VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

MANTAS BALIUKYNAS

Bacillus mojavensis β-karboanhidrazės raiškos ir sekrecijos tyrimai įvairiose mielių gentyse

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biotechnologijos instituto

Taikomosios biokatalizės sektoriuje

Darbo vadovė

Dr. I. Matijošytė

Konsultantas

R. Šiekštelė

Vilnius 2020

Turinys

ĮVADAS 4
SANTRUMPOS 6
1. **LITERATŪROS APŽVALGA** 7
1.1 Biotechnologija 7
1.2 Poliuretanas (PU) 11
1.3 Karboanhidrazės 14
1.4 β-KA raiškos sistemos 19
1.4.1 KA raiška bakterinėse heterologinių baltymų raiškos sistemose 19
1.4.2 KA heterologinės raiškos sistemos mielėse 20
1.5 Molekuliniai klonavimo metodai 22
2. **MEDŽIAGOS IR METODAI** 28
2.1 Prietaisai ir priemonės 28
2.2 Naudoti mikroorganizmai ir vektoriai 28
2.4 DNR išskyrimo ir gryninimo tirpalai 29
2.5 Fermentai ir buferiniai tripalai 29
2.6 Plazmidinės DNR išskyrimo ir gryninimo tirpalai 29
2.7 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo tirpalai 30
2.8 DNR elektroforezės tirpalai 30
2.9 Bakterijų mitybinės terpės 31
2.10 Mielių mitybinės terpės 31
2.11 Pradmenys 32
2.12 Baltymo koncentracijos matavimo tirpalai 32
2.13 Baltymų elektroforezės tirpalai denatūruojančiomis sąlygomis 32
2.14 Baltymų elektroforezės tirpalai natyviomis sąlygomis 33
2.15 Protonogramos tirpalai 33
2.16 Fermentinio aktyvumo matavimo tirpalai 33
2.17 Kiti tirpalai 34
2.18 DNR elektroforezė agarozės gelyje 34
2.19 DNR išskyrimas iš agarozės gelio su rinkiniu „GeneJET™ Gel Extraction Kit" 34
2.20 Plazmidinės DNR gryninimas su rinkiniu „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit" 35
2.21 DNR koncentracijos nustatymas 35
2.22 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) 35
2.23 *E.coli* ląstelių ruošimas transformacijai 36
2.24 Kompetentinių *E.coli* ląstelių transformacija 36
2.25 Kolonijų tikrinimas PGR metodu 36
2.26 Plazmidinės DNR išskyrimas iš *E.coli* šarminės lizės metodu 37
2.27 Plazmidinės DNR valymas PEG/$MgCl_2$ 38
2.28 Plazmidžių restrikcinė analizė 38
2.29 *S.cerevisiae* ląstelių ruošimas transformacijai 38
2.30 Kompetentinių *S.cerevisiae* kultūrų transformacija 38
2.31 Tikslinio baltymo raiška mielėse *S.cerevisiae* 38
2.32 Kompetentinių *P.pastoris* ruošimas transformacijai 39
2.33 Kompetentinių *P.pastoris* ląstelių transformacija 39
2.34 Rekombinantinių *P.pastoris* klonų atranka 39

2.35 Tikslinio baltymo raiška mielėse *P.pastoris* 40
2.36 Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu 40
2.37 Baltymų koncentravimas 41
2.38 Ląstelių ardymo metodas stiklo rutuliukais 41
2.39 Baltymų elektroforezės NDS-PAGE natyviomis ir denatūruojančiomis sąlygomis metodai 41
2.40 Protonograma 42
2.41 Hidratacinio karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su fenolio raudonuoju 42
2.42 Karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su p-nitrofenilo acetatu 42
2.43 Karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su indoksilo acetatu 43
3. **REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS** 44
3.1 *β-cab* geno klonavimas ir raiška *S.cerevisiae* 44
3.2 Heterologinės karboanhidrazės klonavimas ir raiška *P.pastoris* mielėse 49
3.2.1 *β-cab* klonavimas į šaudyklinius raiškos vektorius pPIC3,5K bei pPIC9K 50
3.2.2 Heterologinės β-karboanhidrazės raiška mielėse *P.pastoris*, kai raiškos vektorius yra pPIC3,5K 53
3.2.3 Heterologinės β-karboanhidrazės raiška mielėse *P.pastoris*, kai raiškos vektorius yra pPIC9K 57
IŠVADOS 62
SANTRAUKA 63
SUMMARY 64
MOKSLINIŲ PASIEKIMŲ SĄRAŠAS 65
PADĖKA 66
LITERATŪROS SĄRAŠAS 67

ĮVADAS

Sparčiai auganti žmonių populiacija, ekonomika, besikeičiantis požiūris į gyvenimą, paieška alternatyvių energijos, produktų gavybos būdų bei didėjantys poreikiai spartina ir mokslo šakų, naujų sričių formavimąsi ar jau esamų augimą. Viena tokių yra biotechnologija, kuri per pastaruosius kelis dešimtmečius apjuosė įvairias pritaikymo sritis. Kalbant apie biotechnologijas derėtų paminėti vienus svarbiausių šios srities įrankius - fermentus. Fermentai yra biologiniai katalizatoriai, kurie paspartina katalizuojamos reakcijos greitį iki tūkstančio kartų. XX a. pramoniniuose procesuose dažniausiai buvo naudojami cheminiai katalizatoriai, tačiau identifikavus ir išgryninus įvairius fermentus, šie sparčiai pakeitė dalį cheminių katalizatorių dėl unikalių savo savybių, t.y., bioskaidumas, regio- ir sterio-specifiškumas, veikimas švelnesnėse reakcijos sąlygose ir kt. Tačiau, dalis cheminių katalizatorių vis dar išlieka nepakeistų dėl ribotų rekombinantinių baltymų sintezės galimybių. Dažnai fermentai yra sintetinami neefektyviai, gamybos lygis žemas ar gaminamas baltymas yra neaktyvios būsenos.

Ne išimtis tapo ir visai neseniai pradėtos tyrinėti bakterinės β-karboanhidrazės. Kaip ir kitų septynių karboanhidrazių šeimos (α-KA, γ-KA, δ-KA, ζ-KA, η-KA, ɵ-KA, ι-KA) atstovai, β-KA katalizuoja grįžtamąją CO_2 hidratacijos/dehidratacijos reakciją. Pastaruoju metu išaugo susidomėjimas β-KA dėl unikalios savybės fiksuoti atmosferinį CO_2 bei galimybės anglies dvideginį konvertuoti į aukštesnės pridėtinės vertės produktus, pavyzdžiui, akrilatus, polikarbonatus, metaną, statybines medžiagas, poliuretaną. β-karboanhidrazė atrodo kaip itin patrauklus fermentas pramoniniuose biotechnologijos procesuose, tačiau platesnis pritaikymas yra limituojamas pačio rekombinantinio baltymo sintezės, nėra efektyvios raiškos sistemos.

Minėtoji problema galėtų būti išsprendžiama, naudojant mieles *Saccharomyces cerevisiae* arba *Pichia pastoris* kaip šeimininką heterologinių baltymų raiškai. Šių mielių naudojimas baltymų sintezėje suteikia nemažai privalumų: galima naudoti αF signalinį peptidą, kuris užtikrintų tikslinio baltymo sekreciją į užląstelinę terpę, greitas ląstelių augimas - per trumpą laiką pasiekiamas užsibrėžtas ląstelių tankis, neturi pirogenų, galimybė naudoti tiek episominius, tiek integratyvinius raiškos vektorius bei yra pripažintos kaip GRAS organizmas. Todėl šio tyrimo tikslas buvo įvertinti β-karboanhidrazės geno raišką bei baltymo sekreciją į užląstelinę terpę mielių *S.cerevisiase* ir *P.pastoris* sistemose.

Darbo tikslas:

Ištirti ir palyginti *Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės geno *β-cab* raišką bei β-KA baltymo sekreciją keliuose mielių *Saccharomyces* ir *Pichia* genčių kamienuose.

Darbo uždaviniai:

- įvertinti heterologinio *β-cab* geno raišką bei β-KA baltymo sekreciją mielėse *Saccharomyces cerevisiae*;
- įvertinti heterologinio *β-cab* geno raišką bei β-KA baltymo sekreciją mielėse *Pichia pastoris*.

SANTRUMPOS

AA-BAA – akrilamidas-bisakrilamidas
Amp – ampicilinas
APES – 3-aminopropiltrietoksilanas
APS – amonio persulfatas
dCTP – deoksicitozino trifosfatas
dH_2O – dejonizuotas vanduo
DTT – ditiotreitolis
EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis
EPG1 – endopoligalakturonazės signalinis peptidas
EtBr – etidžio bromidas
EtOH – etanolis
FDH – formaldehidas
FDHazė – metano rūgšties dehidrogenazė
G418 – geneticinas
GTE – gliukozės/Tris/EDTA tirpalas
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis
YEPD – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/gliukozės mitybinė terpė
YEPG – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/glicerolio mitybinė terpė
YEPGal – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/galaktozės indukcinė terpė
YEPM – mielių ekstrakto/peptono iš sojų pupelių/metanolio indukcinė terpė
YNB – mielių azoto bazė
JSA – jaučio serumo albuminas
KA – karboanhidrazė
LB terpė – Luria-Bertani terpė
MD – gliukozės/YNB/amonio sulfato mitybinė terpė
MeOH – metanolis
NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė elektroforezė
OAA – oksalo acetatas
PEG – polietilenglikolis
PEPCazė – fosfofenolpiruvato karboksilazė
PGR – polimerazinė grandininė reakcija
PMSF – fenilmetilsulfonilflouridas
p-NFA – p-nitrofenilo acetatas
PU – poliuretanas
Rnazė A/T1 – ribonukleazė A/T1
TAE – Tris/acto r./EDTA buferinis tirpalas
TE – Tris/EDTA buferinis tirpalas
TEMED – N,N,N‘,N‘-tetrametilen-1,2-diaminas
Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis
αF – αF signalinis peptidas
β-cab – β-karboanhidrazės genas

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biotechnologija

Pastarojo šimtmečio mokslo raida, naujų inovatyvių idėjų atsiradimas bei didėjantys visuomenės poreikiai stipriai prisidėjo prie įvairių mokslo šakų susiformavimo. Viena tokių buvo biotechnologijos. Ši mokslo sritis apjungė įvairias chemijos, biologijos, fizikos, biochemijos bei genetikos dogmas [1][1]. Pati biotechnologijos sąvoka reiškia gyvųjų organizmų, jų komponentų arba biologinių produktų pritaikymą naujų farmacinių, maistinių medžiagų ir kitų produktų gavyboje. Iš esmės, tai yra šaka, be kurios kasdieninis žmonių gyvenimas jau tampa sunkiai įsivaizduojamas (Verma et al., 2011). Biotechnologija per paskutiniuosius kelis dešimtmečius taip plačiai išsivystė, jog susiformavo jos skirstymas į mažesnes šakas: raudonoji, baltoji, žalioji, mėlynoji ir kt. (Matyushenko et al., 2016).

Raudonoji biotechnologija (medicininė) - procesas, kurio tikslas yra pagerinti žmonių sveikatos priežiūrą ir gydymą, naudojant organizmus, jų komponentus ar produktus (Evens ir Kaitin, 2015). Ši biotechnologijos šaka suformavo naujas gydymo galimybes, kurių pagalba pažabojamos lėtinės, mirtinos ligos, kuriami nauji diagnostikos metodai. Prie to stipriai prisidėjo antibiotikų, antimaliarinių junginių, imunoterapinių junginių bei šiuolaikinių vakcinų sukūrimas (Akhondzadeh, 2014; Gartland et al., 2013). Vienas iš ankstyvosios stadijos raudonosios biotechnologijos vystymosi pavyzdžių galėtų būti A. Flemingo 1928 m. atrastas antibiotikas penicilinas, kurį produkavo pelėsis *Penicillium notatum*. Ypač didelė antibiotiko nauda buvo jaučiama antrojo pasaulinio karo metu, kuris padėjo išgydyti įvairias bakterines infekcijas, atsiradusias po sužeidimų (Tan ir Tatsumura, 2015)

Baltoji biotechnologija (pramoninė) - gyvų organizmų ir/ar jų fragmentų, pvz. fermentų, panaudojimas, siekiant sukurti įvairius biogrįstus junginius ir medžiagas, kurie priklausomai nuo panaudojimo srities pasižymėtų geresnėmis organoleptinėmis savybėmis, galbūt būtų bioskaidūs, jų gamyba reikalautų mažiau energijos ar gamybos procesuose susidarytų mažiau šalutinių produktų. Pavyzdžiui, biotechnologiškai gaminant skruzdžių ir laktato rūgštis, yra suvartojamas mažesnis energijos kiekis, taip pasiekiama mažesnė šalutinių dujų emisija (Hermann et al., 2007; Barcelos et al., 2018; Frazzetto, 2003).

Mėlynoji biotechnologija (vandenynų) - jūros biologinių resursų panaudojimas industriniais, medicininiais ir aplinkosauginiais tikslais: ieškoma naujų farmacinių preparatų, cheminių produktų, fermentų ar kitų medžiagų bei jų taikymo būdų įvairiuose procesuose

[1] The 3rd International Conference on Biological Sciences and Biotechnology. IOP Conf Ser*: Earth Environ Sci*. 2018;130:011001

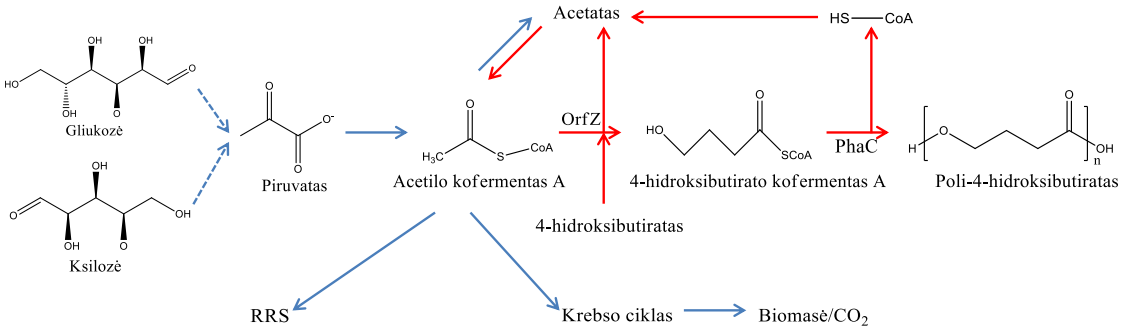
(Thakur ir Thakur, 2006). Dažnai fermentai, išskirti iš žuvų ar jūros mikroorganizmų pasižymi išreikštomis geresnėmis savybėmis nei tradiciniai fermentai, pvz., geba išlaikyti savo funkciją ekstramaliose temperatūrose bei pH. Pavyzdžiui, žuvies baltymas kolagenas išlaiko savo aktyvumą 28 °C temperatūroje, o kolagenas iš kiaulės odos – 37 °C, ir tai suteikia galimybę jį naudoti žemai temperatūrai jautriuose procesuose (Rasmussen ir Morrissey, 2007; Seneratne et al., 2006).

Žalioji biotechnologija (agro) - apibrėžiama kaip gamtai draugiškų, biologinių analogų ir metodų panaudojimas augalo, dirvožemio savybių gerinimui. Dėka žaliosios biotechnologijos atsirado galimybė auginti augalus tvariai, t.y., per padidintą fotosintezės aktyvumą, anglies sekvestraciją bei sumažintą cheminių trąšų naudojimą. Pavyzdžiui, kiekvienais metais apie 120 mln. tonų azoto yra fiksuojama cheminių procesų dėka, net 80 % šio fiksuoto azoto yra panaudojama kaip trąšų šaltinis žemės ūkyje, tačiau tik maža dalis jo yra įsisavinama. Didžioji dalis azoto, net apie 66 %, prarandama per azoto oksido formas, kurios taip pat prisideda prie šiltnamio efekto susidarymo, ar per tirpius nitratus, kurie patenka į gruntinius vandenis. Galima išeitis - pasitelkus biotechnologinius įrankius sukurti augalus, kuriems azoto trąšų poreikis būtų mažesnis (Yevale et al., 2018; Yashveer et al., 2014; Rogers ir Oldroyd, 2014).

Kaip minėta anksčiau, fermentai yra plačiai pritaikomi įvairių procesų spektre, ne išimtis ir polimerų sintezė. Fermentų katalizuojamos reakcijos pasižymi aukštu enantioselektyvumu, regioselektyvumu, stereoselektyvumu bei chemoselektyvumu. Šie selektyvumai lemia, kad fermentinio proceso metu yra gaunama tiksliai apibrėžta sintetinamo polimero struktūra skirtingai nei įprastos cheminės sintezės būdu. Fermentinė reakcija vyksta švelniomis sąlygomis, nėra naudojami toksiški reagentai ir tai stipriai prisideda prie tvarumo užtikrinimo bei mažesnio iškastinių išteklių naudojimo (Kadokawa ir Kobayashi, 2010). Be to, fermentų pritaikomumas polimerų sintezėje yra neatsiejamas ir nuo plataus jų katalizuojamų reakcijų spektro, nuo oksidacijos-redukcijos iki cheminių grupių perkėlimo iš vieno junginio į kitą (Zavada et al., 2016).

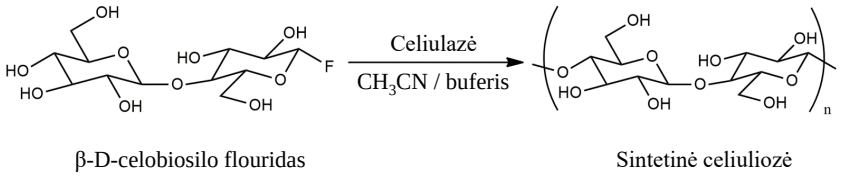
Fermentinė polimerizacija gali būti skirstoma į dvi grupes:

i) **Polimerizacija *in vivo***. Šiuo atveju, yra naudojami organizmai, kurie gamina tam tikrą polimerą, naudodami specifinius substratus. Kaip pavyzdys galėtų būti *E.coli* bakterijų vykdoma polimero poli-4-hidroksibutirato (**1.1 pav.**) sintezė, naudojant ksilozę, kaip substratą ląstelių augimui, bei poli-4-hidrobutirato prekursorių natrio 4-hidroksibutiratą (Le Meur et al., 2013).



1.1 pav. Hipotetinis poli-4-hidroksibutirato sintezės kelias iš natrio 4-hidroksibutirato *E.coli*. Rodyklių raudona spalva žymi poli-4-hidroksibutirato akumuliacijos fazę, mėlyna spalva žymi augimo fazę. RRS – riebalų rūgščių sintezė; OrfZ – 4-hidroksibutirato kofermento A transferazė; PhaC – polihidroksialkanoato sintazė (adaptuota pagal Le Meur et al., 2013)

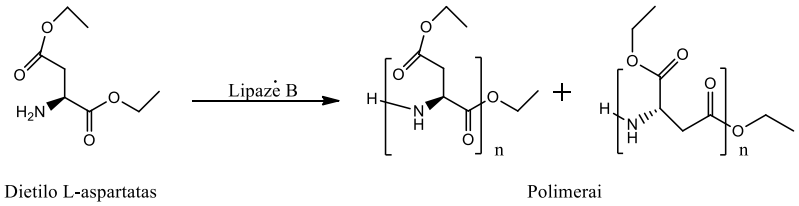
ii)**Polimerizacija *in vitro***. Pastaruoju atveju, fermentai yra išskiriami iš mikroorganizmų, tokių kaip bakterijos, mielės bei patalpinami į organinę-substratinę terpę, siekiant vykdyti katalizinę reakciją. Pavyzdžiui, fermentas celiulazė išskirtas iš *Trichoderma viride* katalizuoja celiuliozės sintezę (**1.2 pav.**) (Kobayashi, 2005).



1.2 pav. Sintetinės celiuliozės sintezės schema (adaptuota pagal Kobayashi, 2005)

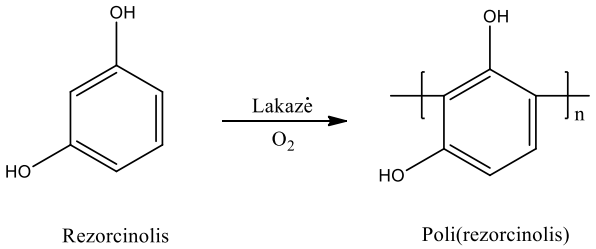
Nors gamtoje yra aptinkamos septynios skirtingos fermentų klasės, tačiau tik trys iš jų gali vykdyti polimerizaciją *in vitro* t.y., oksidoreduktazės, transferazės bei hidrolazės (Kadokawa ir Kobayashi, 2010).

- *Hidrolazės* yra plačiausiai naudojama fermentų klasė pasaulyje. Dažniausiai šios klasės fermentai katalizuoja hidrolizę, tačiau dėl jų plataus specifiškumo ir galimybes vykdyti kitokias reakcijas, yra naudojami ir įvairių polimerų, polisacharidų, poliesterių sintezėje (pvz., fermentai lipazė, glikozidazė, kt.). Konkretus pavyzdys galėtų būti dietilo aspartato polimerizacija, kurią katalizuoja lipazė B iš *Candida antarctica* (**1.3 pav.**) (Kobayashi ir Uyama, 2019).



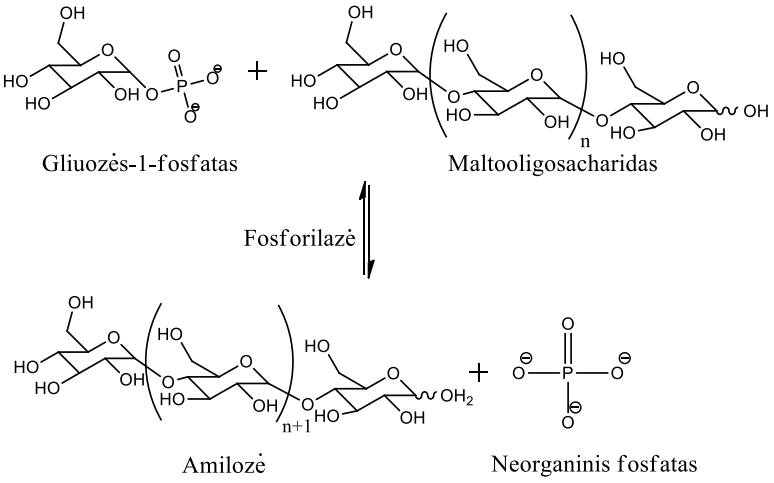
1.3 pav. Lipazės B katalizuojama dietilo L-aspartato polimerizacija (adaptuota pagal Kobayashi ir Uyama, 2019)

- Antra pagal dydį fermentų klasė savo svarba rinkoje yra *oksidoreduktazės*. Šie fermentai vykdo oksidacijos bei redukcijos reakcijas. Oksidoreduktazės itin gerai katalizuoja fenolinių junginių, aromatinių aminų oksidaciją, kurie inicijuoja polimerizaciją (**1.4 pav.)** Labiausiai polimerų sintezėje tyrinėjami fermentai yra lakazė bei peroksidazė (Uyama, 2019; Attieh, 2016).



1.4 pav. Rezorcinolio polimerizacija vykdoma lakazės (adaptuota pagal Sun et al., 2013)

- *Transferazės* - vykdo įvairių cheminių grupių pernešą nuo vieno junginio ant kito. Svarbiausi fermentai polimerų, tokių kaip poliesterių, polisacharidų, poliizopropeno sintezėje yra poliesterio sintazė, transgliutaminazė bei fosforilazė. Kaip konkretus pavyzdys galėtų būti fosforilazės panaudojimas, siekiant susintetinti amilozę iš substratų maltooligosacharido bei gliukozės-1-fosfatas (**1.5 pav.**) (Kadokawa, 2012; Van der Vlist ir Loos, 1970).

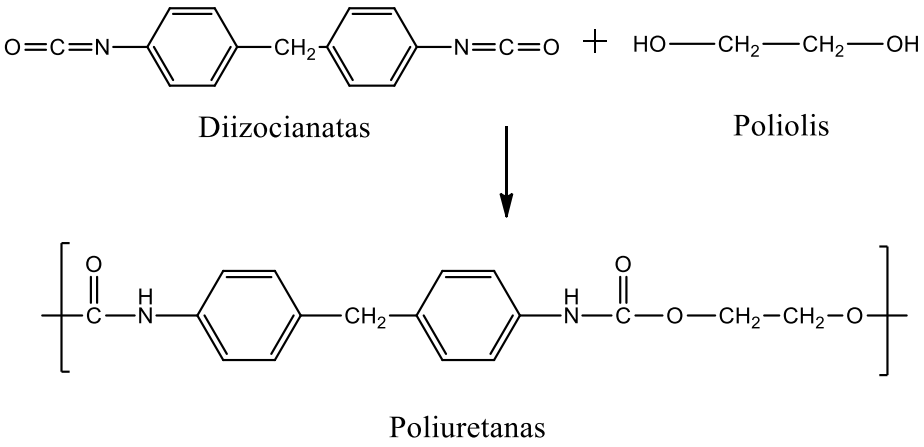


1.5 pav. Amilozės sintezės schema, vykdoma fermento fosforilazės (adaptuota pagal Nishimura ir Akiyoshi, 2016)

Nors pradėta taikyti fermentinė polimerizacija per pastarąjį dvidešimtmetį stipriai praplėtė polimerų sintezės galimybes, tačiau šiuo metu tik maža dalis polimerų gali būti susintetinami biotechnologinių metodų pagalba (Kobayshi, 2007). Pavyzdžiui, poliuretano (PU) sintezei niekada nebuvo pritaikyti fermentai.

1.2 Poliuretanas (PU)

Pirmą kartą poliuretaną susintetino O. Bayer 1930 m. Farbene-Leverkuzene iš alifatinio diizocianto bei glikolio (**1.6 pav.**). Jau 1945-1947 m. šis polimeras tapo komerciškai prieinamas ir buvo naudojamas elastomerų bei klijų gamyboje.



