SANTRAUKA

Imobilizuoti fermentai yra vis dažnesnis įrankis šiuolaikinėje biotechnologijoje bei diagnostikoje. Tokie fermentai neretai pasižymi platesnėmis pH ir temperatūros veikimo ribomis bei didesniu termostabilumu. Juos lengva naudoti ir gali būti pritaikyti daugkartiniam naudojimui, todėl tai yra sparčiai auganti rinka.

Dar vienas plačiai naudojamas įrankis biotechnologijos rinkoje – magnetinės dalelės. Jų sintezė nėra sudėtinga, pagamintos dalelės būna homogeniškos ir reikalingo dydžio. Eksperimentinėje dalyje naudotos magnetinės dalelės su skirtingai modifikuotais hidrofobiniais ir hidrofiliniais paviršiais. Tiesioginis surišimas - fermento imobilizavimas ant magnetinės dalelės per tozil ar epoksi grupes, kurio metu susidaro kovalentinis ryšys tarp grupės ir fermento pirminio amino (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Surface_Activated_Dynabeads.PDF). Netiesioginis surišimas – biotinilinto fermento imobilizavimas ant magnetinių dalelių padengtų streptavidinu, kuris su biotinu sudaro nekovalentinį kompleksą (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Dynabeads_Streptavidin_Products_and_Applications.pdf).

Tyrimo objektais pasirinkta polimerazė ir nukleazė. Eksperimentinėje dalyje nustatinėta magnetinėmis dalelėmis surištų fermentų specifiniai aktyvumai, funkcionalumas bei daugkartinis naudojimas. Pastebėta, kad surištų fermentų aktyvumai ženkliai sumažėja, taip pat kuo stipresnis ryšys tarp magnetinės dalelės ir fermento, tuo aktyvumas mažesnis. Nukleazė yra labiau linkus susirišti tiesiogiai su hidrofobinio paviršiaus dalelėmis, o polimerazė - netiesiogiai su hidrofilinėmis magnetinėmis dalelėmis. Tiriant daugkartinį panaudojimą, nustatyta, kad nukleazė išlaiko specifinį aktyvumą, o polimerazė praranda.

SUMMARY

Immobilized enzymes are a common tool in modern biotechnology and diagnostics. Such enzymes often have a wider pH and temperature limits of operation and enhanced thermostability. They are easy to use and can be adapted for multiple use, for that reason their market is rapidly growing.

Another widely used tool in biotechnology - magnetic particles. Their synthesis is easy, the produced particles are homogeneous and correct size. Magnetic particles used in the experiments had differently modified hydrophobic and hydrophilic surfaces. Direct coupling - enzyme immobilization onto the magnetic particles through the tosyl or epoxy groups, which results in a covalent bond between the magnetic bead and the primary amine of the enzyme (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Surface_Activated_Dynabeads.PDF). Indirect coupling – immobilization of biotinylated enzyme on magnetic particles coated with streptavidin, which comprises a non-covalent complex (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Dynabeads_Streptavidin_Products_and_Applications.pdf).

Polymerase and nuclease were selected for the experiments. Specific and functional activities, multi-use of coupled enzymes were studied during the experiments. It was found that bound enzymes show significantly lower specific activity. Nuclease is more likely directly couple to magnetic beads with hydrophobic surface, and polymerase – indirectly to magnetic beads with hydrophilic surface. Nuclease retained specific activity after re-use, while polymerase lost it.