1.6 pav. Poliuretano sintezės schema (adaptuota pagal Akindoyo et al., 2016)

Dar po dešimtmečio buvo sukurtas lanksčiomis, kietomis savybėmis pasižymintis PU. Nuo šio laikotarpio PU pritaikymas sparčiai augo ir apėmė daugelį sričių - medicinos, automobilių, baldų, dažų pramonės šakas bei kt. (Brilhante, 2008). Be to, PU pasižymi ir puikiomis savybėmis, kurios daro jį dar patrauklesnį skirtingoms pramonės sritims (Reisch, 1990), nes:

- neturi aplinkai žalingų lakiųjų junginių;
- išsiskiria didele tempiamąja jėga bei aukšta lydymosi temperatūra;
- pasižymi puikiomis adhezinėmis savybėmis daugelio medžiagų atžvilgiu;
- nėra skaidomas vandens, aliejų bei įvairių tirpiklių.
- PU (porolonas) yra lankstesnis bei mažesnio tankumo nei anksčiau naudoti polimerai automobilių detalių gamyboje.

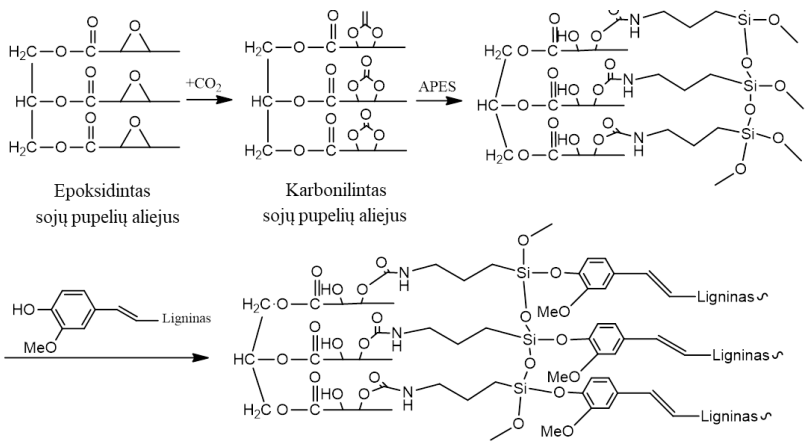
Pastaruoju laikotarpiu vėl pradedama gilintis į mechanines, fiziologines, chemines PU savybes bei galimas biologines žaliavas, siekiant dar išplėsti jo pritaikymo ribas. Reikšmingi tyrimai atliekami gamybos procesuose, keičiant pradines žaliavas, jų gamybos procesų parametrus ar tiesiog ieškant alternatyvių sintezės būdų (Akindoyo et al., 2016). Iš esmės PU struktūra bei savybės priklauso ne tik nuo pradinės žaliavos, bet ir nuo polimerizacijos metodo, fazių atskyrimo laipsnio, morfologijos, kristalizacijos laipsnio, vandenilinių ryšių skaičiaus bei kitų sudėtinių komponentų, pateiktų **1.1. lentelėje** (Jiang et al., 2018).

1.1. Lentelė. Svarbiausi PU sintezės komponentai bei jų naudojimo priežastys (adaptuota pagal Akindoyo et al., 2016)

Komponentai	Naudojimo priežastis
Izocianatas	Atsakingas už PU reaktyvumą bei kietėjimo savybes
Polioliai	Reikalingi minkštų elastinių PU produkcijai
Katalizatoriai	Pagreitina reakciją tarp poliolių ir izocianato bei leidžia reakcijai vykti žemoje temperatūroje
Plastifikatoriai	Sumažina medžiagos kietumą
Pigmentai	Leidžia pagaminti spalvotas PU medžiagas
Grandinės prailgintojai	Leidžia atlikti PU molekulės struktūrines modifikacijas bei užtikrina mechaninį stabilumą
Užpildo medžiagos	Sumažina gamybos kaštus bei pagerina tokias medžiagos savybes kaip standumas, tempiamoji jėga
Surfaktantai	Reikalingi PU putų gamybai, kontroliuoja burbuliukų susidarymą bei putų struktūrą sintezės metu
Antipirenai	Sumažina medžiagos degumą
Dūminimo slopikliai	Sumažina išskiriamų dūmų kiekį PU degimo metu

Vienas pagrindinių PU sintezės komponentų - izocianatas. Paprastai, izocianatai yra skirstomi į bifunkcininius ir heterofunkcinius ar aromatinius ir alifatinius. Dažniausiai PU sintezėje yra naudojami metileno difenilo, tolueno arba 1,6-heksametileno diizocianatai. Izocianatas yra vienas iš dviejų pagrindinių PU sintezėje naudojamų komponentų, tačiau pastaruoju metu vis didėja susirūpinimas dėl šio junginio toksiškumo bei galimos neigiamos įtakas gamtai bei žmogui, todėl ieškoma naujų alternatyvių beizocianatinių PU sintezės būdų, kurių mokslinėje literatūroje jau yra pateikiama (Akindoyo et al., 2016).

Viena galimų alternatyvų yra tvaraus PU gamyba iš karboninto sojų pupelių aliejaus, 3-aminopropiltrietoksilano (APES) ir lignino. Šiuo atveju, beizociantinis kelias apimtų reakciją tarp ciklinto karbonato su aminais (APES), kurios metu susidaro uretano monomerai. Toliau vyksta šių monomerų polimerizacija su ligninu bei gaunamas tvarus poliuretanas. Atlikti tyrimai parodė, jog naudojant šį sintezės metodą galima efektyviai gauti neizociantinį poliuretaną, kuris pasižymėtų tiek elastinėmis, tiek kietosiomis savybėmis. Minimos savybės priklauso nuo naudojamo lignino kiekio bei proceso temperatūros. Be to, panaudotos biomasės kiekis poliuretano gamyboje siekia 85 % (**1.7 pav.**) (Akindoyo et al., 2016; Xu ir Ferdosian, 2017).



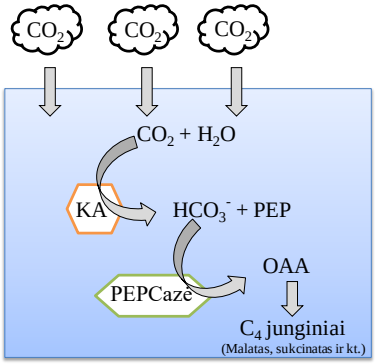
1.7 pav. Beizocianatinio poliuretano sintezės schema (adaptuota pagal Xu ir Ferdosian, 2017)

Kartais PU sintezės procesuose yra naudojamas ir suslėgtas atmosferinis anglies dvideginis. Šis junginys yra svarbus epoksidų karbonilinimui. Deja, dar efektyvesnis CO_2 panaudojimas yra ribojamas jo fiksacijos metodų. Dabartiniai CO_2 fiksacijos metodai t.y., absorbcija į daleles ar skysčius, mineralinė karbonizacija, slėgio kaupimas, yra neefektyvūs, reikalinga ekstremali cheminė aplinka, aukšta temperatūra (Boone et al., 2013). Todėl akivaizdu, jog yra būtina alternatyvi sistema CO_2 fiksacijai, kartu tiesiogiai apjungiant ir poliuretano gamybą.

Įdomi alternatyva ankstesnėje pastraipoje minėtiems CO_2 taikymo PU sintezei būdams, yra gamtai draugiškas, nebrangus, selektyvus biomimetinis CO_2 sekvestravimo agentas - metano rūgšties dehidrogenazė (FDHazė) iš *Candida boidinii*. FDHazė efektyviai katalizuoja grįžtamąją metano rūgšties dehidrataciją per NAD^+ regeneraciją. Gautas grynas CO_2 kaip šalutinis produktas toliau naudojamas redukciniame keto rūgščių amininime, siekiant gauti sintetines amino rūgštis. Taip pat buvo manyta, jog šį fermentą įmanoma pritaikyti CO_2 fiksacijoje. Deja, vėliau nustatyta, kad metano rūgšties dehidrogenazė beveik neaktyvi reversinėje reakcijoje (Beller ir Bornscheuer, 2014).

Kita alternatyva yra fermentų karboanhidrazių (KA) (EC 4.2.1.1) panaudojimas. KA yra metalo fermentas, kuris katalizuoja grįžtamąją CO_2 hidratacijos reakciją. Taip pat nustatyta, jog tam tikros šeimos KA gali katalizuoti ir įvairių aldehidų dehidratacija bei esterių hidrolizę. Pastaruoju metu, KA tampa lyderiaujančiu kandidatu CO_2 sekvestracijoje, nes pats procesas iš esmės nėra brangus, fermentas gali būti naudojamas daug kartų, jis yra aktyvus drastiškomis reakcijų sąlygomis (Boone et al., 2013; Ozdemir, 2009).

Žinoma, karboanhidrazę galima apjungti į sistemas su kitais fermentais, kurios imituotų tam tikras jau egzistuojančias biologines sistemas. Pavyzdžiui, naudoti KA kombinacijoje su fosfofenolpiruvato karboksilaze ar imobilizuoti kartu su ureaze. Abiem atvejais, KA katalizuotų CO_2 hidratacijos reakciją. Urezės sistemoje, urezė atliktų karbamido hidrolizę ir kaip šalutinis produktas susidarytų CO_2, kuris būtų fiksuojamas karboanhidrazės. Vėliau pridėjus $CaCl_2$ susidarytų $CaCO_3$. Kalbant apie fosfofenolpiruvato karboksilazės (PEPCazės) sistemą, karboksilazė panaudotų karboanhidrazės fiksuotą CO_2, vandenilio karbonato formoje, tolimesnei oksoloacetato (OAA) sintezei (**1.8 pav.**) (Castro et al., 2016; Chang et al., 2013).



1.8 pav. CO_2 fiksacijos ir įsisavinimo schema, pagrįsta fermentinės sistemos naudojimu, kurią sudaro KA ir PEPCazė (adaptuota pagal Chang et al., 2013)

1.3 Karboanhidrazės

Karboanhidrazės (KA, *EC* 4.2.1.1.) yra plačiai gamtoje paplitusi metalo fermentų klasė, aptinkama tokiuose organizmuose kaip žmogus, augalai, mielės, pirmuonys, diatomės bei bakterijos. Nuo 1932 m., kai Brinkman ir jo kolegos aptikto pirmąją KA eritrocituose, yra identifikuotos 8 genetiškai skirtingos karboanhidrazių šeimos: α-KA, β-KA, γ- KA, δ-KA, ζ-KA, η-KA, ɵ-KA, ι-KA. Šios šeimos tarpusavyje skiriasi kataliziniu kompleksu (**1.2 lentelė**) bei tretine aminorūgščių struktūra (Jensen et al., 2019; Supuran ir Capasso, 2017).

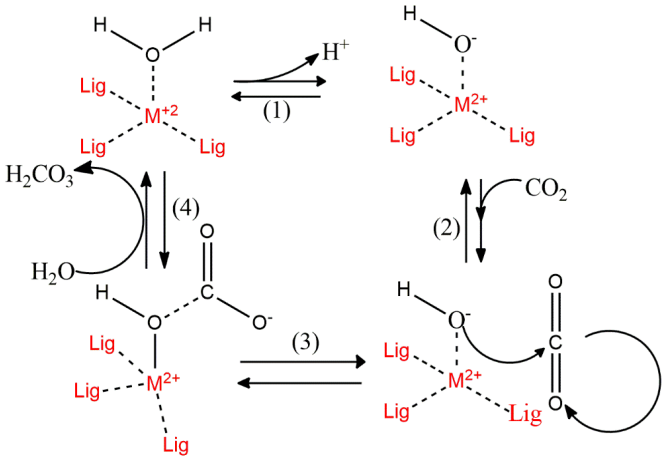
1.2 lentelė. Karboanhidrazių aktyviojo centro struktūros ypatumai (adaptuota pagal Jensen et al., 2019; Supuran ir Capasso, 2017; Supuran, 2016)

KA šeimos	Metalai aktyviajame centre	Ligandai
α-KA	Zn^{+2}	His, His, His
β-KA	Zn^{+2}	His, Cys, Cys
γ-KA	Fe^{+2}; Zn^{+2}; Co^{+2}	His, His, His
δ-KA	Zn^{+2}	His, His, His
ζ-KA	Cd^{+2}; Zn^{+2}; Co^{+2}	His, Cys, Cys
η-KA	Zn^{+2}	His, His, Gly
ɵ-KA	Zn^{2+}	His, His, His
ι-KA	Mn^{2+}	-

Nors karboanhidrazės turi esminių skirtumų anksčiau minėtose struktūrose, tačiau visos jos katalizuoja tą pačią grįžtamąją CO_2 hidratacijos/dehidratacijos reakciją (**1.9 pav.**) (Escudero-Almanza et al., 2012), kurios mechanizmas susideda iš keturių etapų:

- I etape vyksta vandens deprotonizacija. Aktyviajame centre esantis metalas sąveikaudamas su vandens molekule sumažina jos pKa nuo 15,7 iki 7,0. Toks pKa pokytis lemia vandens deprotonizaciją bei hidroksido jono sugeneravimą.
- II etape vyksta CO_2 sąveika su fermento aktyviuoju centru, taip CO_2 orientuojamas tiksliai erdvėje, vėlesnei reakcijai su OH^-.

- III etape hidroksido jonas nukleofiliškai atakuoja anglies dvideginio karbonilo grupę bei susidaro bikarbonato jonas.
- IV etape vyksta bikarbonato jono pakeitimas vandeniu. Katalizinis centras yra regeneruojamas, kai yra atlaisvinamas HCO^-_3 bei vyksta kitos vandens molekules prisijungimas.



1.9 pav. KA katalizuojamas CO_2 hidratacijos reakcijos mechanizmas (pagal Shekh et al., 2011)

Įdomu, jog katalizuojamos hidratacijos reakcijos greitis yra nevienodas tarp skirtingų bei tų pačių KA šeimų, egzistuojančių skirtinguose šeimininkuose. Iš pradžių manyta, jog aktyviausias identifikuotas fermentas buvo žmogaus eritrocitų α-KA II, kuri pasižymėjo k_{cat} = $1{,}40\times10^6$ s^{-1}. Tačiau 2012 m. buvo nustatyta nauja termofilinės bakterijos *Sulfurihydrogenibium azorense* karboanhidrazė, kurios aktyvumas buvo net 2,5 karto didesnis, t.y. $k_{cat}= 4{,}40\times10^6$ s^{-1}. Toks aktyvumo skirtumas sudomino ne tik mokslininkų grupes, bet ir pasirodė labai patrauklus pramonės atstovams, kurie jau seniai siekė įdiegti KA pramoniniuose procesuose. Dėl šių priežasčių, šiuo metu, yra didinamos investicijos su tikslu atlikti platesnius bakterinių karboanhidrazių tyrimus bei įvertinti pritaikomumo galimybes (Supuran ir Capasso, 2017; Vullo et al., 2012; De Simone et al., 2015).

Remiantis naujausiais moksliniais duomenimis, bakterijose yra aptinkamos trys karbaonhidrazių šeimos: α-KA, β-KA ir γ-KA. Taip pat atlikus bakterijų genomo analizę buvo pastebėtas neįprastas bruožas, susijęs su KA pasiskirstymu, t.y. vienose bakterijose buvo aptikta tik vienos šeimos KA, antrose buvo nustatytos dvi KA šeimos, o trečiose ir visos trys KA šeimos (**1.3 lentelė**). Manoma, jog toks šeimų pasiskirstymas yra susijęs su bakterijų struktūriniais ypatumais bei gyvenamąja aplinka (Supuran ir Capasso, 2015).

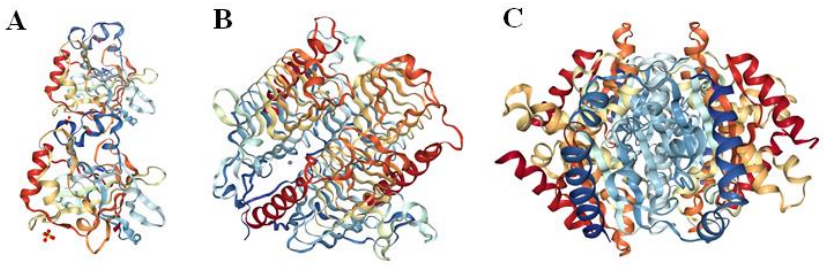
1.3 lentelė. KA pasiskirstymas gramteigiamose ir gramneigiamose bakterijose (adaptuota pagal Supuran ir Capasso, 2015)

	Bakterijų rūšis	Karboanhidrazių šeima		
Gramneigiamos bakterijos	*Neisseria gonorrhoeae*	α	-	-
	Helicobacter pylori	α	β	γ
	Escherichia coli	-	β	γ
	Haemophilus influenzae	-	β	-
	Brucella suis	-	β	γ
	Vibrio cholerae	α	β	γ
Gramteigiamos bakterijos	*Mycobacterium tuberculosis*	-	β	γ
	Clostridium perfringens	-	β	γ
	Bacillus subtilis	-	β	γ
	Staphylococcus aureus	-	-	γ

Pažymėtina, jog α-KA yra paplitusios tik tarp gramneigiamų bakterijų. Dauguma tyrėjų grupių tai sieja su periplazminio tinklo buvimu, kuris kaip barjeras ne tik apsaugo nuo galimo aplinkos poveikio, bet ir riboja įvairių medžiagų patekimą į ląstelės vidų. Kadangi spontaninė CO_2 difuzija vyksta gan neefektyviai ir netenkina metabolinių procesų poreikio ribojančiose augimo sąlygose, manoma, jog evoliucijos eigoje bakterijos prisitaikė ir evoliucionavo. Tai siejama su pirmykštės karboanhidrazės sekos pakeitimais N-terminaliniame geno gale. Buvo suformuota sekrecinio signalinio peptido seka, reikalinga baltymo sekrecijai į periplazminę ertmę. Manoma, kad taip susiformavo nauja bakterinių karboanhidrazių klasė - α-KAės, lokalizuotos sekreciniame kompartmente, t.y. periplazminiame tinkle. Kita vertus, ne visos gramneigiamos bakterijos turi α-karboanhidrazę. Spėjama, jog tai priklauso nuo bakterijų kolonizacijos vietos, jei aplinkos sąlygos nėra ribojančios ar turinčios neigiamą įtaką bakterijų išgyvenamumui, α-KA šioms bakterijoms tampa nebereikalinga, pakanka spontaninės CO_2 difuzijos (Supuran ir Capasso, 2015; Supuran ir Capasso, 2017).

Bakterinės β-KA, γ-KA yra lokalizuotos tiek gramteigiamų, tiek gramneigiamų bakterijų citoplazmoje, kurioje fiksuoja difundavusį CO_2, reikalingą pH homeostazei, karboksilaziniams fermentams bei kitoms viduląstelinėms funkcijoms. Tačiau visai nesenai pastebėta, jog kai kurios gramneigiamių bakterijų β ir γ karboanhidrazės, pvz., iš *Vibrio cholera, Helicobacter pylori, Streptococcus salivarius, Methanosarcina thermophile* (archėja), kaip ir α-KA, turi N-terminaliniame gale signalinę peptido seką, kuri galimai reikalinga karboanhidrazių translokacijai per citoplazminę membraną. Todėl pasiūlyta, jog ir šie fermentai, turintys signalinį peptidą, galėtų lokalizuotis periplazmėje ertmėje bei atlikti tą pačią funkciją kaip ir bakterinės α-KA (Supuran ir Capasso, 2015; Supuran ir Capasso, 2016). Kalbant apie struktūras, bakterijų *Neisseria gonorrhoeae* (**1.10 pav. A**), *Sulfurihydrogenibium*

yellowstonense, Sulfurihydrogenibium azorense ir *Thermovibrio ammonificans* α-karboanhidrazės yra vienintelės, kurių tretinė struktūra buvo nustatyta bei charakterizuota. Kristalinė analizė parodė, jog aktyvi α-KA yra monomerinės arba trimerinės struktūros. Aktyvusis centras yra lokalizuotas gilioje ertmėje, apsuptas hidrofobinių ir hidrofilinių regionų. Hidrofilinė dalis dalyvauja protonų transportavimo sistemoje, o hidrofobinė dalis yra svarbi CO_2 prisijungimui bei ligando atpažinimui. Katalizinis metalas yra cinkas, tetraedriškai apsuptas trijų histidino aminorūgščių liekanų bei hidroksido jono. Be to, termofilinių bakterijų karboanhidrazės yra termostabilios. Ši savybė yra susijusi su struktūriniais ypatumais - pasižymi didesniu antrinių struktūrų elementų bei įkrautų aminorūgščių liekanų kiekiu (De Simone et al., 2015; Supuran ir Capasso, 2017).



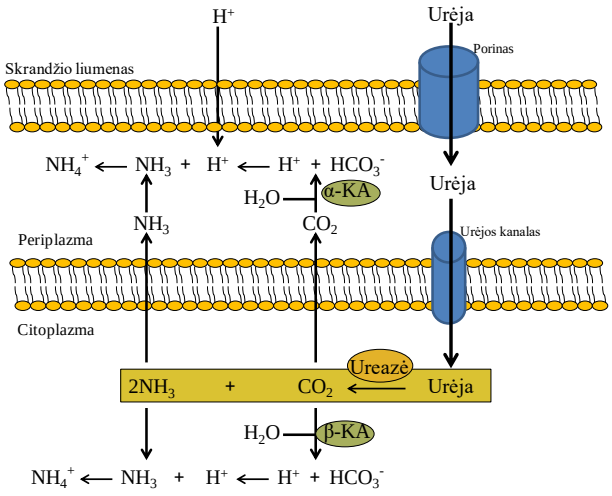
1.10 pav. Bakterinių karboanhidrazių kristalinės struktūros. (**A**) *Neisseria gonorrhoeae* α-karboanhidrazė, (**B**) *Methanosarcina thermophile* γ-karboanhidrazė, (**C**) *Escherichia coli* β-karboanhidrazė (https://www.rcsb.org/)

γ-KA yra aptinkama tiek gramteigiamose, tiek gram neigiamose bakterijose (**1.3 lentelė**). Deja, nei viena iš γ šeimos bakterinių karboanhidrazių iki šiol nėra charakterizuota, todėl šios šeimos apibūdinimui dažnai remiamasi archėjų *Methanosarcina thermophile* γ-KA kristaline struktūra (**1.10 pav. B**). Šis fermentas akyvus kaip homotrimeras, kuriame yra trys aktyvieji centrai, kiekvienas centrų lokalizuotas tarp dviejų monomerų. Aktyviajame centre dažniausiai aptinkamas cinko jonas, tačiau kartais nustatomas ir geležies jonas. Kaip ir α-KA atveju, taip ir γ-KA tetraedrinėje struktūroje yra trys katalitinės histidino aminorūgščių liekanos. Be minėtosios triados, γ-KA aktyviajame centre dėl savo svarbos yra išskiriama glutamo rūgšties liekana, kuri veikia kaip protonų šaudyklė (Kisker et al., 1996; Supuran ir Capasso, 2017).

Be anksčiau aukščiau paminėtų charakterizuotų α-KA ir γ-KA, tyrėjų grupės yra charakterizavusios ir keletą bakterinių β-KA kristalinių struktūrų iš tokių organizmų kaip *Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella enterica* bei *Vibrio cholera*. Visų šių mikroorganizmų β-KA erdvinis susilankstymas yra konservatyvus (**1.10 pav. C**) Pastebėta, jog kristalizuotos β-KA yra aktyvios kaip dimerai ar tetramerai, su dvejais arba keturiais identiškais aktyviaisiais centrais. Aktyvusis centras yra

lyg ilgas kanalas, kurio apačioje yra cinko jonas, tetraedriškai apsuptas dviejų cisteinų, histidino bei vienos asparto aminorūgšties liekanų. Šios šeimos vienas iš išskirtinių bruožų yra aktyvumo priklausomybė nuo pH. Kuomet pH reikšmė yra žemesnė nei 8,3, aktyviajame centre esanti asparto aminorūgšties liekana formuoja uždarą aktyviojo centro būseną, tačiau pasiekus didesnę nei 8,3 pH reikšmę, vyksta aspartato rūgšties patraukimas iš aktyviojo centro, tuo pat metu koordinuojant ir artėjančią vandens molekulę prie metalo jono. Tokie įvykę pokyčiai lemia susidariusią atvirą aktyviojo centro būseną (Ferraroni et al., 2015; Supuran ir Capasso, 2017).

Per pastaruosius keletą metų buvo sukaupta daug žinių apie bakterinių KA atliekamas funkcijas. Atlikti įvairūs tyrimai parodė, jog KA aktyvumas yra svarbus bakterijų metaboliniams procesams, pH homeostazei, įvairių fiziologinių funkcijų palaikymui bei išgyvenamumui. Pavyzdžiui, *Helicobacter pylori* augimas rūgštinėje skrandžio floroje yra susijęs su specifiniu adaptaciniu mechanizmu (**1.11 pav**.). Šiame mechanizme svarbiausias funkcijas atlieka du fermentai: urezė bei karboanhidrazės. Iš rūgštinės aplinkos, t.y., skrandžio į ląstelės citoplazmą patenka karbamidas. Tuomet yra vykdoma šio junginio hidrolizė, kurią katalizuoja urezė, ir kaip produktai susidaro NH_3 bei CO_2. Tolimesniame etape yra naudojama β-karboanhidrazė, kuri citoplazmoje vykdo dalies CO_2 hidrataciją. Kita dalis CO_2 difunduojasi į periplazmą, kurioje jau tą pačią hidratacijos reakciją katalizuoja α-KA. Hidratacijos proceso metu susidaro HCO_3^- bei H^+ jonai, o pastarasis dar naudojamas NH_4^+ suformavime, taip reguliuojant bakterijų citoplazmos bei periplazmos pH. Tampa akivaizdu, jog šiuose procesuose dalyvaujantys fermentai svarbūs patekusių rūgščių neutralizavimui bei buferinės aplinkos palaikymui (Bury-Mone et al., 2008; Capasso ir Supuran 2015).



1.11 pav. *Helicobacter pylori* specifinis adaptacinis,mechanizmas skirtas bakterijų išgyvenamumui skrandžio floroje (adaptuota pagal Supuran ir Capasso, 2015)

Karboanhidrazės svarba buvo nustatyta ir bakterijose *E.coli*. Bakterijos savo genome turi tam tikrą cyn operoną, kuriame yra koduojami 3 genai: *cynT* (koduoja karboanhidrazę), *cynS* (koduoja cianazę) bei *cynX* (koduoja nežinomą baltymą). Baltymas cianazė katalizuoja cianatų skaidymą, naudojant bikarbonatą. Šio proceso metu kaip šalutinis produktas susidaro CO_2. Neegzistuojant jokiam fiksacijos būdui, dėl difuzijos ląstelės prarastų dalį CO_2. Kadangi CO_2 yra svarbus ir bikarbonato susidaryme, mažėtų ir pastarojo kiekis ląstelėse, sutriktų ir cianazes veikla bei kiti procesai. Šiuo atveju, *E.coli* yra prisitaikiusi, ji naudoja karboanhidrazę, kuri fiksuoja CO_2, konvertuoja į bikarbonatą ir kompensuoja jo poreikį (Guilloton et al., 1993).

1.4 β-KA raiškos sistemos

Kalbant apie fermentų taikymą, dažnai užmirštame apie esminius faktorius, kurie iki šiol riboja jų efektyvų pritaikymą pramoniniuose procesuose. Vienas tokių yra fermentų stabilumas. Nestabilūs baltymai, praradę savo specifinį aktyvumą, neatlieka katalizuojamos reakcijos. Antrasis, natūraliai gamtoje baltymai yra produkuojami mažais kiekiais, pakankamais tik šeimininko-mikroorganizmo reikmėms patenkinti. Iš esmės natūraliai produkuojamo baltymo išeiga yra per maža pramoniniams procesams (Gianfreda ir Scarfi, 1991; Ferrer-Miralles et al., 2015). Todėl pastaruoju laikotarpiu intensyviai yra tiriamos įvairios raiškos sistemos, kurios pilnai patenkintų produkuojamų fermentų kiekio bei savybių poreikius pramonėje (Tagliavia ir Nicosia, 2019). Ne išimtis yra ir šiame darbe pirmą kartą tiriamos *Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės geno raiškos sistemos.

1.4.1 KA raiška bakterinėse heterologinių baltymų raiškos sistemose

Dažniausiai baltymų raiškos tyrimuose yra naudojamos sistemos *Escherichia coli* bakterijose dėl unikalių ir mokslininkų pageidaujamų *E.coli* savybių rinkinio: greita augimo kinetika ir pasiekiamas didelis ląstelių tankis, naudojami mitybinių terpių komponentai yra pigūs, *E.coli* lengva transformuoti su egzogenine DNR (Jo et al., 2015). Ne išimtis tapo ir β-karboanhidrazės, kurių produkcijai buvo pritaikytos *E.coli* raiškos sistemos (**1.3 lentelė**). Pavyzdžiui, *Enterobacter sp.* β-KA baltymo gamybos išeiga buvo pasiekta 2,4 mg/mL (Eminoğlu et al., 2016). Atrodytų, jog heterologinių baltymų raiška *E.coli* sistemose yra vienas geriausių galimų variantų, kurie patenkintų poreikius pramonėje. Deja, *E.coli* nėra pripažintas kaip GRAS organizmas, todėl ši bakterinė sistema tinka tik tiriamiesiems tikslams ar pradiniams technologijų komercializavimo etapams (Gomes et al., 2016).

1.3 lentelė β-KA raiškos sistemos

Šeimininkas	Raiškos organizmas	Raiškos kamienas	Išeiga	Šaltinis
Clostridium autoethanogenum	*E.coli*	BL21(DE3)pLysS ir EDCM636	-	Pander et al., 2019
Bacillus sp. SS105		BL21(DE3)	1449 U/mg	Maheshwari et al., 2019
Malassezia restricta		BL21(DE3)	1 mg/mL	Del Prete et al., 2019
Thiomicrospira crunogena		BL21(DE3)	-	Dobrinski et al., 2010
Helicobacter pylori		BL21(DE3)	-	Chirica et al., 2002
Enterobacter sp. B13		BL21(DE3)pLysS	0,04 – 2,4 mg/mL	Eminoğlu et al., 2016
Azospirullum brasilence		BL21λ(DE3)pLysS	-	Kaur et al., 2009
Candida albicans		Rossetta(DE3)	-	Teng et al., 2009

1.4.2 KA heterologinės raiškos sistemos mielėse

Kadangi *E.coli* nėra GRAS organizmas tai skatina ir toliau tyrinėti bei ieškoti alternatyvių sistemų, kurios užtikrintų, ne tik aktyvios būsenos β-karboanhidrazės baltymo produkciją, bet ir sąlygotų aukštą išeigą. Deja, nors tyrimai vyksta intensyviai, tačiau kol kas nei viena mokslininkų grupė nepateikia galimų alternatyvių variantų, efektyviai minėtojo baltymo raiškai. Kaip išeitis galėtų būti įvairios eukariotinės raiškos sistemos, kurios puikiai pritaikomos plačiam prokariotinių baltymų spektrui. Vienos tokių yra mielių *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis, Pichia (Komagataella) pastoris* raiškos sistemos (Adivitiya et al., 2017).

Geriausiai ištirtos yra mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemos. Skirtingai nei anksčiau minėtos bakterijos *E.coli,* mielės *S.cerevisiae* toleruoja platų pH intervalą, aukštas etanolio, įvairių cukrų koncentracijas, yra atsparios osmosiniam slėgio spaudimui, gali vykdyti baltymų glikozilinimą, turi αF signalinį peptidą, kuris užtikrina baltymo sekreciją į užląstelinę terpę, neturi pirogenų bei yra pripažintos kaip GRAS organizmas. Mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemos dažnai naudojamos genų raiškos reguliacijos, įvairių signalų perdavimo, senėjimo, metabolizmo, ląstelių ciklo kontrolės, užprogramuotos ląstelių mirties, autofagijos tyrimuose (Baghban et al., 2019; Celik ir Calık; 2012). Be to, genetinės, fiziologinės, fermentavimo žinios apie *S.cerevisa*e suteikia galimybę ne tik tirti įvairias biologines sistemas ir jų kelius, bet ir produkuoti rekombinatinius baltymus, tokius kaip hirudiną, insuliną, glukagoną, urato oksidazę (Baghban et al., 2019; Nielsen, 2013). Pavyzdžiui, naudojama *S.cerevisiae* raiškos sistema užtikrina *Trametes versicolar* lakazės

geno raišką ir yra pasiekiama 210 mg/L baltymo išeiga (Iimura et al., 2018). Tačiau, šių mielių raiškos sistemos taip pat susiduria su trūkumais, pvz., kai kurių produkuojamų baltymų išeiga yra gana maža. Be to, produkuojami heterologiniai baltymai yra hiperglikozilinti, taip ribojama jų sekreciją į užląstelinę terpę, sumažėja arba prarandamas specifinis aktyvumas (Swinkels et al., 1993). Dar vienas trūkumas yra susijęs su *S.cerevisiae* transformacijoje naudojamais episominiais raiškos vektoriais. Dažnai episominės plazmidės yra nestabilios, transformuotos mielės jas praranda, taip nukenčia produkuojamo baltymo išeiga (Baghban et al., 2019).

Kitos, rečiau taikomos mielių raiškos sistemos - *K.lactis*. Pirmą kartą, *K.lactis* raiškos sistema buvo panaudota jaučio chimozino produkcijoje (Vieira Gomes et al., 2018). Dabar skaičiuojama, jog ši sistema apima mažiausiai 100 baltymų produkciją, tokių kaip *Arabidopsis thaliana* glioksilato reduktazė, pasiekta išeiga 2 g/L, *Candida antartica* lipazė A - išeiga 230 mg/L, *Lactobacillus sakei* sakazinas A - išeiga 23 mg/L, kurie dažnai naudojami maisto bei farmacijos pramonėje (Chuzel et al., 2017; Spohner et al., 2016). Panašiai kaip ir prieš tai minėtos mielės *S. cerevisiae, K.lactis* pasižymi pramoniniams procesams patraukliomis savybėmis: neturi pirogenų, yra GRAS organizmas, galima užtikrinti baltymų sekreciją į užląstelinę terpę, naudojant signalinius αF arba endopoligalakturonazės (*angl.* endopolygalacturonase, EPG1) peptidus. Be to, skirtingai nei *S.cerevisiae,* pasižymi kontroliuojamu baltymų glikozilinimu, gali metabolizuoti pigius laktozės, išrūgų substratus bei turi potencialą vykdyti didelės molekulinės masės baltymų sekreciją į užląstelinę terpę (Šiekštelė et al., 2015; Adivitiya et al., 2017; Spohner et al., 2016).

Kaip ir prieš tai minėtosios mielių raiškos sistemos, taip pat ir *P.pastoris* raiškos sistemos niekada nebuvo pritaikytos *Bacillus mojavensis* baltymo β-karboanhidrazės produkcijoje. Įdomu, jog šios sistemos atrodo kaip viena tinkamiausių baltymų raiškos platformų dėl unikalių mielių savybių: i) galima naudoti αF signalinį peptidą, kuris užtikrintų tikslinio baltymo sekreciją į užląstelinę terpę; ii) lengva atlikti genetines manipuliacijas; iii) greitas ląstelių augimas - per trumpą laiką pasiekiamas užsibrėžtas ląstelių tankis; iv) galimos įvairios post-transliacinės modifikacijos; v) siauras glikozilinimo spektras skirtingai nei mielėse *S. cerevisae*; vi) žemas šeimininko baltymų sekrecinis lygis; vii) GRAS organizmas (Weinacker et al., 2014; Daly ir Hearn, 2005; Safder et al., 2018).

Pačios mielės *P.pastoris* rekombinantinių baltymų gamyboje buvo pradėtos naudoti tik dvidešimtojo amžiaus aštuntajame dešimtmetyje, atradus stiprų, metanolio reguliuojamą *AOXI* promotorių, kuris užtikrino efektyvią baltymų raišką. Nuo šio laikotarpio, *P.pastoris* heterologinų baltymų raiškos sistemoje buvo produkuota virš 500 skirtingų baltymų,

apimančių tiek pramoninius fermentus, tiek farmacinius baltymus. Iš esmės toks dažnas sistemos naudojimas buvo susijęs su tuo, jog tiek eukariotiniai, tiek prokariotiniai baltymai buvo dažniausiai produkuojami labai efektyviai, tirpios, aktyvios būsenos, dideliais kiekiais (**1.4 lentelė**).

1.4 lentelė. *P.pastoris* raiškos sistemos bei produkuojami baltymai (adaptuota pagal Safder et al., 2018)

Naudojimo sritis	**Baltymas**	**Natūralus šeimininkas**	***P.pastoris***	**Išeiga**
Pramonė	Serino proteazė	*Trichoderma koningii*	GS115	3,20 g/L
	α-amilazė	*Bacillus licheniformis*	GS115	8,30 g/L
	Lipazė	*Yarrowiali polytica*	GS115	2,82 g/L
	Fitazė	*Peniophora lycii*	KM71	12,20 g/L
	Lakazė	*Botrytis aclada*	X33	0,49 g/L
	Celiulazė	*Trichoderma reesei*	GS115	6,55 g/L
Farmacija	Insulinas	*Homo sapiens*	GS115	2,60 g/L
	Plazmonigenas		GS115	0,50 g/L
	Angiogeninas		GS115	0,003 g/L
	ImunoglobulinasG		YGLY27431	0,22 g/L
	Interleukinas-6		X33	0,28 g/L

Be to, genetinių manipuliacijų pagalba buvo sukurti skirtingi *P.pastoris* GS115, SMD1168, SMD1168H, SuperMan5 kamienai, kurie užtikrino galimybes produkuoti žmogaus glikoproteinus, naudoti raiškos sistemas su sintetiniais promotoriais, užtikrinančiais preciziską baltymų raišką (Schwarzhans et al., 2016; Qin et al., 2011; Safder et al., 2018).

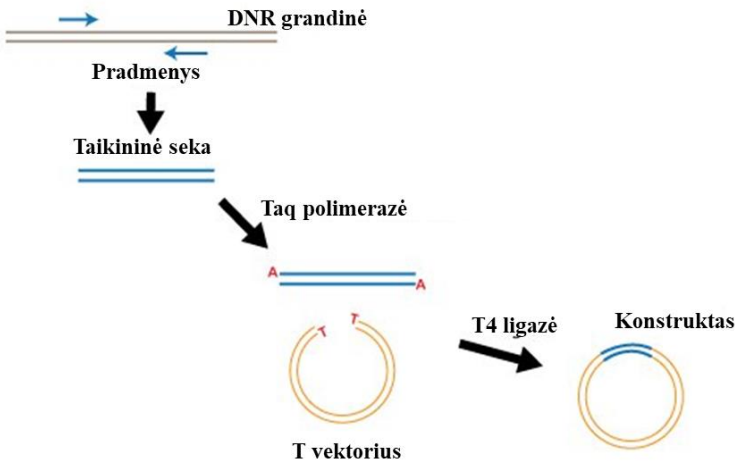
1.5 Molekuliniai klonavimo metodai

Vienas svarbiausių procesų rekombinantinių baltymų gavyboje yra raiškos sistemos komponentės - plazmidės sukonstravimas. Genetinės manipuliacijos atliekamos molekuliniais įrankiais, tokiais kaip restrikcijos endonukleazės, polimerazės, topoizomerazės, ligazės ir kt. Jų pagalba vykdomas molekulinis klonavimas, kurio metu svetimos DNR fragmentas, genas, yra įjungiamas į klonavimo vektorių ir po padauginimo virsta raiškos sistemos komponentu - raiškos vektoriumi (Ashwini et al., 2016; Khan et al., 2016). Molekulinio klonavimo metodo atsiradimas yra siejamas su bakteriniais fermentais - restrikcijos endonukleazėmis. Būtent su restriktazėmis ir buvo atlikti vieni pirmųjų molekulinio klonavimo darbų *in vitro*. Nuo šio momento molekulinio klonavimo raida sparčiais žingsniais pradėjo judėti į priekį. Buvo sukurti nauji metodai, kurie išplėtė pasirinkimo spektrą priklausomai nuo norimo tikslo, kainos, priemonių prieinamumo bei naudojimo paprastumo (Bertero et., 2017).

Dabar yra žinomi penki pagrindiniai klonavimo būdai: i) tradicinis klonavimo metodas, kuris pagrįstas restrikcijos endonukleazėmis ir ligazėmis; ii) klonavimas grandinės prailginimas (PGR) (*angl*. PCR cloning); iii) vientisas klonavimas (*angl.* seamless cloning); iv) rekombinantinis klonavimas (*angl.* recombinational cloning); v) LIC klonavimas (*angl.* ligation-independent cloning). Minėtosios metodikos yra paremtos skirtingais veikimo principais bei naudojamais molekuliniais įrankiais (Bertero et., 2017).

Tradicinis klonavimo metodas. Jau minėtas, tradicinis klonavimo būdas yra paremtas restrikcijos endonukleazių veikimu. Restriktazės atpažįsta specifines DNR vektoriaus ar inserto sekos vietas (taikinius) bei, priklausomai nuo restrikcijos endonukleazės, generuoja viengrandes DNR 5’ ir 3’ iškišas ar bukus galus taikininės DNR galuose. Vėliau galai yra sujungiami ligazės pagalba *in vitro*. Lipnių galų ligavime yra svarbus iškišų komplementarumas pagal Watsono-Kricko principą. Bukų galų sujungimas yra mažiau efektyvus, nes nėra užtikrinamas dviejų sąveikaujančių fragmentų stabilumas. Įdomu, jog fermentų pagalba tiek lipnūs, tiek buki DNR galai gali būti įvairiai modifikuojami. Kalbant plačiau, šis klonavimo metodas turi keletą esminių trūkumų: dažnai pasitaiko atvejų kai restriktazių atpažįstamos sekos yra tiriamajame gene; pats klonavimo procesas užima daug laiko ir darbo; dažnai įvedamos ar paliekamos nepageidaujamos sekos, kurios gali turėti neigiamos įtakos produkuojamo baltymo savybėms bei struktūrai. Tačiau platus jau sukurtų įvairiausių vektorių spektras, puikiai išnagrinėti klonavimo būdai sąlygoja platų šio metodo pritaikymą (Bertero et., 2017; Liu et al., 2017; Jajesniak ir Wong, 2015).

PGR klonavimas. Taikant šį metodą, skirtingai nei anksčiau minėtame tradiciniame, nėra naudojami restrikcijos fermentai. Šiuo atveju tiriamasis fragmentas sugeneruojamas PGR metu, kuris vėliau tiesiogiai naudojamas ligavimo reakcijose su tam tikrais vektoriais (Bertero et., 2017). Kaip pavyzdys PGR klonavimo metodo galėtų būti TA klonavimas (**1.12 pav**.). Šio molekulinio klonavimo metu yra naudojama Taq DNR polimerazė, pasižyminti terminaliniu transferaziniu aktyvumu. Dėl šios priežasties PGR metu 3’ fragmento galuose yra prijungiama vieno nukleotido adenozino iškiša. Akivaizdu, jog klonavimo darbuose yra naudojamas ir specifinis vektorius, kuris vadinamas T-vektoriumi.

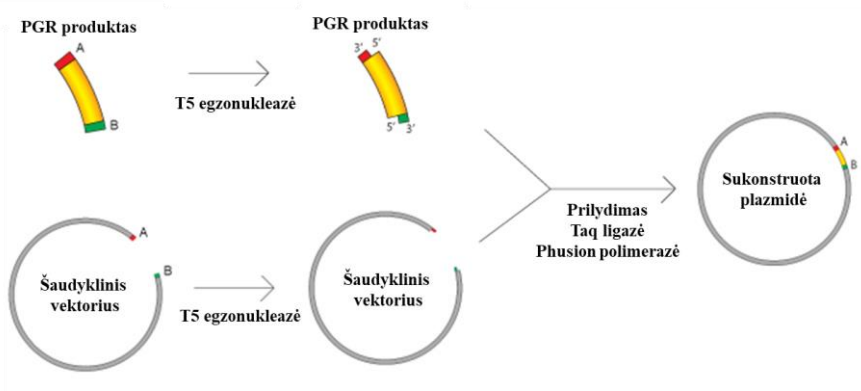


1.12 pav. TA klonavimo metodo schema (https://old.abmgood.com)

Klonavimui skirtoje vietoje abu DNR galai turi vieno nukleotido 3’-T iškišas. Vėliau abi struktūros yra sujungiamos ligazės pagalba *in vitro*. Iš esmės, šis metodas leidžia išvengti specifinių restriktazėms taikinių naudojimo bei yra gerokai efektyvesnis už tradicinį bukų galų sujungimą. Įdomu tai, jog TA klonavimo metodą galima naudoti ir adapterių prijungimui, kur pagrindinis tikslas yra sukurti klonavimo bibliotekas, sudarytas iš skirtingų insertinių sekų. Kaip vieną iš trūkumų, literatūros šaltiniai dažnai nurodo polimerazės Taq naudojimą. Ši polimerazė pasižymi dideliu padaromų klaidų skaičiumi, dažnis siekia - viena klaida į dešimt kB. Taip pat yra reikalingas specifinis T-vektorius (Yao et al., 2016).

Vientisas klonavimas. Vientiso klonavimo būdas užtikrina nuo sekos nepriklausomą klonavimą, kurio metu išvengiama papildomų nukleotidų įterpimo. Šis metodas gali būti pritaikomas vienos ar kelių sekų klonavime vienu metu, kuomet siekiama tam tikra eile sudėlioti norimas sekas (Bertero et., 2017). Dažniausiai pateikiamas pavyzdys yra *Gibsono klonavimo metodas* (**1.13 pav**.). Šio molekulinio klonavimo metu insertai yra sugeneruojami su 20-40 bp ilgio iškišomis, naudojant specifinius pradmenis. Šios iškišos pasižymi sekos homologija gretimiems DNR fragmentams. Tokio klonavimo rezultatas - pagal eiliškumą išsidėstę DNR fragmentai yra įterpiami į paskirties vektorių. Taip pat reakcijos metu yra naudojama T5 egzonuklеazė, kuri pašalina 5’ galus. Taip, tiek atjuostame vektoriuje, tiek inserte, yra suformuojami viengrandžiai galai. Šiame procese yra naudojami ir kiti fermentai. Polimerazė Phusion užpildo likusius tarpus sekoje, o Taq ligazė susiuva trūkius tarp DNR fragmentų. Kalbant apie privalumus derėtų išskirti, jog Gibsono metodas yra paprastas, trunka tik 60 min, po proceso produktas gali būti tiesiogiai naudojamas *E.coli* transformacijoje. Kaip

pagrindinis trūkumas yra išskiriamas metodui atlikti naudojamas didelis kiekis fermentų, kuris stipriai iškelia vienos reakcijos savikainą (Kelwick et al., 2014; Koeppl et al., 2011).



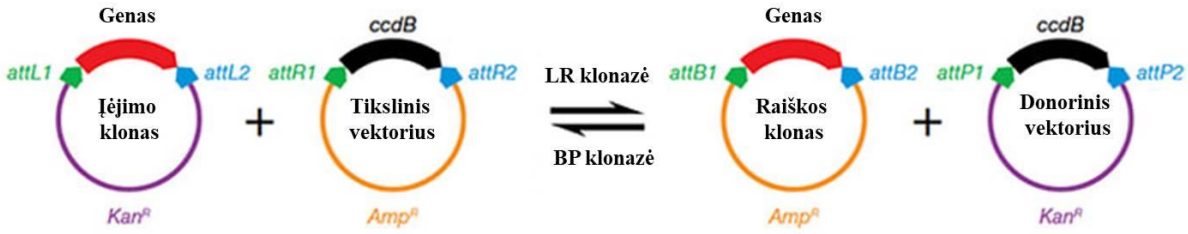
1.13 pav. Gibson metodo klonavimo eiga (https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/)

Dar vienas vientiso klonavimo būdas yra *ET klonavimas*. Šis metodas remiasi homologine rekombinacija bakterijose *in vivo*, kurioje dalyvauja baltymai recE ir recT. Toks rekombinacijos tipas veikia tik sbc *E.coli* kamienuose, kurie vykdo minėtų baltymų gamybą. Pats procesas prasideda nuo tiriamosios DNR sekos paruošimo bei raiškos vektoriaus parinkimo. Pradmenų pagalba prie tiriamojo DNR fragmento yra prijungiama nuo 27 bp iškiša, kuri yra homologinė vektoriaus tam tikrai sekos daliai. Pastebima, jog kuo didesnė yra minėtoji iškiša, tuo efektyviau vyksta homologinė rekombinacija. Pats procesas prasideda, kai DNR fragmentas ir raiškos vektorius patenka į *E.coli*. Iš pradžių suaktyvinamas baltymas RecE, pasižymintis 5’-3’ egzonukleaziniu aktyvumu, sukuriamos viengrandės 3’ iškišos. Tuomet RecT jungiasi prie viengrandės DNR ir suformuojamas DNR-baltymo kompleksas. Šis kompleksas sąveikauja su dvigrande DNR. Vėliau kai vyksta DNR replikacija, inicijuojama ir rekombinacija, sukeliama rekombinacija po DNR replikacijos. Pats procesas gali būti taikomas taškinių mutacijų, fragmentų įvedimui, taip pat įmanoma atlikti ir 1-70 bp delecijas. Kaip pagrindinis trūkumas yra išskiriamos ilgos pradmenų uodegos, kurios apsunkina sėkmingą PGR (Zhang et al., 1998; Muyrers et al., 2001; Watson ir García-Nafría, 2019).

Be ET klonavimo, yra sukurtas dar vienas klonavimo metodas *in vivo E.coli*, t.y. nuo *RecA priklausoma rekombinacija* (*angl*. RecA-independent recombination, RAIR). Šis rekombinacijos procesas iki galo dar nėra pilnai ištirtas, tačiau nustatyta, jog šiame metode gali būti naudojami DNR fragmentai su trumpesniais homologiniais galais, taip pat galimas platesnis laboratorinių *E.coli* kamienų spektras, nei ET metode (Watson ir García-Nafría, 2019).

Deja, nei vienas iš prieš tai minėtų klonavimo metodų *in vivo* nėra plačiai taikomi. Pagrindinės priežastys galėtų būti: i) atradus metodus dar nebuvo pilnai išvystytas PGR, polimerazės pasižymėjo prastu procesavimu ir tikslumu; ii) tik du straipsniai buvo publikuoti apie ET ir RAIR klonavimo metodus; iii) RAIR metodas minimas kaip "juodasis" klonavimo metodas, nes trūksta tikslios informacijos apie vykstančią proceso eigą ląstelėse *E.coli* (Hultman et al., 1990; Zaret et al., 1990; Watson ir García-Nafría, 2019).

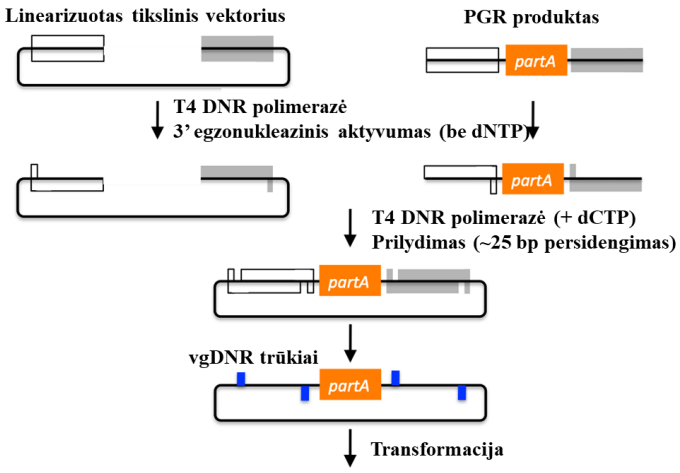
Rekombinantinis klonavimas. Rekombinantinio molekulinio klonavimo metu yra naudojamos sekai specifinės DNR rekombinazės, kurios sugeba pakeisti DNR sekos motyvus per rekombinacijos specifines sekas, pvz., *Gateway klonavimo sistema* (Bertero et., 2017). Šioje sistemoje yra naudojama λ bakteriofago taikinio specifinės rekombinacijos sistema, kurios pagrindinis tikslas įterpti dominančio geno seką į paskirties vektorių. Naudojami du skirtingi fermentų mišiniai. BP klonazė rekombinuoja *att*B specifines sekas su *att*P sekomis, taip sugeneruojamos *att*L ir *att*R sekos. Tuo tarpu, LR klonazė katalizuoja reversinę reakciją. Kiekvienas vykstantis rekombinacijos procesas yra labai preciziškas, be jokio nukleotidų pokyčio. Pats klonavimo procesas (**1.14 pav**.) prasideda nuo PGR, kai pradmenų pagalba prijungiami *att*B galai prie tiriamosios sekos. Donorinis vektorius (*angl.* donor vector) turi *att*P specifines sekas.



1.14 pav. Gateway klonavimo metodo schema (http://smolkelab.weebly.com/gateway-cloning.html)

Taigi, PGR produktas turintis *att*B specifines sekas rekombinuoja su vektoriaus *att*P sekomis, suformuojamas įėjimo klonas (*angl.* entry clone). Įėjimo klone yra tiriamasis genas, apsuptas *att*L specifinėmis sekomis. Toliau vyksta LR reakcija, jos metu vyksta rekombinacija tarp *att*L ir *att*R specifinių sekų. Reakcijos metu suformuojamas raiškos klonas (*angl.* expression clone), nuo kurio jau gali būti produkuojamas rekombinantinis baltymas. Pačio proceso trūkumai yra minimi tokie, kaip brangūs rekombinacijos fermentai, naudojamos *att* specifinės sekos gali turėti neigiamos įtakos produkuojamo baltymo funkcionalumui arba prisidėti kaip cis-reguliacinės sekos prie promotoriaus fragmento. Kalbant apie privalumus, išskiriama, jog nėra pridedama ar netenkama nukleotidų, nėra reikalingas karpymas restrikcijos endonukleazėmis, užtikrinimas aukštas klonavimo preciziškumas (Reece-Hoyes et al., 2018; Chee ir Chin, 2015; Bertero et., 2017).

LIC klonavimas. LIC molekulinio klonavimo būdas yra paremtas tiriamųjų DNR fragmentų ir vektoriaus viengrandžių galų komplementarumu, atliekamas tiesioginis klonavimo procesas (Bertero et., 2017). Konkretesnis pavyzdys galėtų būti SLIC (*angl.* sequence and ligation independent cloning) metodas (**1.15 pav**.).



1.15 pav. SLIC klonavimo metodo schema (adaptuota pagal Koeppl et al., 2011)

SLIC reakcijos metu paskirties vektorius ir PGR produktas yra nepriklausomai vienas nuo kito veikiami T4 DNR polimeraze *in vitro*, suformuojamos viengrandės DNR iškišos. Šiame nagrinėjamame pavyzdyje egzonukleazinis aktyvumas yra stabdomas pridedant deoksicitozino trifosfato (dCTP). Sumaišomi abu komponentai - vyksta komplementarių iškišų prilydimas. Kadangi procese nėra naudojama ligazė, tai viengrandžiai trūkiai ir tarpai yra sutvarkomi atlikus *E.coli* transformaciją. Kaip pagrindiniai privalumai yra išskiriami: pigumas, greitis, aukštas efektyvumas (Stevenson et al., 2013; Chao et al., 2015; Li ir Elledge, 2012). Kalbant apie trūkumus yra galima būtų išskirti T4 polimerazės naudojimą, šios veikimas priklauso nuo jos šviežumo.

Remiantis literatūros apžvalga tampa akivaizdu, jog β-KA fermentas gali būti efektyviai pritaikytas pramoniniuose procesuose. Šio fermento integracija į technologijas yra limituojama mokslinių tyrimų spartos, nes iki šiol dar nepavyko sukurti efektyvios raiškos sistemos karboanhidrazės baltymo gamybai. Todėl tiriamojo magistrinio darbo metu buvo nuspręsta įvertinti dar niekada β-KA geno raiškai bei baltymo sekrecijai nepritaikytas mielių *P.pastoris* bei *S.cerevisiae* sistemas.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Prietaisai ir priemonės

Prietaisas/priemonė	Gamintojas
Analitinės svarstyklės	KERN ABJ
Automatinės pipetės	Eppendorf; Tipor-V; Gilson
Baltymų koncentravimo mėgintuvėliai	Amicon® Ultra 10K
Baltymų gelių skenavimo įrenginys	Epson syngene
Centrifugos	Eppendorf 5424 (rotorius r = 84 mm), PRISM R“ (rotorius r = 84 mm); MIKRO 220R“ (rotorius r = 98 mm)
Drigalski špateliai	Buddeberg
Horizontali elektroforezės kamera	BioRad
Laminarinė traukos spinta	Flow Fast H
Magnetinės maišyklės ir magnetai	Biosan MMS-3000 ir Thermo Fisher Scientific
Maišyklės	Vortex-Genie 2; KA MS3 basic
Mikrobangų krosnelės	Scarlett; Daewoo
pH-metras	Mettler Toledo
Petri lėkštelės	Nuova Aptaca
Purtyklė	Vibramax 100
Spektrofotometrai	Spekol 2000; Nanodrop 2000; Synergy H4
Svarstyklės	Kern E6
Termocikleris	iCycler BioRad
Termostatas (inkubatorius)	Binder
Termostatuojami kratytuvai	Stuart Orbital Incubator; IKA KS 4000; Biosan
Transiliuminatorius	Biostep
Vandens dejonizatorius	Crystal
Vandens vonios	Thermo Haake P5; Julabo TW8
Vertikalios elektroforezės aparatas ir įtampos šaltinis	Biometra

2.2 Naudoti mikroorganizmai ir vektoriai

Mikroorganizmai

Bakterijos:

- *Escherichia coli*, kamienas DH5α

Mielės:

- *Saccharomyces cerevisiae*, kamienai AH22-214; GCN2; 214Δpep4, AH22;
- *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*), kamienas GS115.

Vektoriai

- pFX7αF (αF - signalinis peptidas); pPIC3,5K; pPIC9K (αF - signalinis peptidas).
- **„Acros Organics”:** imidazolas, indoksilacetatas, acto rūgštis 99,5 %, agaras, amonio sulfatas
- **„Alfa Aesar”**: mielių azoto bazė (YNB)
- **„BioRad laboratories, Inc.”**: dažas ,,Coomassie Briliant Blue G-250”, Tween-20, akrilamidas, bromfenolio mėlis
- **„ChemPure Chemicals”**: izopropanolis

- **„Ducheta Biochemie"**: etilendiaminotetraacto rūgštis (EDTA)
- **„Fisher Bioreagents"**: geneticinas (G418)
- **„Fluka"**: galaktozė, p-nitrofenilo acetatas
- **„MC/B"**: fenolio raudonasis
- **„Merck & Co., Inc."**: druskos rūgštis (35-37 %), magnio chlorido heksahidratas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), mielių ekstraktas, glicerolis (85 %), agarozė, natrio acetatas
- **„Reachim"**: bromtimolio mėlis, kalio dihidrofosfatas, sorbitolis
- **„Roth"**: peptonas, etidžio bromidas, natrio chloridas, natrio hidroksidas, kalcio chloridas, amonio persulfatas (APS), natrio hidroksidas, N,N,N‘,N‘-tetrametiletilendiaminas (TEMED), ličio chloridas, „Coomassie Brialliant Blue R-250“, natrio dodecilsulfatas (NDS), 2-merkaptotanolis
- **„Sigma"**: fenilmetilsulfonilo fluoridas (PMSF), gliukozė, kalio acetatas, PEG-3350, PEG-8000, formaldehidas (FDH), α-karboanhidrazė (jaučio eritrocitų), kalio bikarbonatas, dinatrio fosfatas, bis-akrilamidas
- **„Thermo Fisher Scientific"**: LB (Luria-Bertani) terpė, DNR fragmentų dydžio standartas (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), ampicilinas, molekulinis masių standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), jaučio serumo albuminas (JSA), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis (HEPES), glicinas, fosforo rūgštis, 6×koncentruotas elektroforetinis dažas, triptonas
- **„UAB Mavis"**: 99,8 % etanolis

2.4 DNR išskyrimo ir gryninimo tirpalai

- „Thermo Fisher Scientific": plazmidinės DNR išskyrimo rinkinys (GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit), DNR gryninimo iš agarozės gelio rinkinys (GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit)

2.5 Fermentai ir buferiniai tripalai

- DNR polimerazių mišiniai („Thermo Fisher Scientific"): „DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)", „Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)";
- Restrikcijos endonukleazės: *Aat*II, *Sal*I, *Not*I, *SnaB*I *BamH*I, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I („Thermo Fisher Scientific");
- Ribonukleazė A/T1 („Thermo Fisher Scientific").

2.6 Plazmidinės DNR išskyrimo ir gryninimo tirpalai

- *GTE tirpalas*: 1,6 g gliukozės, 0,61 g Tris, 0,584 g EDTA tirpinama 170 mL dH_2O. pH privedamas iki 8,0 su skiesta konc. HCl ir skiedžiama dH_2O iki 200 mL žymos. Pastaba: pH matavimuose naudoti lakmuso popierėlį, kol ištirpsta EDTA. Vėliau pH tiksliai privedamas su pH-metru. Laikoma kambario temperatūroje;
- *1 M NaOH tirpalas*: 4 g NaOH tirpinama 90 mL dH_2O ir skiedžiama dH_2O iki 100 mL žymos;
- *10 % NDS tirpalas*: 10 g NDS tirpinama 80 mL ir skiedžiama dH_2O iki 100 mL žymos;

- *Šarminės lizės tirpalas*: sumaišoma 200 µL NaOH (1 M), 100 µL NDS (10 %) ir 700 µL dH_2O. Laikoma kambario temperatūroje;
- *5 M kalio acetato tirpalas (pH 4,8)*: 49,08 g kalio acetato tirpinama 70 mL dH_2O, pH privedamas su acto rūgštimi. Tirpalas skiedžiamas dH_2O iki 100 mL. Laikoma kambario temperatūroje;
- *70 % etanolio tirpalas*: 70 mL etanolio (99,8 %) skiedžiama dH_2O iki 100 mL žymos. Laikoma +4 °C temperatūroje;
- *3 M natrio acetato tirpalas (pH 4,8)*: 2,46 g natrio acetato tirpinama 70 mL dH_2O, pH privedamas su acto rūgštimi. Tirpalas skiedžiamas dH_2O iki 100 mL tūrio. Laikoma kambario temperatūroje;
- *PEG-8000/$MgCl_2$*: 30 g PEG-8000 ir 0,286 g $MgCl_2$ tirpinama 70 mL dH_2O ir skiedžiama dH_2O iki 100 mL tūrio. Laikoma kambario temperatūroje.

2.7 Kompetentinių ląstelių ruošimo ir transformavimo tirpalai

Bakterijų:

- *$CaCl_2$ tirpalas*: 1,11 g $CaCl_2$, 0,101g $MgCl_2x6H_2O$, 0,061 g Tris tirpinama 80 mL dH_2O. pH privedamas iki 8,0 su skiesta konc. HCl ir mišinys skiedžiamas dH_2O iki 100 mL tūrio. Tirpalas autoklavuojamas 0,8 atm 30 min. Laikoma 4 °C temperatūroje;
- *NaCl tirpalas*: 0,584 g NaCl, 0,101g $MgCl_2x6H_2O$, 0,061 g Tris tirpinama 80 mL dH_2O. pH privedamas iki 8,0 su skiesta konc. HCl ir mišinys skiedžiamas dH_2O iki 100 mL tūrio. Tirpalas autoklavuojamas sąlygomis 1 atm 20 min. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Mielių *Pichia pastoris (Komagataella phaffi)*:

- *1 M sorbitolio tirpalas*: 4,55 g sorbitolio tirpinama 20 mL dH_2O ir skiedžiama dH_2O iki 25 mL žymos. Tirpalas autoklavuojamas sąlygomis 1 atm 20 min. Laikoma 4 °C temperatūroje;
- *1 M ditiotreitolio (DTT) tirpalas*: 1,51 g DTT tirpinama 10 mL dH_2O. Tirpalas išpilstomas į 1,5 mL tūrio ependorfus ir laikomas -20 °C temperatūroje;
- *1 M HEPES buferis (pH 8,0)*: 5,96 g HEPES tirpinama 18 mL dH_2O, pH privedamas su NaOH. Tirpalas sterilinamas per 0,22 µm filtrą. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Mielių *Saccharomyces cerevisiae*:

- *TE buferinis tirpalas*: 2,922 g EDTA, 0,122 g Tris tirpinama 70 mL dH_2O. pH privedamas iki 8,0 su skiesta konc. HCl ir skiedžiama dH_2O iki 100 mL žymos. Pastaba: pH matavimuose naudoti lakmuso popierėlį, kol ištirpsta EDTA. Vėliau pH tiksliai privedamas su pH-metru;
- *0,1 M LiCl tirpalas*: 0,424 g LiCl tirpinama 90 mL TE buferinio tirpalo ir skiedžiama su tuo pačiu buferiniu tirpalu iki 100 mL žymos;
- *50 % (w/v) PEG-3350 tirpalas*: 5 g PEG-3350 tirpinama 7 mL TE buferinio tirpalo ir skiedžiama tuo pačiu buferiniu tirpalu iki 10 mL tūrio.

Visi minėti tirpalai laikomi kambario temperatūroje.

2.8 DNR elektroforezės tirpalai

- *10×TAE buferinis tirpalas*: 48,4 g Tris, 11,42 mL ledinės acto rūgšties (99,5 %), 3,72 g EDTA tirpinama 900 mL dH_2O ir skiedžiama dH_2O iki 1 L žymos. Pagaminus tirpalą pH turi siekti 8,0. Po to, naudojimui, tirpalas skiedžiamas 10 kartų su dH_2O;

- *1 mg/mL (w/v) etidžio bromidas tirpalas*: 10 mg etidžio bromido tirpinama 10 mL dH_2O. Po to, naudojimui tirpalas skiedžiamas 1000 kartų.

2.9 Bakterijų mitybinės terpės

- *2,5 % skysta LB terpė*: 25 g LB tirpinama 1 L dH_2O. Teigiamų klonų atrankai naudojama terpė su antibiotiku, t.y., į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama ampicilino tirpalo (**2.17**) santykiu 1 µL ampicilino:1 mL terpės;
- *2,5 % agarizuota LB terpė*: 20 g agaro įdedama į 1 L skystos 2,5 % LB terpės. Teigiamų klonų atrankai naudojama terpė su antibiotiku, t.y, į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama ampicilino tirpalo (**2.17**) santykiu 1 µL ampicilino:1 mL terpės.

Visos bakterijų terpės autoklavuojamos sąlygomis 1 atm 20 min. Laikomos kambario temperatūroje.

2.10 Mielių mitybinės terpės

- *Skysta YEPD terpė:* 20 g gliukozės, 20 g peptono iš sojų, 10 g mielių ekstrakto tirpinama 1 L dH_2O;
  - Jei auginami formaldehidui turintys atsparumą *Saccharomyces cerevisiae* klonai, į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama 37 % formaldehido tirpalo santykiu 30 µL formaldehido:100 mL terpės
- *Agarizuota YEPD terpė:* 20 g agaro įdedama į 1 L skystos terpės YEPD terpės;
  - Jei auginami formaldehidui turintys atsparumą *Saccharomyces cerevisiae* klonai, į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama 37 % formaldehido tirpalo santykiu 30 µL formaldehido:100 mL terpės
  - Jei auginami geneticinui (G415) turintys atsparumą *P.pastoris* klonai, į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama antibiotiko santykiu 1 mg geneticino:1 mL terpės arba 0,5 mg geneticino: 1 mL terpės. Prieš įpilant į terpę, atsvertą antibiotiką rekomenduojama ištirpinti steriliame dH_2O
- *Skysta YEPD terpė su HEPES buferiu*: 1 g gliukozės, 1 g peptono iš sojų, 0,5 g mielių ekstrakto tirpinama 40 mL dH_2O. Laminariniame bokse į autoklavuotą YEPD terpę įpilama 10 mL sterilaus 1 M HEPES (pH 8,0) buferio (**2.7**);
- *Skysta YEPGal terpė*: 30 g galaktozės, 20 g peptono iš sojų pupelių, 10 g mielių ekstrakto tirpinama 1 L dH_2O. Jei auginami formaldehidui turintys atsparumą *Saccharomyces cerevisiae* klonai, į atvėsusią iki 50 °C temperatūros terpę įpilama 37 % formaldehido tirpalo santykiu 30 µL formaldehido:100 mL terpės;
- *Agarizuota MD terpė*: 2 g gliukozės, 0,17 g YNB (be amonio sulfato), 0,5 g amonio sulfato, 2,5 agaro įberiama į 100 mL dH_2O. Po sterilinimo pridedama 0,02 g biotino;
- *Skysta YEPG terpė*: 2 g sojų peptono, 1 g mielių ekstrakto, 1,18 mL glicerolio (85 %) tirpinama 100 mL dH_2O;
- *Skysta YEPM terpė*: 2 g sojų peptono, 1 g mielių ekstrakto tirpinama 100 mL dH_2O. Po sterilinimo į 99 mL terpės steriliai įpilama 1 mL metanolio (v/v);

Visos mielių terpės autoklavuojamos sąlygomis 0,8 atm 30 min. Laikomos kambario temperatūroje.

2.11 Pradmenys

Pradmuo	Seka
P529	5‘-TCCCCTTTCAAAGTTATTCTCTACTC
P530	5‘-TCGGATAAGAAAGCAACACCTG
P585	5-‘GGTATCTCTCGAGAAAAGAAGTCTTCTCAATGATATTCTTGAC
P586	5‘-GGAACAGTCATGTCTAAGGTTAATCGTTATAGCCATTTACG
P587	5’-CAAAAAACAACTAATTATTCGAAATGAGTCTTCTCAATGATATTCTTGAC
P588	5’-GGAACAGTCATGTCTAAGGTTAATCGTTATAGCCATTTACGAC
P611	5’-GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAAGTC

2.12 Baltymo koncentracijos matavimo tirpalai

- *Bradford’o reagentas*: 100 mg ,,Coomassie Briliant Blue G-250” tirpinama 53 mL 99,8 % etanolyje. Tirpalas maišomas magnetine maišykle 16-18 val. kambario temperatūroje, tamsiame inde. Po nakties įpilama 70 % 134 mL H_3PO_4 tirpalo ir skiedžiama iki 1 L dH_2O. Tirpalas filtruojamas ir laikomas 4 °C temperatūroje;
- *0,15 M NaCl tirpalas*: 0,877 g NaCl tirpinama 100 mL dH_2O;
- Komercinis 2 mg/mL koncentracijos JSA standartinis tirpalas yra skiedžiamas 4 kartus iki 0,5 mg/mL galutinės koncentracijos tirpalo, kuris toliau naudojamas tyrimams.

2.13 Baltymų elektroforezės tirpalai denatūruojančiomis sąlygomis

- *10 % amonio perusulfato (APS) tirpalas*: 1 g APS tirpinama 10 mL dH_2O. Vėliau tirpalas išpilstomas į 1,5 mL ependorfus ir laikoma -20 °C temperatūroje;
- *10 % natrio dodecilsulfato (NDS) tirpalas*: 5 g NDS tirpinama 40 mL dH_2O ir skiedžiama iki 50 mL. Laikoma kambario temperatūroje;
- *1,5 M Tris-HCl buferinis tirpalas (pH 8,8)*: 18,15 g Tris tirpinama 70 mL dH_2O. pH privedamas su skiesta konc. HCl. Tirpalas skiedžiamas dH_2O iki 100 mL tūrio. Laikomas tamsiame inde , 4 °C temperatūroje;
- *1 M Tris-HCl buferinis tirpalas (pH 6,8)*: 12,10 g Tris tirpinama 50 mL dH_2O. pH privedamas su praskiesta konc. HCl. Tirpalas skiedžiamas iki 100 mL tūrio. Laikoma tamsiame inde, 4 °C temperatūroje;
- *30 % akrilamido (AA) ir bis-akrilamido (BAA) tirpalas*: 58,4 g AA tirpinama 100 mL dH_2O ir tame pačiame tirpale ištirpinama 1,6 g BAA. Tirpalas skiedžiamas dH_2O iki 200 mL. Filtruojama ir laikoma tamsiame inde, 4 °C temperatūroje;
- *10×koncentruotas baltymų elektroforezės tirpalas*: ruošiami atskirai Tris, glicino ir NDS tirpalai. 15 g Tris tirpinama 50 mL dH_2O, 72 g glicino tirpinama 380 mL dH_2O (sunkiai tirpsta, maišyti su magnetine maišykle, kaitinant), 5 g NDS tirpinama 20 mL dH_2O. Paruošti tirpalai sumaišomi ir skiedžiama iki 500 mL, pH turi būti 8,3-8,6 ribose

(nekoreguojamas). Baltymų elektroforezėje naudojamas tirpalas, 10 kartų skiestas vandeniniu tirpalu;

- *„Coomassie R-250" dažo tirpalas*: 0,62 g dažo tirpinama 109 mL 99,8 % etanolyje. Į tirpalą įpilama 23 mL 99,5 % acto r. bei skiedžiama dH_2O iki 250 mL, filtruojamas bei laikomas tamsiame inde, kambario temperatūroje;

- *2×elektroforetinio dažo tirpalas*: 0,197 g Tris-HCl tirpinama 15 mL dH_2O. pH privedamas iki 6,8 su 1 M NaOH tirpalu ir skiedžiama dH_2O iki 20 mL. Tuomet 5,88 mL glicerolio (85 %), 2 g NDS, 0,004 g bromfenolio mėlynojo dažo tirpinama 10 mL Tris-HCl (pH 6,8) buferinio tirpalo ir skiedžiama tuo pačiu buferiniu tirpalu iki 20 mL. Laikoma kambario temperatūroje. Prieš naudojant dažą NDS-PAGE denatūruojančiomis sąlygomis atsipilama 1,9 mL 2×elektroforetinio dažo tirpalo ir įdedama 100 µL 2-merkapto etanolio bei laikoma -20 °C temperatūroje.

2.14 Baltymų elektroforezės tirpalai natyviomis sąlygomis

- *10×koncentruotas baltymų elektroforezės tirpalas*: ruošiami atskirai Tris, glicino tirpalai. 15 g Tris tirpinama 50 mL dH_2O, 72 g glicino tirpinama 380 mL dH_2O (sunkiai tirpsta, maišyti su magnetine maišykle, kaitinant). Paruošti tirpalai sumaišomi ir skiedžiama iki 500 mL, pH turi būti 8,3-8,6 ribose (nekoreguojamas). Baltymų elektroforezėje naudojamas tirpalas, 10 kartų skiestas dH_2O;

- *5×elektroforetinio dažo tirpalas*: 0,197 g Tris-HCl tirpinama 15 mL dH_2O. pH privedamas iki 6,8 su 1 M NaOH tirpalu ir skiedžiama dH_2O iki 20 mL. Tuomet 5,88 mL glicerolio (85 %), 0,004 g bromfenolio mėlynojo dažo tirpinama 13 mL Tris-HCl (pH 6,8) buferinio tirpalo ir skiedžiama tuo pačiu buferiniu tirpalu iki 20 mL. Laikoma -20 °C temperatūroje;

- 10 % amonio perusulfato (APS), 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 30 % akrilamido (AA) ir *bis*-akrilamido (BAA) tirpalai naudojami kaip ir **2.13** punkte.

2.15 Protonogramos tirpalai

- *Bromtimolio mėlio dažo sudėtis*: 1,21 g Tris, 0,1 g bromtimolio mėlio dažo tirpinama 100 mL dH_2O. Laikoma tamsiame inde, 4 °C temperatūroje;

- *CO_2-substratinis tirpalas*: sausas ledas tirpinamas 40 mL dH_2O, tol kol tirpsta. Tirpalas kas kart gaminamas šviežiai prieš naudojimą;

- *100 mM Tris-HCl ir 10 % izopropanolio tirpalas*: atsveriama 1,21 g Tris ir ištirpinama 80 mL dH_2O. pH privedamas su praskiesta konc. HCl. Po to, į tirpalą įpilama 10 mL izopropanolio bei baigiama skiesti dH_2O iki 100 mL žymos.

2.16 Fermentinio aktyvumo matavimo tirpalai

Hidratacinio aktyvumo nustatymui:

- *25 mM HEPES (pH 8,2) buferinis tirpalas*: 5,96 g HEPES tirpinama 950 mL dH_2O, buferinis tirpalas pavirinimas, po to privedamas pH iki 8,2 bei skiedžiama dH_2O iki 1 L žymos;

- *CO_2-substratinis tirpalas*: sausas ledas tirpinamas 25 mM HEPES (pH 8,2) buferyje, tol kol tirpsta. Tirpalas pasigaminamas prieš naudojimą;

- *0,027 mM fenolio raudonasis*: 0,9 mg fenolio raudonojo tirpinama 100 mL 25 mM HEPES (pH 8,2) buferyje. Iš gauto tirpalo CO_2 pašalinimas su ultragarso vonele.

Esterazinio aktyvumo nustatymui, naudojant substratą p-nitrofenilo acetatą:

- *25 mM HEPES (pH 8,2) buferinis tirpalas*: 5,96 g HEPES tirpinama 950 mL dH_2O, buferinis tirpalas pavirinamas, po to privedamas pH iki 8,2 bei skiedžiama dH_2O iki 1 L žymos*;*
- *Substrato p-NFA tripalas*: 0,0289 g p-NFA tirpinama 12 mL acetonitrile. Tuomet paimamas 1 mL šio tirpalo ir skiedžiamas su 19 mL 25 mM HEPES buferiu (pH 8,2).

Esterazinio aktyvumo nustatymui, naudojant substratą indoksilo acetatą:

- *17,5 mM HEPES su 17,5 mM imadazolo (pH 7,2) buferinis tirpalas*: atsveriama 4,17 g HEPES, 1,19 g imidazolo ir ištirpinama 800 mL dH_2O. pH privedamas su konc. HCl iki 7,2 ir tirpalas skiedžiamas dH_2O iki 1 L žymos;
- *Substrato indoksilo acetato tirpalas*: 0,0338 g indoksilo acetato tirpinama 2 mL 96 % EtOH. Tuomet, naudojimui, tirpalas skiedžiamas 10 kartų su 96 % EtOH.

2.17 Kiti tirpalai

- *100 mM PMSF tirpalas*: 0,1742 g PMSF tirpinama 10 mL izopropanolio. Laikoma kambario temperatūroje;
- *100 mg/mL ampicilino tirpalas*: 0,1 g ampicilino tirpinama 10 mL steriliame dH_2O. Laikoma -20 °C temperatūroje.

2.18 DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezėje yra naudojami 0,7-1,3 % agarozės geliai, kurie paruošiami sumaišius atitinkamus kiekius agarozės bei 1×TAE buferinio tirpalo (**2.8**). Mišinys yra išlydomas mikrobangų krosnelėje. Tuomet į atvėsusią agarozę įpilama etidžio bromido tirpalo (EtBr) (**2.8**), galutinė koncentracija yra 0,5 µg/mL. Toliau, ant stiklelio užpilama atvėsusi agarozė, įstatomos šukutės bei palaukiama 20 min., gelis sustingsta - susiformuoja šulinėliai. Į šiuos leidžiamas tiriamasis DNR mėginys su 6×DNR elektroforetiniu dažu (**2.3**) santykiu 5:1, atitinkamai, DNR mėginys:dažas. Mėginių dydžio analizei greta įnešama 3 µL DNR fragmentų dydžio standartas (**2.3**). Elektroforezė leidžiama horizontalioje kameroje, kuri yra užpildyta 1×TAE buferiniu tirpalu (**2.8**). Elektrinio lauko stipris 6-7 V/cm. Elektroforezės rezultatai - gelis analizuojamas UV spektro šviesoje transiliuminatoriuje.

Preparatyvinė elektroforezė. Šios elektroforezės metu yra naudojama šviežia, neperlydyta 1 % agarozė, ištirpinta 1×TAE buferiniame tirpale (**2.8**) su etidžio bromidu (**2.8**). EtBr galutinė koncentracija yra 0,5 mg/mL. Elektroforezė leidžiama mažoje horizontalioje kameroje, kuri yra užpildyta 1×TAE buferiniu tirpalu (**2.8**), atliekama esant 3-5 V/cm elektrinio lauko stipriui.

2.19 DNR išskyrimas iš agarozės gelio su rinkiniu „GeneJET™ Gel Extraction Kit"

Metodas atliekamas pagal ,,Thermo Fisher Scientific" rekomendacijas. Po preparatyvinės elektroforezės gelis yra apšviečiamas UV spektro šviesoje ir skalpeliu išpjaunamas tikslinis DNR fragmentas, kuris įdedamas į anksčiau pasvertus tuščius 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Pasveriamas mėgintuvėlis su agarozės geliu ir apskaičiuojama išpjauto gelio gabalėlio masė. Tuomet gelio fragmentas užpilamas "surišimo" buferiu (*angl*. Binding Buffer) santykiu 1 mg gelio:1 µL buferio, inkubuojama 15-30 min. (priklauso nuo gabalėlio dydžio) 60 °C

temperatūroje, inkubacijos laikotarpiu mėgintuvėlis kelis kartus pavartomas. Po to įvertinama tirpalo spalva, jei yra gaunamas geltonos spalvos tirpalas, tai rodo, jog mišinio pH yra optimalas ir tinkamas DNR surišimui. Jeigu tirpalo spalva oranžinė ar violetinė – įpilama 10 µL 3M natrio acetato tirpalo (pH 4,8), jog būtų gaunamas tinkamos spalvos mišinys. Paruoštas tirpalas yra perkeliamas į „GeneJET^{Tm}“ gryninimo kolonėlę (ne daugiau 800 µL) bei centrifuguojamas 1 min. 12000xg. Nucentrifuguotas tirpalas yra pašalinamas iš surinkimo mėgintuvėlio. Tuomet į gryninimo kolonėlę „GeneJET^{Tm}“ įpilama 700 µL plovimo buferio (*angl*. Wash Buffer) ir centrifuguojama 1 min. 12000xg. Tirpalas iš surinkimo mėgintuvėlio yra išpilamas. Plovimas kartojamas 2 kartus. Gauta tuščia gryninimo kolonėlė dar kartą centrifuguojama 1 min. 12000xg. Tuomet kolonėlė perkeliama į naują 1,5 mL tūrio mėgintuvėlį. Užpilama 20 µL eliucijos buferio (*angl.* Elution Buffer) ir centrifuguojama 1 min. 12000xg. Nucentrifuguotas eliucijos buferinis tirpalas mėgintuvėlio apačioje yra su išgryninta DNR. Minėtieji darbai atliekami kambario temperatūroje.

2.20 Plazmidinės DNR gryninimas su rinkiniu „GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit“

Išskirtos plazmidinės DNR tirpalas yra sumaišomas su neutralizacijos tirpalu (*angl*. Neutralization Solution) santykiu 10:7 (atitinkamai) bei perkeliamas į „GeneJET^{Tm}“ gryninimo kolonėlę (ne daugiau kaip 800 µL). Tuomet tirpalas yra centrifuguojamas 1 min. 12000xg, iš surinkimo mėgintuvėlio pašalinamas nucentrifuguotas mišinys. Po to, į gryninimo kolonėlę „GeneJET^{Tm}“ įpilama 500 µL plovimo buferio (*angl.* Wash Buffer) ir centrifuguojama 1 min. 12000xg. Tirpalas iš surinkimo mėgintuvėlio yra išpilamas. Plovimas kartojamas 2 kartus. Gauta tuščia gryninimo kolonėlė dar kartą centrifuguojama 1 min. 12000xg. Tuomet kolonėlė perkeliama į naują 1,5 mL tūrio mėgintuvėlį. Užpilama 30 µL eliucijos buferio (*angl.* Elution Buffer) bei inkubuojama 2 min. Po inkubacijos centrifuguojama 1 min. 12000xg. Nucentrifuguotas eliucijos buferinis tirpalas mėgintuvėlio apačioje yra su išgryninta DNR. Minėtieji darbai atliekami kambario temperatūroje.

2.21 DNR koncentracijos nustatymas

DNR koncentracija yra nustatoma naudojant spektrofotometrą „Nanodrop” pagal „Thermo Fisher Scientific” gamintojo rekomendacijas. Internetinė nuoroda: (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND2000CLAPTOP#/ND2000CLAPTOP).

2.22 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Naudojama „Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)”, gamintojas „Thermo Fisher Scientific”.
Vienos reakcijos mišinio sudėtis:

Medžiagos	**Tūris, µL**
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)	10
10 µM pradmuo Nr. 1	1
10 µM pradmuo Nr. 2	1
2 pg-20ng plazmidinės DNR	1
MilliQ H_2O	7

PGR reakcija vykdoma termocikleryje „iCycler” („Biorad”). Nustatomi PGR parametrai:

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklai
Pradinė denatūracija	98 °C	10 s	1
Pradmenų prilydimas	**X °C**	10 s	30
DNR prailginimas	72 °C	**Y s**	
Denatūracija	98 °C	5 s	
Pradmenų prilydimas	**X °C**	30 s	1
Galutinis DNR prailginimas	72 °C	10 min.	
Palaikymas	4 °C	∞ min.	

X - apskaičiuojamas naudojant internetinę skaičiuoklę „Thermo Fisher Scientific Tm calculator”: (https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html).
Y - apskaičiuojamas pagal sekos ilgį ir naudojamos „Phusion” polimerazės sintezės greitį (Plazmidinė DNR - 15 s/kb).

2.23 *E.coli* ląstelių ruošimas transformacijai

Sterilia mikrobiologine kilpele užsėjamos *E.coli* DH5α ląstelės į 5 mL stulpelį su LB terpe be ampicilino (**2.9**). Kultūra auginama per naktį (16-18 val.) purtant 220 aps/min. greičiu esant 37 °C. 50 µL naktinės kultūros pernešama į naują 5 mL stulpelį su LB terpe be ampicilino (**2.9**). Purtoma 2-3 val. 220 aps/min. greičiu, 37 °C, kol ląstelių tankis pasiekia 0,4-0,5 optinius vienetus, esant 600 nm bangos ilgiui. Toliau visos procedūros vykdomos 0-4 °C temperatūroje. Stulpelis su ląstelėmis yra perkeliamas į ledą ir atšaldomas jame 15 min. Atšaldytos ląstelės surenkamos centrifuguojant 6018xg 30 s (surinkimui naudojami sterilūs 1,5 mL tūrio mėgintuvėliai). Kartojama tol, kol surenkama visa ląstelių biomasė. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1,5 mL atšaldytame NaCl tirpale (**2.7**) bei centrifuguojamos 6018xg 30 s. Tuomet supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1,5 mL atšaldytame $CaCl_2$ tirpale (**2.7**) ir inkubuojamos 60 min. Po inkubacijos ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės galutinai paruošiamos transformacijai užpylus ir suspendavus 200 µL atšaldytame $CaCl_2$ tirpale (**2.7**).

2.24 Kompetentinių *E.coli* ląstelių transformacija

Į 50 µL paruoštų kompetentinių *E.coli* DH5α ląstelių įdedama nuo 1 iki 10 µl (1 ng/µl - 100 ng/µl) transformuojančio DNR mišinio ir švelniai sumaišoma. Ląstelių ir DNR mišinys inkubuojamas 1 val. lede (galimas ilgesnis inkubavimo laikotarpis). Po to, vykdomas temperatūrinis šokas, mišinys perkeliamos į 45 °C temperatūros vandens vonelę ir inkubuojamas 42 s. Į atvėsusį iki kambario temperatūros mėginį pridedama 1 mL LB terpės be ampicilino ir 1 val. inkubuojama 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min. greičiu. Po inkubacijos vykdomas ląstelių surinkimas centrifuguojant 6018xg 30 s. Paliekama 50 µL supernatanto, likusioji dalis pašalinama. Tuomet ląstelių biomasė suspenduojama ir užsėjama ant LB agarizuotos terpės su ampicilinu (**2.9**). Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje per naktį.

2.25 Kolonijų tikrinimas PGR metodu

Naudojama „DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)”, gamintojas „Thermo Fisher Scientific”.

Vienos reakcijos mišinio sudėtis:

Medžiagos	Tūris, µL
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10
10 µM pradmuo Nr. 1	1
10 µM pradmuo Nr. 2	1
MilliQ H_2O	7

Naudojamos mielių ir bakterijų ląstelės turi būti 1 dienos šviežumo. PGR reakcija vykdoma termocikleryje „iCycler" („Biorad"). Nustatomos PGR sąlygos:

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklai
Pradinė denatūracija	95 °C	3 min.	1
Pradmenų prilydimas	**X °C**	30 s	30
DNR prailginimas	72 °C	**Y s**	
Denatūracija	95 °C	30 s	
Pradmenų prilydimas	**X °C**	30 s	1
Galutinis DNR prailginimas	72 °C	5 min.	
Palaikymas	20 °C	∞ min.	

X - apskaičiuojamas naudojant internetinę skaičiuoklę „Thermo Fisher Scientific Tm calculator": (https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html).
Y - apskaičiuojamas pagal sekos ilgį ir naudojamos „DreamTaq" polimerazės sintezės greitį (1 min/kb).

2.26 Plazmidinės DNR išskyrimas iš *E.coli* šarminės lizės metodu

Sterilia mikrobiologine kilpele nuo Petri lėkštelės užsėjama viena *E.coli* kolonija į 5mL LB terpės su ampicilinu (**2.9**). Ląstelės auginamos per naktį (16-18 val.) purtant 220 aps/min. greičiu, esant 37 °C temperatūrai. Po kultivavimo visa ląstelių biomasė yra surenkama centrifuguojant 5 min. 4 °C temperatūroje 17161xg (naudojami 2 mL tūrio mėgintuvėliai). Supernatantas pašalinimas, o ląstelės užpilamos 100 µL GTE buferiniu tirpalu (**2.6**) bei 2 µL Rnazės A/T1 tirpalu (**2.5**) (jeigu plazmidė bus naudojama mielių transformacijoje Rnazės tirpalo naudoti nereikia). Tuomet visas mėginys suspenduojamas ir užpilama 200 µL lizės mišinio tirpalo (**2.6**). Mėginys keletą kartų pavartomas ir 5 min. inkubuojama ledo vonelėje. Po to įpilama 150 µL 5 M kalio acetato tirpalo (**2.6**), sumaišoma ir 5 min. inkubuojama ledo vonelėje. Po inkubacijos mėginys centrifuguojamas 3 min. 4 °C temperatūroje 17161xg. Atsargiai, nepaliečiant nuosėdų, nusiurbiamas skystis ir perkeliamas į naują 1,5 mL tūrio mėgintuvėlį bei užpilamas tokiu pačiu tūriu izopropanolio (**2.3**). Mišinys inkubuojamas 10 min. kambario temperatūroje. Tuomet tirpalas centrifuguojamas 3 min. kambario temperatūroje 20238xg, skystis nupilamas, o nuosėdos praplaunamos 2 kartus su 500 µL 70% EtOH (**2.6**). Toliau centrifuguojama 3 min. kambario temperatūroje 20238xg. Po paskutinio centrifugavimo nuosėdos atsargiai nusausinamos su filtrinio popieriaus juostele bei suspenduojamos 50 µL sterilaus MilliQH_2O.

2.27 Plazmidinės DNR valymas PEG/$MgCl_2$

Plazmidinės DNR, išskirtos šarminės lizės metodu (**2.26**), paruošimas sekvenavimui. DNR sumaišoma su PEG-8000/$MgCl_2$ tirpalu (**2.6**) santykiu 1:1 ir inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. Tuomet centrifuguojama 5 min. kambario temperatūroje 20238xg. Tirpalas pašalinamas, nuosėdos užpilamos 500 µL 70% EtOH (**2.6**). Toliau centrifuguojama 3 min. kambario temperatūroje 20238xg. Praplovimo žingsnis kartojamas 2 kartus. Tuomet, nuosėdos suspenduojamas minimaliame MilliQH_2O tūryje.

2.28 Plazmidžių restrikcinė analizė

Restrikcinė analizė atliekama pagal gamintojo „Thermo Fisher Scientific" rekomendacijas. Restrikcinis karpymas vykdomas 1 val. 37 °C temperatūroje. Sukarpyta žiedinė DNR plazmidė analizuojama DNR elektroforezės agarozės gelyje metodu (**2.18**). Reakcijos mišinio sudėtis: 1 µL plazmidės (2,5-5 µg), 1 µL 10x restrikcijos endonukleazės buferio, 2,5 µL restrikcijos endonukleazės (10 U/µL) ir dH_2O iki 47,5 µL tūrio.

2.29 *S.cerevisiae* ląstelių ruošimas transformacijai

Naudojamos mielių ląstelės turi būti ne senesnės nei vienos savaitės laiko. Nuo agarazituos YEPD terpės Petri lėkštelėje su strerilia mikrobiologine kilpele mielės yra užsėjamos į 5 mL stulpelį su mitybine YEPD terpe be formaldehido (**2.10**) ir auginama per naktį (16-18 val.) purtant 200 aps/min. greičiu 30 °C temperatūroje. Po naktinio auginimo 1 mL kultūros yra persėjama į naują 5 mL stulpelį su mitybine YEPD terpe be formaldehido (**2.10**) ir auginama 3 val. 30 °C temperatūroje, purtant 200 aps/min. greičiu. Po auginimo ląstelės yra perkeliamos į sterilų 50 mL tūrio konusinį mėgintuvėlį ir surenkamos centrifuguojant 3 min. kambario temperatūroje 3000xg greičiu. Supernatantas pašalinimas, likusios ląstelės suspenduojamos 20 mL TE buferiniu tirpalu (**2.7**). Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas pašalinamas. Tuomet mielės suspenduojamos 3 mL 0,1 M LiCl tirpalu (**2.7**) ir inkubuojamos 1 val. 30 °C temperatūroje (nepurtyti). Po inkubacijos, ląstelės pernešamos į 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius ir centrifuguojama 30 s 7000xg greičiu, supernatantas pašalinamas. Galiausiai, ląstelės suspenduojamos supernatanto likučiuose - paruošiamos transformacijai.

2.30 Kompetentinių *S.cerevisiae* kultūrų transformacija

Į 15 µL paruoštų kompetentinių mielių ląstelių įpilama 5 µL šarminės lizės metodu (**2.26**) išskirtos plazmidinės DNR (su RNR priemaišomis). Mišinys švelniai sumaišomas ir laikomas 20 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ant ląstelių užpilami 40 µL (2 tūriai) 50 % PEG-3350 tirpalo (**2.7**) ir laukiama 50 min. 30 °C temperatūroje. Toliau ląstelės yra perkeliamos į 42 °C vandens vonelę ir inkubuojamos 35 min. - vykdomas temperatūrinis šokas. Po temperatūrinio šoko mielių ląstelės atplaunamos nuo PEG-3350 su 800 µL TE buferiniu tirpalu (**2.7**). Visas mišinys švelniai suspenduojamas ir centrifuguojama 30 s kambario temperatūroje 7000xg greičiu. Supernatantas pašalinamas. Toliau vykdomas ląstelių gaivinimas: mielės suspenduojamos 1 mL skystoje YEPD terpėje be formaldehido (**2.10**) ir inkubuojama 18 val. 30 °C temperatūroje be purtymo (mėgintuvėlio viršuje būtina pradurti skylutę). Po gaivinimo, ląstelės centrifuguojamos 30 s kambario temperatūroje 7000xg greičiu. Dalis supernatanto pašalinama, o kitoje dalyje suspenduojamos ląstelės, kurios užsėjamos ant agarizuotos YEPD su formaldehidu (FDH) terpės (**2.10**) ir auginamos 48 val. 30 °C temperatūroje.

2.31 Tikslinio baltymo raiška mielėse *S.cerevisiae*

Raiškos tyrimuose yra naudojamos ne senesnės nei 2 parų mielių ląstelės. Sterilia mikrobiologine kilpele paimama šviežia *S.cerevisiae* vienos kolonijos biomasė (kilpelės

dydžio) ir užsėjama į 20 mL skystos YEPD terpės, papildytos formaldehidu (FDH) (**2.10**). Ląstelės auginamos 24 val. purtant 200 aps/min. greičiu 30 °C temperatūroje. Po auginamo ląstelių suspensija perkeliama į sterilų 50 mL konusinį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min. kambario temperatūroje 2000xg greičiu. Supernatantas pašalinamas. Toliau vykdomas terpės pakeitimas ant ląstelių užpilant 20 mL skystos YEPGal terpės, papildytos FDH (**2.10**). Mielės suspenduojamos ir, šiuo atveju, indukuojamos 18 val. 30 °C temperatūroje purtant 200 aps/min. greičiu. Po indukcijos ląstelės perkeliamos į 50 mL konusinius mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 20 min. 4 °C temperatūroje 3000xg greičiu. Gauta ląstelių biomasė ir supernatantas yra atskiriami. Į supernatantą įpilama proteazių inhibitoriaus PMSF tirpalo (**2.17**) bei koncentruojama pagal metodiką (**2.37**). Mielių biomasė suspenduojama ir praplaunama 17,5 mM HEPES + 17,5 mM imdazolo (pH 7,2) buferiniu tirpalu (**2.16**). Tada centrifuguojama 20 min. 4 °C temperatūroje 3000xg greičiu. Praplauta ląstelių biomasė ardoma stiklo rutuliukais (**2.38**) tolimesniems tyrimams.

2.32 Kompetentinių *P.pastoris* ruošimas transformacijai

Naudojamos mielės *P.pastoris* neturėtų būti senesnės nei vienos savaitės. Su sterilia mikrobiologine kilpele užsėjamos šviežios mielių ląstelės į 20 mL skystos terpės YEPD (**2.10**) ir auginamos 18 val. 30 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu. Po auginimo dalis naktinės ląstelių kultūros persėjama į naują, 25 mL skystą YEPD terpę (**2.10**), kad ląstelių tankis siektų 0,1-0,2 optinius vienetus (esant 600 nm bangos ilgiui). Toliau auginama 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min. greičiu. Optinis tankis matuojamas kas 4 val., kol pasiekiami 1,3-1,5 optiniai vienetai (prie 600 nm bangos ilgio). Po to, ląstelės perkeliamos į sterilius 50 mL tūrio konusinius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 5 min. 4 °C temperatūroje 2500xg greičiu. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 5 mL skystos YEPD su HEPES buferiu terpėje (**2.10**). Į suspensiją pridedama 125 µL 1M DTT tirpalo (**2.7**), švelniai sumaišoma ir inkubuojama 15 min. 30 °C temperatūroje (nepurtant). Po inkubacijos ant ląstelių užpilama 20 mL šalto sterilaus dH_2O (nemaišoma) ir centrifuguojama 5 min. 4 °C temperatūroje 2500xg greičiu. Supernatantas pašalinamas ir nuo šio žingsnio likę darbai atliekami ledo vonelėje. Ląstelės suspenduojamos 1 mL šalto 1 M sorbitolio tirpalu (**2.7**) ir perkeliamos į sterilius 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius bei centrifuguojamos 4 °C temperatūroje 2500xg greičiu. 800 µL supernatanto pašalinama, likusioje dalyje suspenduojama mielių ląstelių biomasė, tinkama transformacijai.

2.33 Kompetentinių *P.pastoris* ląstelių transformacija

Steriliame 1,5 mL tūrio mėgintuvėlyje sumaišoma 40 µL kompetentinių *P.pastoris* ląstelių su 4 µL atjuostos ir 1 µL nekarpytos plazmidinės DNR (koncentracija ne mažesnė nei 0,5 µg/µL). Visas mišinys inkubuojamas 5 min. ledo vonelėje. Tuomet paruošiamas BTX aparatas, nustatoma 1,5 kV įtampa bei ledo vonelėje patalpinamos elektroporacijos kiuvetės. Po to, mielių ląstelių ir DNR mišinys patalpinamas į elektroporacijos kiuvetę, viduryje tarp dviejų elektrodų. Kiuvetė nusausinama ir dedama į BTX aparatą, spaudžiamas „Start" mygtukas. Ląstelės elektroporuojamos – įvyksta jų transformacija. Po to skubiai užpilama šalto 1 mL 1 M sorbitolio tirpalo (**2.7**) ir su automatine pipete sumaišoma. Mišinys perkeliamas į sterilius 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Tuomet 300 µL transformuotų ląstelių yra užsėjama ant selektyvinės agarizuotos MD terpės (**2.10**) ir auginama 3-4 paras 30 °C temperatūroje.

2.34 Rekombinantinių *P.pastoris* klonų atranka

Rekombinantinių klonų atranka vykdoma nuo agarizuotoje MD terpėje išaugusių klonų (**2.10**). Ant užaugusių ląstelių užpilama 3 mL sterilaus dH_2O, ląstelės suspenduojamos ir surenkamos į sterilius 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Pamatuojamas kultūros optinis tankis (prie

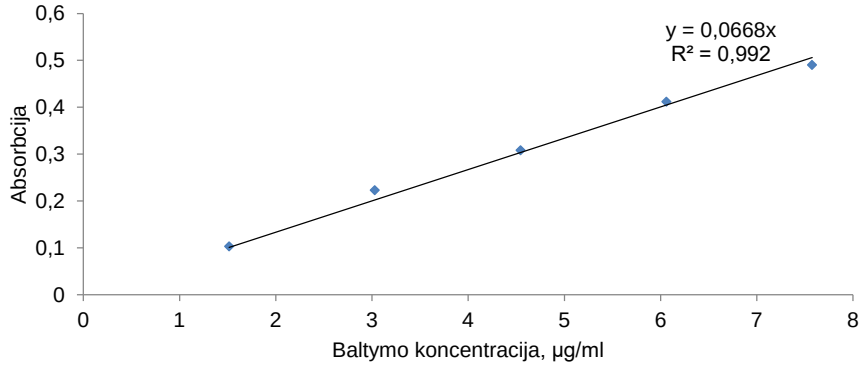
600 nm bangos ilgio) ir skiedžiama iki 0,1 optinio vieneto. Tuomet užsėjama 100 µL ląstelių suspensijos ant agrizuotos YEPD su geneticinu (geneticino koncentracijos 0,5 mg/mL ir 1 mg/mL) (**2.10**). Auginama 3-4 paras 30 °C temperatūroje.

2.35 Tikslinio baltymo raiška mielėse *P.pastoris*

Raiškos tyrimuose yra naudojamos ne senesnės nei 2 dienų mielių kolonijos. Sterilia mikrobiologine kilpele paimama viena mielių *P.pastoris* kolonija ir užsėjama į 20 mL skystos YEPG terpės (**2.10**). Ląstelės auginamos per naktį (16-18 val.) 30 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu. Po auginimo ląstelės perkeliamos į sterilius 50 mL konusinius mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 3 min. kambario temperatūroje 2000xg greičiu. Supernatantas pašalinamas, o ląstelių biomasė suspenduojamos į 20 mL skystos YEPM terpės (**2.10**). Tuomet, ląstelės perkeliamos atgal į kolbutes ir ląstelės indukuojamos 24 val. 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min. greičiu. Tolimesnės biomasės ir supernatanto atskyrimo bei analizės žingsniai yra atliekami pagal **2.31** metodiką, kaip mielėse *S.cerevisiae.*

2.36 Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu

Prieš taikant metodą, būtina pasidaryti kalibracinę kreivę. Kalibracinei kreivei sudaryti išpilstomas jaučio serumo albumino tirpalas (JSA) į 15 mL tūrio stiklinius mėgintuvėlius atitinkamais tūriais - 15, 30, 60, 90, 120 µL. Tuomet kiekvienas mėgintuvėlis papildomas iki 300 µL bendro tūrio atitinkamu kiekiu 0,15 M NaCl tirpalo (**2.12**). Kontrolinis mėginys - tik 300 µL 0,15 M NaCl tirpalo (**2.12**). Į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 3 mL Bradford'o reagento (**2.12**), sumaišoma ir inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje. Tiksliai po 2 min. spektrofotometru matuojama sugertis prie 595 nm ir braižoma kalibracinė kreivė:



2.1 pav. Kalibracinė kreivė Bradford'o metodikai, jaučio serumo albumino tirpalą naudojant kaip standartinį baltymą

Prieš naudojant būtina patikrinti Bradford'o reagento (**2.12**) kokybę. Tai atliekama pamatuojant absorbciją prie 465 nm bangos ilgio, kuri turi būti 1,3-1,5 ribose. Kaip kontrolė naudojamas distiliuotas vanduo.

Nežinomos baltymų koncentracijos tirpalas nustatomas į 30 µL tiriamųjų baltymų mišinį įpilant 270 µL 0,15 M NaCl tirpalo (**2.12**). Tuomet į mėgintuvėlį įpilama 3 mL Bradford'o reagento (**2.12**), sumaišoma ir inkubuojama 2 min. Tiksliai po 2 min. spektrofotometru matuojama sugertis prie 595 nm. Kontroliniame mėginyje sumaišomi 300 µL 0,15 M NaCl tirpalo (**2.12**) ir 3 mL Bradford'o reagento. Baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal formulę:

$$c = \frac{Abs}{tg\alpha} * n$$

kur:

c – nežinoma baltymų koncentracija, mg/mL;

Abs – sugertis išmatuota prie 595 nm bangos ilgio;

tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;
n – praskiedimas (reakcijos ir mėginio).

2.37 Baltymų koncentravimas

Baltymų koncentravimui naudojami ,,Amicon^R Ultra 10K" mėgintuvėliai. Koncentravimo procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas. Koncentravimo membranos prieš naudojimą yra praplaunamos 2 kartus su miliQH_2O centrifuguojant 20 min. kambario temperatūroje 2000xg greičiu. Po praplovimo koncentruojamas tiriamasis mėginys 4 °C temperatūroje 3000xg greičiu. Laikas priklauso nuo pageidaujamo koncentruoto mėginio tūrio.

2.38 Ląstelių ardymo metodas stiklo rutuliukais

Pasveriama ląstelių biomasė ir santykiu 1:10 (1 mg ląstelių:10 µL buferio) suspenduojama 17,5 mM HEPES + 17,5 mM imidazolo buferiniu tirpalu (pH 7,2) (**2.16**) bei pridedama 100 mM proteazių inhibitoriaus PMSF (**2.17**), jog pastarojo galutinė koncentracija tirpale siektų 1 mM. Toliau visos procedūros atliekamos ledo vonelėje. Tuomet ant ląstelių suspensijos užpilami stiklo rutuliukai santykiu 1 mL suspenduotų ląstelių:1 mL stiklo rutuliukų. Ląstelių ardymas atliekamas 15 min.: 30 s vorteksuojama su maišykle-mikseriu ,,Vortex-Genie 2" ir 30 s laikoma ledo vonelėje. Po ardymo su automatizuota pipete atsargiai nusiurbiamas supernatantas (grubus lizatas) ir perkeliamas į švarius 1,5 mL tūrio mėgintuvėlius. Dalis grubaus lizato pasiliekama tolimesniems tyrimams. Kita dalis mišinio yra centrifuguojama 20 min. 17136xg 4 °C temperatūroje. Taip atskiriamos tirpių ir netirpių (ląstelių nuolaužos) baltymų frakcijos. Supernatantas (tirpi baltymų fr.) perkeliamas į švarų mėgintuvėlį, o ląstelių nuolaužos praplaunamos 1mL 17,5 mM HEPES + 17,5 mM imidazolo buferiniu tirpalu (pH 7,2) (**2.16**). Tada nuolaužos suspenduojamos buferiniame tirpale, tūris turėtų būti panašus, koks ir nusiurbtos tirpios baltymų frakcijos.

2.39 Baltymų elektroforezės NDS-PAGE natyviomis ir denatūruojančiomis sąlygomis metodai

Paruošiama DNR elektroforezės įranga: nuvalomi vidiniai stiklo plokštelės paviršiai 99,8 % EtOH ir surenkamas rėmelis. Tuomet gaminamas 12 % arba 15 % skiriamasis gelis. Įpylus į mišinį paskutinį komponentą TEMED (polimerizacijos katalizatorių) tirpalas sumaišomas ir skubiai supilamas į surinktą elektroforezės rėmelį. Ant viršaus užpilama dH_2O ir laukiama 20-30 min. kol sustingsta gelis. Po 20-30 min. vanduo nupilamas ir ant skiriamojo gelio yra užpilamas 4 % koncentruojamasis gelis. Po to atsargiai įdedamos pasirinkto dydžio šukutės ir paliekama polimerizuotis 20 min. Po polimerizacijos šukutės ištraukiamos, o elektroforezės rėmelis su geliu yra perkeliamas į vertikalią baltymų elektroforezės kamerą, kuri užpildoma 1x elektroforezės buferiniu tirpalu (**2.13**). Natyvios elektroforezės metu yra naudojamas be NDS 1x elektroforezės buferinis tirpalas (**2.14**). Iš pradžių elektroforezė vykdoma nustačius 100 V įtampą, kai pasiekiamas skiriamasis sluoksnis įtampa didinama iki 150 V.

Mėginių paruošimas elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis: baltymų mėginiai yra sumaišomi su 2x elektroforetiniu dažu (**2.13**), turinčiu 5 % 2-merkaptoetanolio santykiu 1:1. Tuomet mišinys pakaitinamas 5 min. 95 °C temperatūroje. Mėginio į šulinėlius įnešama 2-20 µL, o baltymų molekulinės masės standarto 3 µL (**2.3**). Natyviomis sąlygomis: baltymų mėginiai yra sumaišomi su 5x elektroforetiniu dažu (**2.14**) santykiu 4:1 atitinkamai. Toks mišinys tiesiogiai naudojamas elektroforezėje. Įnešamas maksimalus kiekis telpantis šulinėlyje.

Gelio sudėtis kai elektroforezė leidžiama *denatūruojančiomis sąlygomis*:

12 % skiriamasis gelis	**15 % skiriamasis gelis**	**4 % koncentruojamasis gelis**
2000 µL 30 % AA ir BAA tirpalo	3750 µL 30 % AA ir BAA tirpalo	335 µL 30 % AA ir BAA tirpalo
1250 µL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1875 µL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	625 µL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
50 µL 10 % NDS	75 µL 10 % NDS	50 µL 10 % NDS
1585 µL dH_2O	1688 µL dH_2O	1500 µL dH_2O
25 µL 10 % APS	75 µL 10 % APS	12,5 µL 10 % APS
2,5 µL TEMED	7,5 µL TEMED	2,5 µL TEMED

Gelio sudėtis kai elektroforezė leidžiama *natyviomis sąlygomis*:

15 % skiriamasis gelis	**4 % koncentruojamasis gelis**
3750 µL 30 % AA ir BAA tirpalo	335 µL 30 % AA ir BAA tirpalo
1875 µL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	625 µL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
1763 µL dH_2O	1550 µL dH_2O
75 µL 10 % APS	12,5 µL 10 % APS
7,5 µL TEMED	2,5 µL TEMED

Tirpalų sudėtyss nurodytos poskyriuose **2.13** ir **2.14**. Po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis gelis yra praplaunamas dH_2O. Tuomet perkeliamas į indelį su dH_2O, pakaitinama mikrobangų krosnelėje ir inkubuojama 5 min. purtant. Šis žingsnis kartojamas 2 kartus. Vanduo pašalinimas, ant gelio užpilama „Commassie Blue R-250" dažo (**2.13**) ir inkubuojama 20 min. kambario temperatūroje purtant (laikyti tamsiai). Po inkubacijos gelis atplaunamas keičiant pakaitiną dH_2O.

2.40 Protonograma

Po elektroforezės natyviomis sąlygomis (**2.39**) gelis yra patalpinamas į indą su 100 mM Tris-HCl ir 10 % izopropanolio tirpalu (pH 8,2) (**2.15**) ir plaunamas 10 min. kambario temperatūroje purtant. Žingsnis kartojamas 2 kartus. Po praplovimo tirpalas pašalinamas, o gelis užpilamas 25 mL bromtimolio mėlio dažo tirpalu (**2.15**) ir inkubuojamas 30 min. kambario temperatūroje purtant (laikyti tamsiai). Po inkubacijos dažas nupilamas. Tuomet elektroforezės gelis panardinamas į CO_2 substratinį tirpalą (**2.15**) ir švelniai purtomas, tol kol ima ryškėti tikslinio baltymo fragmentai.

2.41 Hidratacinio karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su fenolio raudonuoju

Mėgintuvėlyje sumaišoma 2,5 mL 0,033 mM fenolio raudonojo (**2.16**), 400 µL 25 mM HEPES (pH 8,2) buferinio tirpalo (**2.16**), 100 µL CO_2 substratinio tirpalo (**2.16**). Reakcija inicijuojama pridedant 100 µL tiriamojo fermentinio tirpalo. Sugerties kitimas fiksuojamas su spektrofotometru (*angl*. Spekol 2000) 300 nm-700 nm bangos ilgio ribose. Įvertinama ir kontrolių i) be fermentinio tirpalo, ii) be substratinio tirpalo, ir iii) be fenolio raudonojo įtaka sugerties pokyčiui.

2.42 Karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su p-nitrofenilo acetatu

1,8 mL substratinio tirpalo (**2.16**) įpilama į kiuvetę. Hidrolizės reakcija inicijuojama pridedant 0,2 mL tiriamojo fermentinio tirpalo. Stebimas sugerties pokytis prie 400 nm bangos ilgio.

Kontroliniame mėginyje tiriamasis fermentinis tirpalas pakeičiamas buferiniu 25 mM HEPES (pH 8,2) tirpalu (**2.16**).

2.43 Karboanhidrazės aktyvumo nustatymo metodas su indoksilo acetatu

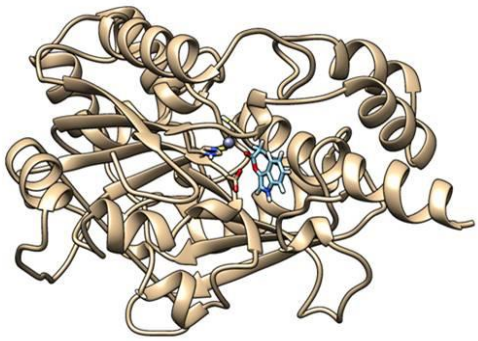
201 µL 17,5 mM HEPES + 17,5 mM imdazolo buferio (pH 8,2) (**2.16**), 24 µL 10 mM indoksilo acetato tirpalo (substratas) (**2.16**) bei 25 µL tiriamojo fermentinio tirpalo įpilama į plokštelės šulinėlį (*angl*. 96-Well plate). Plokštelė padengiama apsaugine plėvele ir spektrofotometru matuojama sugertis prie 375 nm bangos ilgio 37 °C temperatūroje 2 val. Naudojamos 2 kontrolės: i) be fermentinio tirpalo ar/ir ii) be substratinio tirpalo. Skaičiavimuose naudojamo ekstinkcijos koeficiento reikšmė yra 0,254 mM^{-1}/cm^{-1} (Sunarko et al., 2005). Reakcijos greitis (v) apskaičiuojamas:

$$v = \frac{tg\ \alpha}{\varepsilon} * \frac{V_r}{V_f}$$

kur:
tg α – nuokrypio kampas;
ε – ekstinkcijos koeficientas (mM^{-1}/cm^{-1});
V_r – reakcijos tūris, mL;
V_f – fermentinio mėginio tūris, mL.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame skyriuje bus aptariami rezultatai gauti tiriant *β-cab* geno klonavimą ir raišką *S.cerevisiae* bei *P.pastoris* mielių sistemose. Tyrimuose buvo naudojamas *β-cab* genas, kurį išskyrė Rimantas Šiekštelė (TBS BTI) iš gramteigiamos bakterijos *Bacillus mojavensis* (**3.1 pav.**). Genas koduoja 21 kDa dydžio fermentą β-karboanhidrazę.

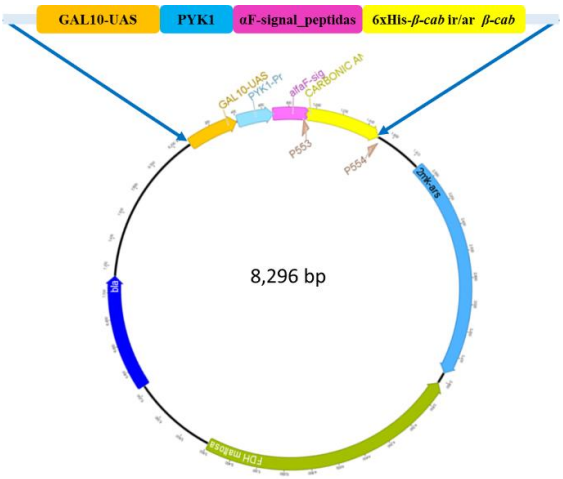


3.1 pav. β-KA iš *Bacillus mojavensis* modelinė struktūra (modeliavo dr. Visvaldas Kairys)

3.1 *β-cab* geno klonavimas ir raiška *S.cerevisiae*

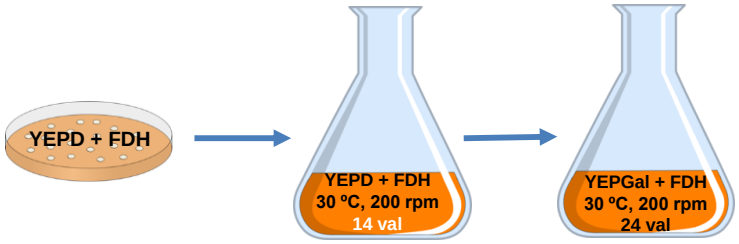
Pirmoji tirta raiškos sistema buvo mielėse *S.cerevisiae*. Šios mielės pasirinktos dėl daugelio savybių: toleruoja platų pH intervalą, jose funkcionuoja αF signalinis peptidas, dalyvaujantis baltymo sekrecijoje į užląstelinę terpę, neturi pirogenų bei yra pripažintos kaip GRAS organizmas (Baghban et al., 2019; Celik ir Calik, 2012). Išvardintos savybės atveria plačias galimybes panaudoti šias mieles baltymų sintezei.

Baltymų raiškai mielių *S.cerevisiae* sistemoje buvo naudojamas iš dr. Almos Gedvilaitės (EGIS BTI) gautas šaudyklinis vektorius pFX7αF su specifiniais molekuliniais žymenimis (**3.2 pav.**). Efektyvią baltymo raišką užtikrina galaktozės indukuojamas (represuojamas gliukoze) piruvatkinazės promotorius - *PYK1*. Selektyvinį spaudimą bei rekombinantinių klonų atranką *E.coli* transformantuose įgalina atsparumą ampicilinui nulemiantis genas *bla,* o mielėse - formaldehidrogenazę (FHD) koduojantis genas *FDH*1 (Sasnauskas et al., 1992). Raiškos sistemoje taip pat galima aptikti ir *α*F signalinį peptidą koduojančią seką, kuri nulemia tikslinio baltymo sekreciją į ląstelės išorę (supernatantą).



3.2 pav. Mielių *S.cerevisiae* raiškos vektorius pFX7αF su tiksliniu genu

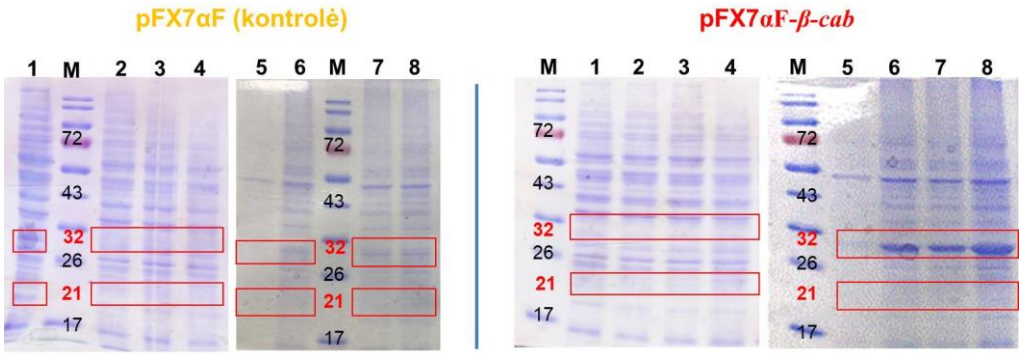
β-cab klonavimo, plazmidės konstravimo (homologinės rekombinacijos principu bakterijose *E.coli* DH5α) bei pradiniai raiškos mielėse įvertinimo darbai buvo atlikti tiriamojo bakalaurinio darbo metu (Baliukynas M., 2018). Tyrimų metu *S.cerevisiae* AH22-214 rekombinantai, turinys konstruktą pFX7αF-*β-cab* (su tiksliniu genu) ir kontroliniai - pFX7αF (be tikslinio geno), buvo auginami 14 val. YEPD terpėje papildytoje formaldehidu (FDH), esant 30 °C temperatūrai, purtant 200 aps/min. greičiu. Po auginimo ląstelės buvo perkeliamos į indukcinę YEPGal terpę su formaldehidu (FHD) ir inkubuojamos dar 24 val. 30 °C temperatūroje, purtant 200 aps/min. greičiu (2.31) (**3.3 pav.**).



3.3 pav. Rekombinantinių *S.cerevisiae* klonų kultivavimo schema

Mėginiai buvo imami po 6, 24, 30, 48 val. Supernatantas ir ląstelių biomasė atskiriami centrifuguojant. Supernatantas koncentruojamas naudojant 10 kDa pralaidumo membraną (2.37). Ląstelių biomasė suardoma stiklo rutuliukais. Gaunamos tirpi bei netirpi (nuolaužos) baltymų frakcijos, kurios atskiriamos centrifuguojant (2.38). Tuomet atliekama supernatanto, tirpios bei netirpios (nuolaužos) baltymų frakcijų analizė NDS-PAGE gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Rezultatai parodė, jog didžioji dalis produkuoto rekombinantinio baltymo buvo netirpios būsenos t.y., aptinkamas ląstelių nuolaužose (**3.4 pav. takeliai Nr. 6, Nr. 7, Nr. 8**). Taip pat pastebėta, jog baltymo molekulinė masė, lyginat su teorine, padidėjo per 10 kDa (**3.4 pav. takeliai Nr. 6, Nr. 7, Nr. 8**), kas atitinka αF

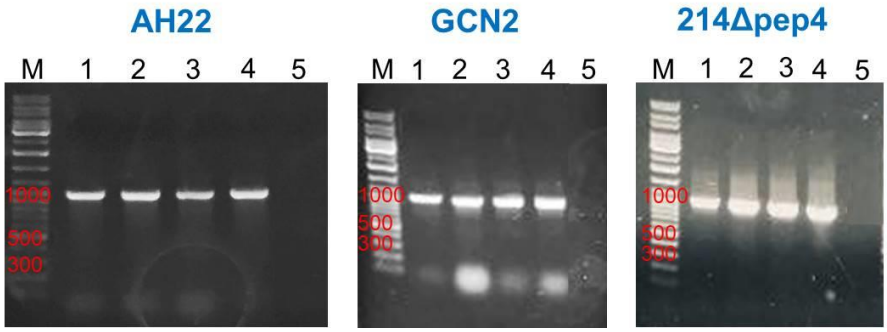
signalinio peptido dydį. Deja, NDS-PAGE gelyje tikslinio baltymo nei supernatante (duomenys nepateikti) nei tirpių baltymų frakcijoje (**3.4 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3 Nr. 4**) nebuvo aptikta dėl galimai per žemo tirpaus baltymo sintezės lygio. Kaip ir tikėtasi, rekombinantinės karboanhidrazės nebuvo nustatyta kontroliniuose mėginiuose (**3.4 pav. pFX7αF**).



3.4 pav. Rekombinantinių *S.cerevisiae* AH22-214: pFX7αF-*β-cab* klonų tirpios ir netirpios baltymų frakcijos analizė NDS-PAGE gelyje skirtingais laiko intervalais 30 °C temperatūroje. **Tirpi baltymų frakcija**: **1** – 6 val.; **2** – 24 val.; **3** – 30 val.; **4** – 48 val. **Netirpi baltymų frakcija (nuolaužos)**: **5** – 6 val; **6** – 24 val.; **7** – 30 val.; **8** – 48 val.; **M** – molekulinės masės standartas, kDa

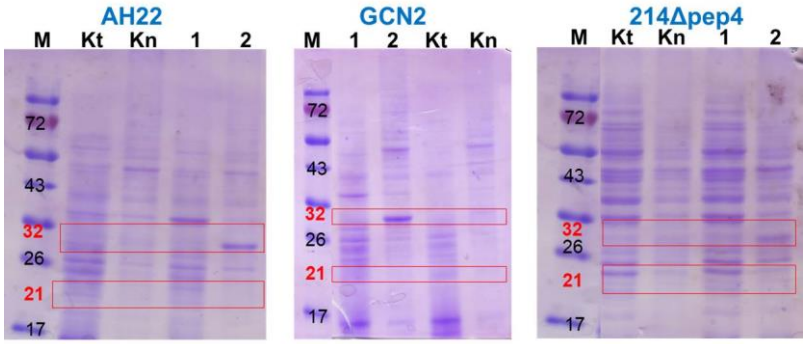
Kadangi *β-cab* geno raiška rekombinantinėse mielėse *S.cerevisiae* AH22-214 vyko labai efektyviai, nors ir didžioji dalis tikslinio baltymo buvo sintetinama netirpios būsenos. Tad magistrinio tiriamojo darbo metu buvo nuspręsta atlikti detalesnius tyrimus, kurių metu būtų bandoma padidinti gaminamo tirpios būsenos rekombinantinio baltymo kiekį. Vienas iš tokių buvo skirtingų *S.cerevisiae* kamienų įtakos įvertinimas baltymo sintezei.

Dažnai mokslinėse publikacijose kalbant apie mielių raiškos sistemas yra išskiriama ir skirtingų mutantinių mielių kamienų įtaka sintetinamo baltymo koncentracijai bei sekrecijos lygiui. Pavyzdžiui, α-amilazės išeigos ir sekrecijos lygis gali skirtis net iki 4 kartų skirtinguose mielių kamieno mutantuose (Huang et al., 2017). Todėl ir šiame darbe, siekiant įvertinti skirtingų mutacijų įtaką rekombinantinio baltymo produkcijai, plazmidėmis pFX7αF-*β-cab* ir pFX7αF (kontrolė) buvo transformuoti laukinio genotipo GCN2, mutantininių genotipų AH22 (*MATa leu23 leu2112 his4519 can1*) ir 214Δpep4 (*a ura3 leu2 his3 Δpep4*) mielių kultūros (2.30). Gauti rekombinantiniai klonai buvo analizuojami PGR metodu (2.25), naudojant P529 ir P530 pradmenų porą. DNR elektroforezė (2.18) parodė, jog mielių transformacija buvo sėkminga, gauti 1018 bp ilgio konstruktų pFX7αF-*β-cab* fragmentai, atitinkantys teorinį dydį (**3.5 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4**).



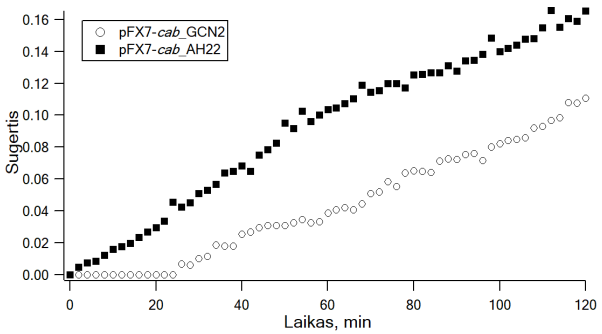
3.5 pav. Rekombinantinių *S.cerevisiae* AH22, GCN2 ir 214Δpep4 klonų atranka PGR metodu. **1, 2, 3, 4 takeliai** – transformuoti klonai, turintys plazmidę pFX7αF-*β-cab*. **5 takelis** – tuščia (neigiama) kontrolė. **M** – DNR dydžio standartas, bp

Tuomet, siekiant išsiaiškinti kaip skirtinguose kamienuose keičiasi rekombinantinės β-karboanhidrazės sintezės bei sekrecijos į ląstelės išorę efektyvumas, buvo pasirinkti skirtingų mielių kamienų AH22, GCN2, 214Δpep4 klonai pažymėti **Nr. 1** (**3.5 pav**.) ir auginami 14 val. YEPD terpėje, papildytoje formaldehidu (FDH) 37 µM galutinės koncentracijos, esant 30 °C temperatūrai ir purtant 200 aps/min. greičiu. Po 14 val. ląstelės perkeliamos į indukcinę terpę ir inkubuojamos 24 val. tomis pačiomis sąlygomis. Po indukcijos ląstelės buvo atskirtos nuo supernatanto centrifuguojant (2.31). Supernatantas koncentruojamas su 10 kDa pralaidumo membrana (2.37). Ląstelių biomasė ardoma stiklo rutuliukais. Gaunamas grubus lizatas, kuris centrifuguojamas ir atskiriamos tirpi bei netirpi (nuolaužos) baltymų frakcijos (2.38). Tuomet atliekama NDS-PAGE analizė denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Rezultatai parodė, kad tikslinio baltymo kiekis ir būsena nepriklauso nuo kamieno tipo - baltymas aptiktas tik neištirpusių baltymų frakcijoje (**3.6 pav. takeliai Nr. 2**). Kaip ir ankstesniuose *β-cab* raiškos kamiene AH22-214 tyrimuose, sintetinama rekombinantinė β-karboanhidrazė buvo su αF signaliniu peptidu (fermento molekulinė masė padidėjo 10 kDa lyginant su teoriniu dydžiu). Iš rezultatų matyti, kad, procesingo metu nuo baltymo nėra nukerpamas signalinis αF peptidas ir kartu prarandama tinkama β-KA erdvinė struktūra. Tuo tarpu tirpios būsenos tikslinio baltymo, nepriklausomai nuo naudojamo kamieno, nebuvo nustatyta NDS-PAGE gelyje (**3.6 pav. takeliai Nr. 1**), greičiausiai dėl metodo mažo jautrumo ir per mažos baltymo koncentracijos. Supernatanto analizė NDS-PAGE gelyje (rezultatai nepateikiami) taip pat nepatvirtino, kad β-KA buvo sekretuojama į užląstelinę terpę.



3.6 pav. *β-cab* raiškos *S.cerevisiae* kamienuose AH22, GCN2 ir 214Δpep4 analizė NDS-PAGE gelyje. **1** – pFX7αF-*β-cab* (**tirpi baltymų fr.**); **2** – pFX7αF-*β-cab* (**netirpi baltymų fr.**); **Kt** – pFX7αF (**tirpi baltymų fr.**); Kn – pFX7αF (**netirpi baltymų fr.**); M – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Kadangi NDS-PAGE nėra itin tinkamas metodas identifikuoti baltymus, esant jų mažiems kiekiams, buvo pasitelkta apie 1000 kartų jautresnė KA fermentinio aktyvumo nustatymo metodika, kuri paremta indoksilo acetato hidrolize, katalizuojant karboanhidrazei ir kurios metu susidaro acetatas bei indoksilas (Baliukynas et al., 2020). Tyrime buvo naudojami mielių klonai, turintys pFX7αF-*β-cab* arba pFX7αF konstruktus (GCN2, AH22, 214Δpep4 kamienai). Iš pradžių buvo paruošti tiriamieji mėginiai, suvienodinamos transformantų tirpių baltymų frakcijų koncentracijos iki 3 mg/mL. Tuomet 201 µL 17,5 mM HEPES + 17,5 mM imdazolo buferio (pH 8,2), 24 µL 10 mM indoksilo acetato tirpalo buvo įpilama į plokštelės šulinėlį (*angl*. 96-Well plate). Reakcija inicijuojama pridedant 25 µL paruošto tiriamojo fermentinio tirpalo. Plokštelė patalpinama į spektrofotometrą, kur 2 val. buvo fiksuojama sugertis prie 375 nm bangos ilgio 37 °C temperatūroje (2.43). Kontrolinių mėginių reakcijos mišiniai buvo ruošiami be substrato ir fermentinio tirpalo. Apskaičiuojamas tirpių baltymų frakcijų (iš klonų pFX7αF-*β-cab,* pFX7αF, atitinkamai) sugerties reikšmės skirtumas. Apdoroti ir grafiškai pateikti duomenys parodė sugerties didėjimo priklausomybę nuo laiko, kas patvirtino, jog β-karboanhidrazė buvo sintetinama tirpios ir aktyvios būsenos rekombinantiniuose *S.cerevisiae* AH22 ir GCN2 klonuose (**3.7 pav.**). Deja, rekombinantinių mielių 214Δpep4 klono tirpioje baltymų frakcijoje, KA aktyvumo nebuvo nustatyta.



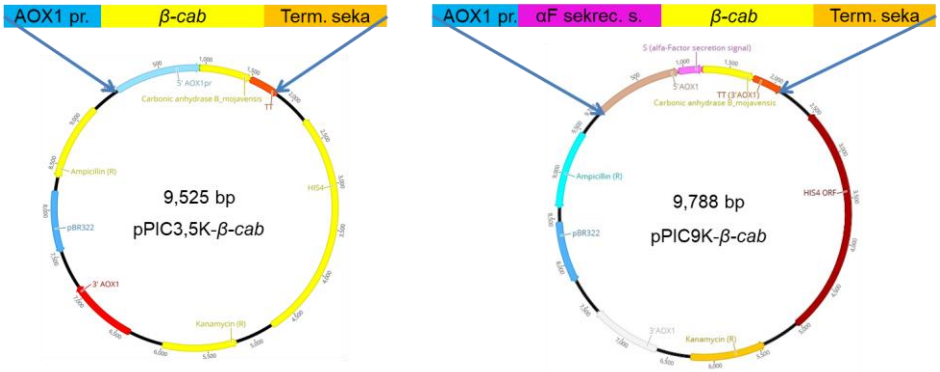
3.7 pav. Rekombinantinių mielių kamienų AH22 ir GCN2 produkuojamos KA katalizuojama inodiksilo acetato hidrolizė

Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, jog mielių *S.cerevisiae* raiškos sistema gali būti pritaikoma β-karboanhidrazės sintezei, nors ir didžioji dalis rekombinantinio baltymo buvo aptinkama netirpioje baltymų frakcijoje (nuolaužose), t.y. produkuojama netirpios būsenos. Tačiau reikėtų atlikti detalesnius tyrimus, kurių tikslas būtų išsiaiškinti priežastis dėl, kurių yra limituojama tirpios būsenos baltymo produkcija bei sekrecija į ląstelės išorę. Tuo tarpu, šiame tiriamajame buvo nuspręsta išbandyti kitą raiškos sistemą mielėse *P.pastoris*.

3.2 Heterologinės karboanhidrazės klonavimas ir raiška *P.pastoris* mielėse

Antroji tirta raiškos sistema buvo mielėse *P.pastoris (Komagataella phaffii)*. Pastaruoju metu šios mielės vis dažniau naudojamos rekombinantinių baltymų gamyboje dėl puikių savybių: greitas ląstelių augimas, siauras glikozilinimo spektras, žemas šeimininko baltymų sekrecinis lygis, GRAS organizmas (Weinacker et al., 2014; Daly ir Hearn, 2005; Safder et al., 2018).

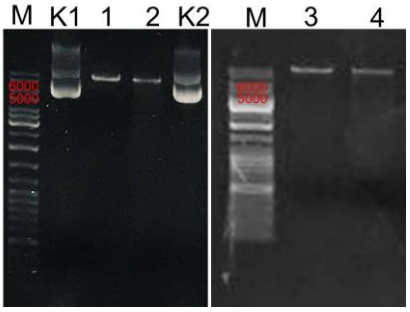
Šiame tiriamajame darbe buvo naudojami 2 šaudykliniai raiškos vektoriai pPIC3,5K (viduląstelinio baltymo produkcijai) ir pPIC9K (baltymo sekrecijai į ląstelės išorę), gauti iš dr. R. Slibinsko (EGIS BTI) (**3.8 pav.**). Šių vektorių konstrukcijose panaudotas metanoliu indukuojamas alkoholoksidazės promotorius - *AOX1*, taip pat selektyvinis žymuo teigiamų *E.coli* klonų atrankai, kuris nulemia atsparumą ampicilinui - *bla* genas (Ampicilin(R)). Kadangi naudojamas mielių kamienas GS115 yra *his*$^-$, ląstelių išgyvenamumui būtina mitybinė terpė, kurioje būtų gausu histidino aminorūgšties arba vektorius, kuris užtikrintų šios a.r. gamybą. Kartu tokia savybė yra pritaikoma ir pirminių transformantų atrankai, kai ląstelės auginamos ant minimalios MD terpės (be aminorūgščių), todėl išgyvena klonai, turintys plazmidę pPIC3,5K arba pPIC9K. Tuo tarpu, mielių klonų su skirtingu plazmidžių kopijų skaičiumi genome atranką užtikrina geneticinui atsparumą nulemiantis genas *Kan*. Vienintelis ir esminis skirtumas tarp minėtų vektorių yra tai, jog pPIC9K turi seką, kuri koduoja αF signalinį peptidą, užtikrinantį tikslinio baltymo sekreciją į užląstelinę terpę.



3.8 pav. Raiškos vektoriai pPIC3,5K ir pPIC9K su tiksliniu *β-cab* genu

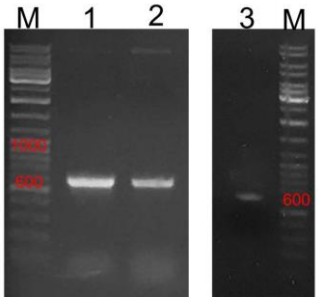
3.2.1 *β-cab* klonavimas į šaudyklinius raiškos vektorius pPIC3,5K bei pPIC9K

Pradinius plazmidžių pPIC3,5K ir pPIC9K analizės bei pagausinimo darbus atliko Kamilė Šepetytė (TBS BTI). Gauti *E.coli* transformantai, turintys konstruktus pPIC3,5K bei pPIC9K, buvo užsėjami į 5 mL skystos LB terpės su ampicilinu ir auginami per naktį (16-18 val.) 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min. greičiu. Šarminės lizės metodu (2.26) iš klonų buvo išskiriamos pPIC3,5K ir pPIC9K plazmidės (**3.9 pav. takeliai K1 ir K2,** atitinkamai). Tuomet, buvo paruošiami vektoriaus galai tikslinio geno klonavimui, t.y., pPIC3,5K plazmidė kerpama specifinėse vietose su restriktazėmis *Not*I bei *BamH*I, vektorius pPIC9K - su *Not*I ir *SnaB*I (2.28). Po DNR elektroforezės (2.18) gelyje buvo galima matyti, jog visos restrikcijos endonukleazės įvykdė kirpimą, t.y, vektoriai buvo atjuosti (**3.9 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4**). Kadangi restriktazių optimalūs veikimo buferiai buvo skirtingi, reakcija turėjo būti vykdoma skirtinguose mėgintuvėliuose. Po vektoriaus pirminės hidrolizės, buvo vykdomas plazmidės išsodinimas etanoliu, taip buvo apkeičiamas buferis bei restrikcijos endonukleazė, pavyzdžiui, vektorių kirpusi *Not*I restriktazė pakeičiama į *BamH*I. Kirpimas vėl buvo vykdomas 1 val. 37 °C temperatūroje (2.28).



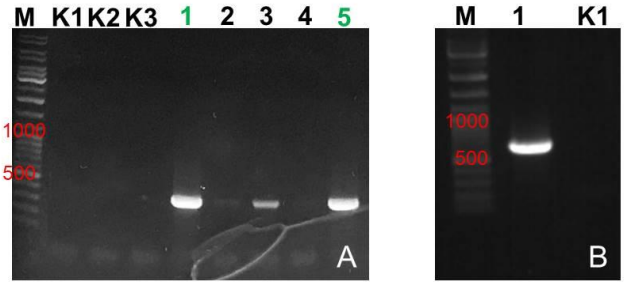
3.9 pav. Plazmidžių pPIC3,5K ir pPIC9K (be tikslinio geno) restrikcinė analizė. **K1** – pPIC3,5K plazmidė; **1** – pPIC3,5K plazmidė karpyta su *BamH*I; **2** – pPIC3,5K plazmidė karpyta su *Not*I; **K2** – pPIC9K plazmidė; **3** – pPIC9K plazmidė karpyta su *SnaB*I; **4** – pPIC9K plazmidė karpyta su *Not*I; **M** – DNR dydžio standartas, bp

Geno įterpimas į raiškos vektorių buvo paremtas homologinės rekombinacijos principu bakterijose *E.coli*. β-karboanhidrazės genas buvo amplifikuotas PGR metodu (2.22) su specifiniais pradmenimis P587 ir P588 (**3.10 pav. takelis Nr. 1**). Šių pradmenų pagalba tikslinio geno sekoje buvo įvedami galai, kurie komplementarūs paruošto vektoriaus galams. Tai lemia homologinės rekombinacijos vyksmą bakterijose *E.coli*. Klonavimui pPIC9K vektoriuje, *β-cab* genas iš pradžių amplifikuojamas su P585 ir P586 pradmenimis (**3.10 pav. takelis Nr. 2**), o tuomet vienas iš galų dar prailginimas, amplifikuojant su pradmenimis P586 ir P611 (**3.10 pav. takelis Nr. 3**). Po DNR pagausinimo, buvo vykdoma gautų fragmentų preparatyvinė elektroforezė, fragmentai išgryninami naudojant komercinį „GeneJET Gel Extraction kit" rinkinį (2.18 ir 2.19).



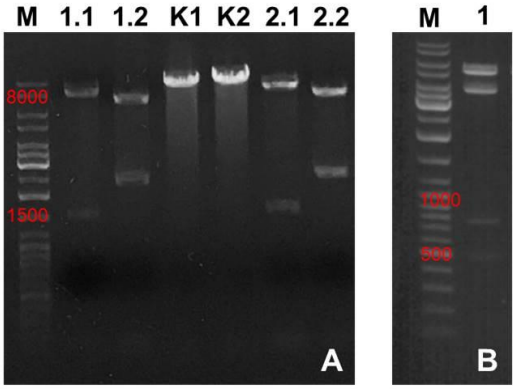
3.10 pav. Tikslinės DNR (*β-cab*) pagausinimas PGR metodu. **1** – *β-cab* amplifikuota su pradmenimis P587 ir P588; **2** – *β-cab* amplifikuota su pradmenų pora P585 ir P586; **3** – *β-cab* amplifikuota su pradmenimis P586 ir P611; **M** – DNR dydžių standartas, bp

Paruošiami du skirtingi transformuojantys mišiniai: geno seka su specifiniais galais klonavimui į pPIC3,5K ir atskliaustas pPIC3,5K vektorius; geno seka klonavimui į pPIC9K ir hidrolizuotas pPIC9K vektorius. Geno bei vektoriaus DNR kopijų skaičius santykis pasirinktas 3:1, atitinkamai. Taigi, galutinis kiekis mišiniuose siekė 28 ng *β-cab* bei 150 ng vektoriaus. Paruošti mišiniai buvo transfekuojami į *E.coli* DH5α ir vykdoma bakterijų transformacija (2.24). *E.coli* transformantų atranka buvo vykdoma ant agarizuotos LB terpės papildytos ampicilinu (2.24). Išaugti turėjo tik tie klonai, kuriuose įvyko homologinė rekombinacija tarp raiškos vektoriaus bei tikslinio geno galų. Tam patvirtini nuo išaugusių klonų buvo atliktas kolonijų PGR (2.25), panaudojant pradmenis pPIC3,5K-*β-cab* atveju P587 ir P588, o pPIC9K-*β-cab* - P586 ir P611. Po PGR DNR buvo analizuojama DNR elektroforezės metodu (2.18). Analizė patvirtino, jog klonai Nr. 1, Nr. 3, Nr. 5 turėjo pPIC3,5K-*β-cab* konstruktą (**3.11 pav**. A gelis, **takeliai Nr. 1, Nr. 3, Nr. 5**). Taip pat A gelyje galima matyti, jog klonuose Nr. 2 ir Nr. 4 nebuvo aptikta pPIC3,5K-*β-cab* konstrukto (**3.11 pav. A gelis, takeliai Nr. 2, Nr. 4**). Viena iš priežasčių galėtų būti nepilna visų pPIC3,5K plazmidžių hidrolizė, kai lieka tam tikras procentas nesukirpto vektoriaus (pPIC3,5K) molekulių, kurios transfekuojamos į *E.coli*. Kita galima priežastis - netinkamai atlikta kolonijų PGR analizė. Iš klonų, turinčių pPIC9K-*β-cab* konstruktą, aptiktas tik vienas *E.coli* transformantas (**3.11 pav. B gelis, takelis Nr. 1**).



3.11 pav. *E.coli* klonų analizė PGR metodu. **A gelis**: **K1** – tuščia kontrolė; **K2** – pPIC3,5K; **K3** – pPIC3,5K-*lacc*; **1, 5** – pPIC3,5K-*β-cab*; **2** – pPIC3,5K; **3 –** pPIC3,5K-*β-cab*; **4** – pPIC3,5K. **B gelis**: **1** – pPIC9K-*β-cab*; **K1** – tuščia kontrolė; **M** – DNR dydžio standartas, bp

Toliau buvo atlikta gautų plazmidžių pPIC3,5K-*β-cab* iš klonų Nr. 1, Nr. 5 (**3.11 pav. A gelis**) bei pPIC9K-*β-cab* iš klono Nr. 1 (**3.11 pav. B gelis**) analizė. Šių tyrimų tikslas buvo išsiaiškinti ar genas tinkamai įterptas į minėtuosius raiškos vektorius, ar nėra įvesta klaidų geno sekoje, homologinės rekombinacijos vietose. Klonai buvo užsėjami į 5 mL skystos LB terpės su ampicilinu ir auginami 16-18 val. 37 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu. Plazmidės buvo išskiriamos šarminės lizės metodu (2.26). Išskirtos pPIC3,5K-*β-cab* plazmidės buvo restriktuojamos su restrikcijos endonukleazėmis *Aat*II ir *Nco*I, o pPIC9K-*β-cab* - restriktaze *Pst*I, restrikciją vykdant 37 °C temperatūroje 1 val. (2.28). Po restrikcijos buvo atlikta DNR elektroforezė (2.18) ir gelyje matoma, jog genas buvo sėkmingai ir tinkamai įterptas į raiškos vektorius, t.y. pPIC3,5K-*β-cab* atveju kerpant su *Nco*I buvo matomi 2,5 kb ir 7,1 kb; kerpant su *Aat*II - 8,1 kb bei 1,5 kb DNR fragmentai (**3.12 pav. A gelis: 1.1; 1.2; 2.1; 2.2 takeliai**), kurie atitiko teorinį dydį. Kalbant apie pPIC9K-*β-cab* restrikciją, taip pat buvo matomi teorinio dydžio fragmentai (**3.12 pav. B gelis: 1 takelis**).



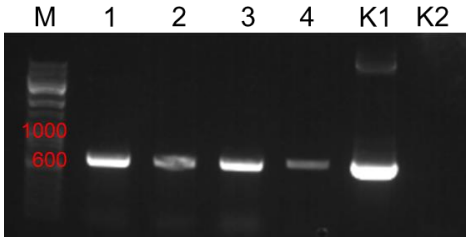
3.12 pav. Restrikcinė analizė. A gelis: **1.1** – konstruktas pPIC3,5K-*β-cab* restriktuotas su *Aat*II (**1 klonas**); **1.2** – konstruktas pPIC3,5K-*β-cab* restriktuotas su *Nco*I (**1 klonas**); **K1** – konstruktas pPIC3,5K restriktuotas su *Aat*II; **K2** – konstruktas restriktuotas su *Nco*I; **2.1** – pPIC3,5K-*β-cab* restriktuotas su *Aat*II (**5 klonas**); **2.2** – pPIC3,5K-*β-cab* restriktuotas su *Nco*I (**5 klonas**). B gelis: 1 – pPIC9K-*β-cab* restriktuotas su *Pst*I; M – DNR dydžio standartas, bp

Siekiant galutinai įsitikinti, jog įklonuoto geno sekoje ar homologinės rekombinacijos vietose nebuvo padaryta klaidų, šarminės lizės metodu (2.26) išskirtos plazmidės pPIC3,5K-β-cab iš klono Nr. 1 bei pPIC9K-*β-cab* iš klono Nr. 1 buvo išgrynintos, išvalytos bei paruoštos sekvenavimui (2.27). Sekvenavimas buvo atliktas VU GMC Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre. Sekoskaitos rezultatai parodė, jog homologinės rekombinacijos vietose klaidų nebuvo įvesta, geno seka įterpta teisingai, todėl nuspręsta toliau šias konstrukcijas naudoti mielių *P.pastoris* transformacijoje ir raiškos tyrimuose.

Pirmiausia buvo paruošti 3 skirtingi mišiniai, skirti transformuoti mieles *P.pastoris*. Pirmasis mišinys - su restrikaze *Sal*I hidrolizuota plazmidė pPIC3,5K-*β-cab*. Antrasis - *Bgl*II

restrikcijos endonukleaze hidrolizuotas vektorius pPIC9K-*β-cab*. Trečiasis - *SaI*I restriktaze sukirptas vektorius pPIC9K-*β-cab*. Vektorių atskliaudimas specifinėse vietose palengvina plazmidės integraciją į genomą. Be to, įgalina genetiškai skirtingų klonų susidarymą, pvz., hidrolizuojant *Bgl*II gaunamos His^+ Mut^s arba His^+ Mut^+ mielės. Tuo tarpu kerpant vektorių su *Sal*I, gaunami His^+Mut^+ klonai. Pastebima, jog klonai skiriasi ir produkuojamo baltymo išeiga. Taip pat baltymo raiškai įtakos turi ir integruotų į genominę DNR plazmidžių kopijų skaičius. Kai kuriais atvejais raiška būna efektyvesnė esant mažiau plazmidės kopijų genome, kai kuriais atvejais – esant didesniam kopijų skaičiui („Pichia expression kit. A manual for methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*“ 2014, Invitrogen).

Šiame tiriamajame darbe *P.pastoris* transformacijai buvo naudojama ne mažesnė kaip 0,5 µg/mL hidrolizuotos plazmidės koncentracija, pridedama ir žiedinės plazmidės, kuri atliko nešiklio funkciją. Šie mišiniai buvo transfekuojami į mieles elektroporacijos metodu (2.33). Transformuotas ląstelių mišinys buvo užsėjamas ant MD terpės ir auginama 3-4 dienas 30 °C temperatūroje. Išaugę klonai surenkami ir išsėjami ant agarizuotos YEPD su skirtingomis geneticino koncentracijomis (0,5 mg/ml; 1 mg/mL) bei auginami 3-4 d. 30 °C temperatūroje, tikintis atrinkti klonus, kurie besiskirtų plazmidžių kopijų skaičiumi (2.34). Gauti rekombinantiniai klonai, turintys konstruktą pPIC3,5K-*β-cab* bei klonai, turintys konstruktą pPIC9K-*β-cab,* buvo tikrinami PGR metodu (2.25), naudojant pradmenų poras P587/P588 ir P586/P611, atitinkamai. Rezultatai buvo analizuojami DNR elektroforezės gelyje (2.18). Rezultatai patvirtino, jog transformacija buvo sėkminga, mielių klonai turėjo konstruktą pPIC9K-*β-cab* (**3.13 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4**) bei pPIC3,5K-*β-cab* (rezultatai nepateikiami).

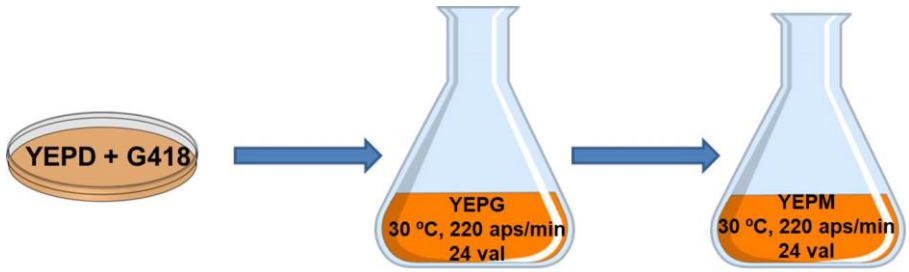


3.13 pav. *P.pastoris* klonų analizė PGR metodu. **1, 2, 3, 4** – mielių klonai, turintys konstruktą pPIC9K-*β-cab*; **K1** – plazmidė pPIC9K-*β-cab*; **K2** – neigiama (tuščia) kontrolė; **M** – DNR dydžio standartas, bp

3.2.2 Heterologinės β-karboanhidrazės raiška mielėse *P.pastoris*, kai raiškos vektorius yra pPIC3,5K

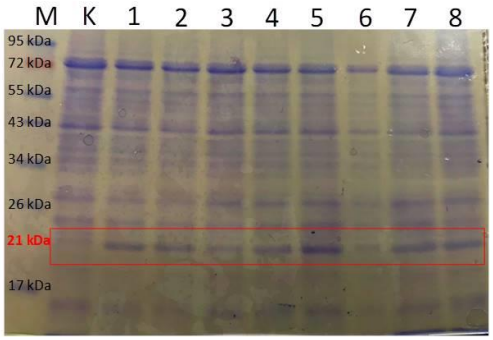
Pirmiausia buvo įvertinamas mielių rekombinantų tikslinio baltymo sintezės lygis skirtinguose klonuose, turinčiuose konstruktą pPIC3,5K-*β-cab*. Buvo pasirinkti 7 atsitiktiniai

klonai (skyrėsi savo dydžiu) nuo Petri lėkštelių su agarizuota YEPD terpe, papildyta geneticinu, 1 mg/mL ar 0,5 mg/mL koncentracijos. Kaip kontrolinis klonas naudojamas transformantas, turintis pPIC3,5K konstruktą. Rekombinantinai klonai bei kontrolinis transformantas buvo užsėjami į YEPG terpę ir auginami 30 °C temperatūroje 24 val. 220 aps/min. greičiu (**3.14 pav.**). Po to, ląstelės perkeliamos į indukcinę YEPM terpę su 1 % (v/v) metanolio ir inkubuojamos dar 24 val. jau minėtomis sąlygomis (2.35).



3.14 pav. *P.pastoris* kultivavimo schema standartinėmis sąlygomis

Po indukcijos, buvo surenkama ląstelių biomasė ir ardoma stiklo rutuliukais (2.38). Gautas grubus lizatas analizuojamas NDS-PAGE gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Rezultatai parodė, jog klonai Nr. 2-8 produkavo rekombinantinę karboanhidrazę, kurios molekulinė masė atitiko teorinį 21 kDa dydį (**3.15 pav.**). Be to, galima įžvelgti, jog rekombinantinio baltymo išeiga skirtinguose klonuose buvo labai panaši (**3.15 pav. takeliai Nr. 2-8**). Kontroliname mėginyje, kaip ir buvo tikėtasi, β-KA nebuvo aptikta (**3.15 pav. takelis Nr. 1**). Kadangi rekombinantinio baltymo produkcijos lygis skirtinguose klonuose stipriai nesiskyrė, buvo nuspręsta pasirinkti viena atsitiktinį kloną, šiuo atveju **Nr. 4**, ir naudoti jį tolimesniuose raiškos optimizavimo tyrimuose.

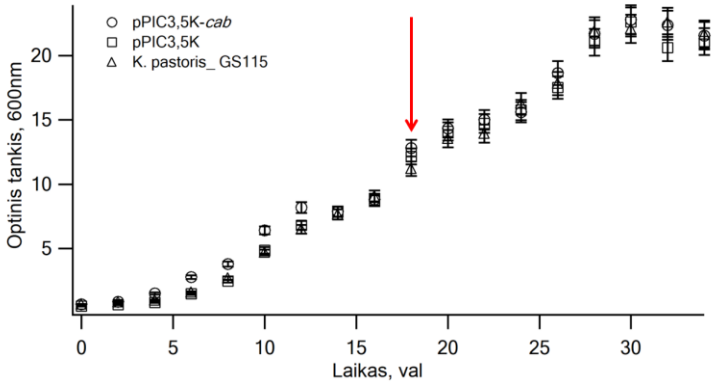


3.15 pav. Grubaus ekstrakto analizė NDS-PAGE gelyje po auginimo standartinėmis sąlygomis. **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** – pPIC3,5K-*β-cab* mielių rekombinantiniai klonai; **K** – pPIC3,5K rekombinantinis klonas; **M** – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Dažnai tikslinio sintetinamo baltymo išeiga bei būsena (aktyvus/neaktyvus baltymas) priklauso ne tik nuo naudojamos raiškos sistemos, šeimininko rūšies ar kamieno, bet ir nuo kultivavimo sąlygų. Todėl baltymų raiškos sistemų tyrimuose vienas iš svarbių etapų yra

optimalių kultivavimo sąlygų nustatymas (Looser et al., 2015). Tai buvo išbandyta ir šiame tiriamajame darbe.

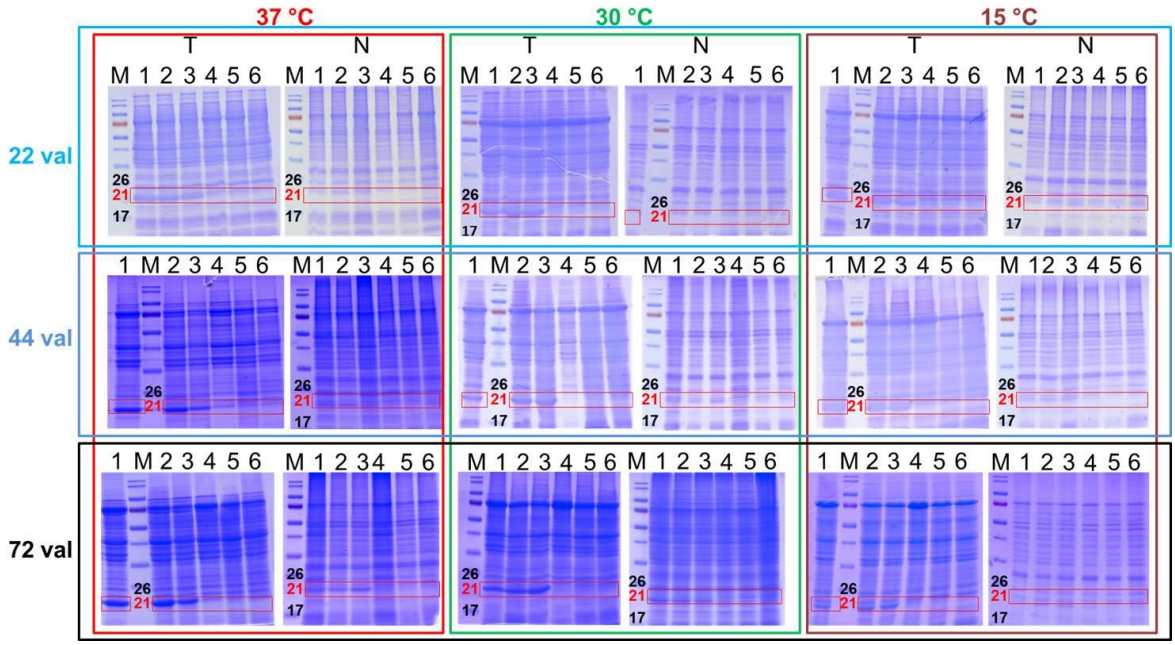
Pirmiausia, buvo nuspręsta nustatyti *P.pastoris* kultūros augimą YEPG terpėje bei įvertini konstruktų pPIC3,5K-*β-cab,* pPIC3,5K įtaką ląstelių augimui. Rekombinantinis mielių klonas Nr. 4, turintis plazmidę pPIC3,5K-*β-cab,* bei kontroliniai mėginiai - netransformuotos (*P.pastoris* GS115) ir transformuotos su konstruktu pPIC3,5K mielių ląstelės, buvo užsėjamos į 50 mL YEPG terpę ir auginamos 36 val. 30 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu. Kas 2 val. buvo imamas ląstelių suspensijos mėginys ir matuojama sugertis prie 600 nm bangos ilgio. Iš gautų rezultatų grafiko matyti, jog konstruktų pPIC3,5K arba pPIC3,5K-*β-cab* buvimas neturėjo neigiamos įtakos ląstelių augimui. (**3.16 pav.**). Taip pat, buvo nustatyti augimo laiko intervalai, kuriuose pasiekiamos skirtingos augimo fazės. Šiuo atveju latentinė (*lag*) fazė truko pirmąsias 6 val., vėliau sekė 22 val. trukusi logaritminė (*log*) fazė (nuo 6 val. iki 28 val.), stacionari fazė stebima buvo po 30 val. auginimo (**3.16 pav.**). Taigi, optimaliausias augimo laikas YEPG terpėje - apie 18 val., t.y. logaritminės fazės viduryje, tuomet ląstelės yra aktyviai besidalinančios. Tokios auginimo trukmės YEPG terpėje buvo laikomasi ir tolimesniuose raiškos optimizacijos tyrimuose.



3.16 pav. *P.pastoris* augimo YEPG terpėje kreivės

Toliau buvo tiriamos optimalios kultivavimo sąlygos indukcinėje YEPM terpėje - tikslinio rekombinantinio baltymo sintezės priklausomybė nuo temperatūros, indukcijos laiko, induktoriaus koncentracijos. Šiame tyrime buvo pasirinktos 3 skirtingos temperatūros: optimali fermento veikimo temperatūra - **37 °C**; optimali *P.pastoris* augimo temperatūra - **30 °C**; mielėse baltymų procesingą lėtinanti temperatūra - **15 °C**. Šiose temperatūrose kultivuojamų ląstelelių terpė buvo papildoma kas 24 val. ir skirtingomis metanolio (induktoriaus) koncentracijomis (v/v): 0,5 %, 1,5 %, 2 %. Taigi, mielių klonas Nr. 4, turintis konstruktą pPIC3,5K-*β-cab* bei kontrolinis klonas, turintis plazmidę pPIC3,5K buvo užsėjami į 20 mL YEPG terpės ir auginami 18 val. 30 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu.

Po to, ląstelės perkeliamos į indukcinę YEPM terpę su 0,5 %, 1,5 % ir 2 % (v/v) metanolio koncentracijomis ir indukuojamos skirtingose temperatūrose dar 72 val. purtant 220 aps/min. greičiu. Tam tikra dalis ląstelių suspensijos buvo paimama po 22, 44, 72 val. Ląstelių biomasė ir supernatantas buvo atskiriami centrifuguojant. Ląstelės ardomos stiklo rutuliukais (2.38). Gautos tirpi ir netirpi (nuolaužos) baltymų frakcijos analizuojamos NDS-PAGE metodu denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Supernatanto analizė nebuvo atlikta, nes konstrukcija skirta viduląstelinio baltymo produkcijai. Rezultatai parodė, jog tikslinis baltymas buvo produkuojamas tirpios būsenos t.y., aptinkamas tirpioje baltymų frakcijoje (**3.17 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, T**). Įdomu, jog po 72 val. indukcijos 30 °C ir 37 °C temperatūrose, dalis tikslinio baltymo produkuojama ir netirpios būsenos t.y., aptinkamas netirpioje baltymo frakcijoje (nuolaužose) (**3.17 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, N**). Tai leidžia konstatuoti, jog optimaliausias ir tinkamiausias ląstelių indukavimo laikas yra nuo 22 val. iki 44 val. Taip pat stebima, jog nepriklausomai nuo pasirinktos temperatūros ar metanolio koncentracijos, β-karboanhidrazės sintezė buvo vienodai efektyvi (vizualus įvertinimas) (**3.17 pav. takeliai Nr. 1, Nr .2, Nr. 3, T**).

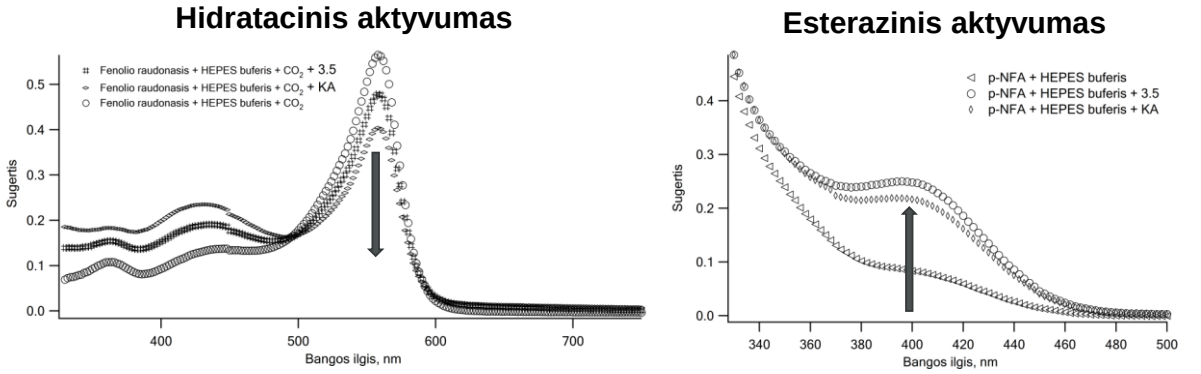


3.17 pav. *P.pastoris* rekombinantinių klonų pPIC3,5K-*β-cab* ir pPIC3,5K tikslinio baltymo produkcijos priklausomybės nuo kultivavimo sąlygų įvertinamas NDS-PAGE gelyje. **T** – tirpi (viduląstelinė) baltymų frakcija; **N** – netirpi baltymų frakcija (nuolaužos). **1** – pPIC3,5K-*β-cab* (0,5 % MeOH); **2** – pPIC3,5K-*β-cab* (1,5 % MeOH); **3** – pPIC3,5K-*β-cab* (2 % MeOH); **4** – pPIC3,5K (0,5 % MeOH); **5** – pPIC3,5K (1,5 % MeOH); **6** – pPIC3,5K (2 % MeOH); M – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Toliau buvo siekiama patikrinti ar produkuojamas tikslinis baltymas pasižymėjo jam būdingu tiek hidrataciniu, tiek esteraziniu aktyvumu, t.y. įvertinti ar baltymas yra aktyvios

formos. Gautos tirpios baltymų frakcijos buvo suspenduojamos buferiniame tirpale taip, jog galutinė baltymų koncentracija siektų 3 mg/mL. Hidratacinio aktyvumo nustatymo atveju mėgintuvėlyje sumaišoma 2,5 mL fenolio raudonojo, 400 µL HEPES buferinio tirpalo, 100 µL CO_2 substratinio tirpalo. Reakcija inicijuojama pridedant 100 µL tiriamojo fermentinio tirpalo. Sugerties kitimas buvo fiksuojamas spektrofotometriškai 300 nm - 700 nm bangos ilgių ribose (2.41). Grafike galima matyti (**3.17 pav.**) sumažėjusią sugerties reikšmę, lyginant su kontrolinio mėginio (tirpi baltymų frakcija išskirta iš klono, turinčio pPIC3,5K) sugertimi, kas leido teigti, jog rekombinantinis baltymas buvo aktyvios formos, nes katalizavo hidratacijos reakciją.

Esterazinio aktyvumo nustatymo atveju 1,8 mL substratinio tirpalo buvo pilama į kiuvetę. Hidrolizės reakcija inicijuojama pridedant 0,2 mL tiriamojo fermentinio tirpalo ir stebimas sugerties pokytis prie 400 nm bangos ilgio (2.42). Rezultatai parodė, jog baltymas buvo aktyvus ir katalizuoja esterio hidrolizę, nes pastebimas sugerties padidėjimas lyginant su kontroliniais mėginiais (**3.17 pav.**).

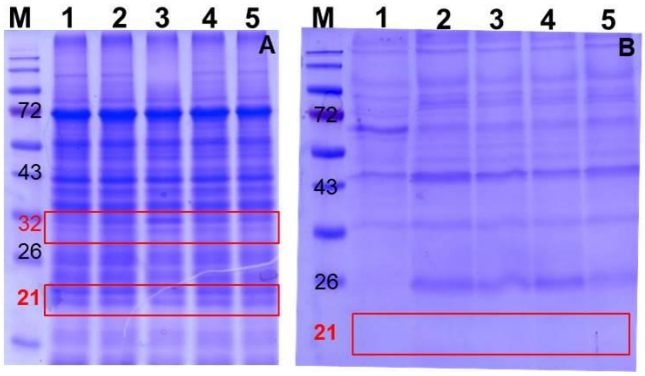


3.18 pav. β-KA aktyvumo matavimai, naudojant fenolio raudonąjį (**hidratacinis aktyvumas**) bei p-nitrofenilo acetatą (**esterazinis aktyvumas**). Tirta pPIC3,5K-*β-cab* bei pPIC3,5K rekombinantinių klonų baltymų tirpi (viduląstelinė) frakcija. **Hidratacinio aktyvumo** nustatyme naudoti klonai, kurie indukuoti: 1,5 % MeOH; 44 val. 30 °C. **Esterazinio aktyvumo** nustatyme klonai, kurie indukuoti: 2 % MeOH; 44 val. 30 °C.

3.2.3 Heterologinės β-karboanhidrazės raiška mielėse *P.pastoris*, kai raiškos vektorius yra pPIC9K

Vienas pagrindinių šio darbo tikslų buvo gauti tikslinį baltymą aktyvios formos ir sekretuojamą į užląstelinę terpę, todėl buvo atliekami tyrimai susiję pPIC9K raiškos sistema mielėse *P.pastoris*. Pirmiausia, mielių klonai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4 (**3.13 pav.**), turintys konstruktą pPIC9K-*β-cab* bei kontrolinis klonas, turintis pPIC9K vektorių, buvo užsėjami į 20 mL YEPG terpės ir auginami 18 val. 30 °C temperatūroje, purtant 220 aps/min. greičiu. Po auginimo ląstelės perkeliamos į indukcinę YEPM terpę, papildytą 1 % (v/v) metanoliu ir indukcija vykdoma dar 24 val. tomis pačiomis sąlygomis. Po indukcijos ląstelių biomasė bei

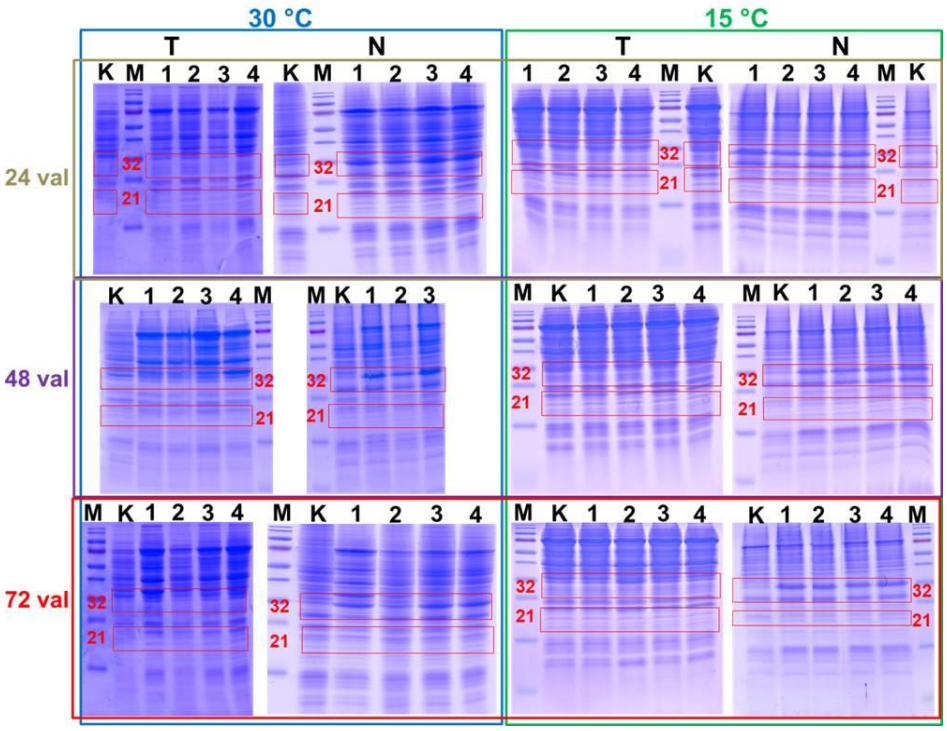
supernatantas buvo atskiriami centrifuguojant (2.35). Ląstelių biomasė ardoma stiklo rutuliukais (2.38). Supernatantas koncentruojamas su 10 kDa baltymų dydžio pralaidumo membrana (2.37). Gautas grubus ląstelių lizatas bei 68x sukoncentruotas supernatantas buvo analizuojami NDS-PAGE metodu denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Atlikus baltymų elektroforezę nebuvo aptikta skirtumų grubiuose ląstelių lizatuose tarp kontrolinio klono, turinčio pPIC9K plazmidę (**3.19 pav. A gelis, Takelis Nr. 1**), ir klonų, turinčių konstruktą pPIC9K-*β-cab* (**3.19 pav. A gelis, takeliai Nr. 2-5**), nes galimai įvyko baltymų persidengimas. Analizuojant koncentruotą supernatantą (**3.19 pav. B gelis**) tikslinio baltymo gelyje nebuvo matyti, nes sintezės lygis buvo per mažas. Todėl toliau nuspręsta atlikti pradinius raiškos optimizacijos darbus ir įvertinti skirtingų sąlygų įtaka *β-cab* geno raiškai. Tam tolesniems tyrimams buvo pasirinktas klonas Nr. 2.



3.19 pav. *P.pastoris* klonų, turinčių konstruktą **pPIC9K-*β-cab***, grubaus lizato (**A**) ir supernatanto (**B**) analizė NDS-PAGE gelyje po auginimo optimizuotomis sąlygomis. **1** – pPIC9K; **2, 3, 4, 5** – klonai, turintys konstruktą pPIC9K-*β-cab*; **M** – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Kadangi konstrukto pPIC3,5K-*β-cab* raiška indukcinėje terpėje (**3.17 pav.**) nesiskyrė indukuojant 37 °C arba 30 °C temperatūroje, buvo nuspręsta tolimesnius tyrimus atlikti tik 30 °C arba 15 °C temperatūroje bei įvertinti *β-cab* geno raiškos priklausomybę nuo induktoriaus kiekio - 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 % (v/v) bei indukcijos trukmės – 24, 48, 72 val. Taigi, mielių klonas Nr. 2, turintis konstruktą pPIC9K-*β-cab* bei transformantas, turintis pPIC9K plazmidę, buvo užsėjami į 20 mL YEPG terpės ir auginami 18 val. 30 °C temperatūroje purtant 220 aps/min. greičiu. Ląstelės perkeliamos į indukcinę YEPM terpę ir inkubuojamos įvairiomis sąlygomis, priklausomai nuo tiriamo parametro įtakos, (temperatūros, laiko, metanolio kiekio), purtant 220 aps/min. greičiu. Po indukcijos ląstelių biomasė ir supernatantas atskiriami centrifuguojant. Ląstelių biomasė buvo ardoma stiklo rutuliukais, grubus lizatas buvo centrifuguojamas ir gaunamos tirpi bei netirpi baltymų frakcijos (nuolaužos) (2.38). Toliau atliekama NDS-PAGE analizė denatūruojančiomis sąlygomis (2.39). Rezultatai parodė, jog baltymas yra aptinkamas netirpioje baltymų frakcijoje (nuolaužose) (**3.20 pav.**

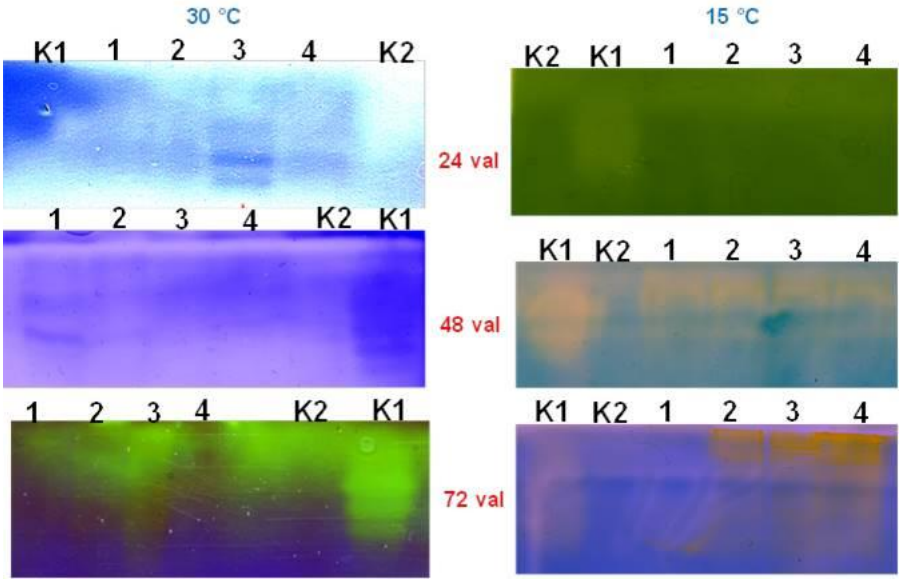
takeliai Nr. 1-4, N). Be to, baltymo kiekis nepriklausė nuo temperatūros, laiko ar induktoriaus koncentracijos - visomis sąlygomis buvo produkuojamas panašus baltymo kiekis (**3.20 pav. takeliai Nr. 1-4, N**). Tirpios būsenos baltymo NDS-PAGE gelyje nesimatė (**3.20 pav. takeliai Nr. 1-4, T**). Pažymėtina, jog kaip ir mielėse *S.cerevisiae,* rekombinantinio produkuoto baltymo molekulinė masė padidėjo 10 kDa - greičiausiai dėl nenukerpamo αF signalinio peptido. Šis signalinis peptidas yra sudarytas iš dviejų dalių: 19 a.r. N-terminaliniame signalinės sekos gale bei 66 a.r. *pro* regione. Pirmoji signalinės sekos dalis lemia baltymo translokaciją į endoplazminį tinklą, antroji - medijuoja nuo receptorių priklausomą baltymo patalpinimą į COPII sekrecijos pūsleles. Jei signalas yra sulietas su baltymu, kuris geba erdviškai susilankstyti mielių citozolyje, yra didelė tikimybė, kad baltymas nebus pernešamas per endoplazminio tinklo membraną ir nepateks į sekrecinį kelią. Literatūros šaltiniuose tai nurodoma kaip pagrindinis αF sekrecinio signalo limituojantis aspektas (Barrero et al., 2018).



3.20 pav. *P.pastoris* rekombinantinių klonų pPIC9K-*β-cab* ir pPIC9K tikslinio baltymo produkcijos priklausomybės nuo kultivavimo sąlygų įvertinamas NDS-PAGE gelyje. T – tirpi (viduląstelinė) baltymų frakcija; N – netirpi baltymų frakcija (nuolaužos). **1** – pPIC9K-*β-cab* (2 % MeOH); **2** – pPIC9K-*β-cab* (1,5 % MeOH); **3** – pPIC9K-*β-cab* (1 % MeOH); **4** – pPIC9K-*β-cab* (0,5 % MeOH); **K** – pPIC9K (1,5 % MeOH); **M** – baltymų molekulinės masės standartas, kDa

Taip pat, buvo leidžiama koncentruoto supernatanto elektroforezė natyviomis sąlygomis (2.39) ir atliekama gelio protonograma (2.40), t.y., fiksuojamas hidratacinis baltymo aktyvumas. Pradinė gelio spalva buvo mėlyna. Jei fermentas aktyvus - matomas geltonos

spalvos juostų atsiradimas, tačiau dėl labai greitos CO_2 absorbijos į gelį, pačio gelio spalva labai greitai pakisdavo į žalią ir skirtumai tarp mėginių tapdavo sunkiai pastebimi. Dėl šios priežasties gelių fotografijos buvo koreguojamos su filtrais, siekiant kuo aiškiau parodyti baltymo aktyvumą bei įvertinti pokyčius tarp skirtingų mėginių. Tuo tarpu, geliuose matomo rekombinantinio baltymo bei komercinės α-KA molekulinės masės ribos siekė 72-130 kDa (**3.21 pav. takeliai Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4; K1**). Toks molekulinės masės padidėjimas buvo siejamas su elektroforezės ypatumais natyviomis sąlygomis, kurios metu nebuvo naudojamas natrio dodecilsulfatas (NDS), sąlygojantis baltymų šoninių aminorūgščių teigiamo krūvio suteikimą bei judrumą per gelio poras.



3.21 pav. pPIC9K-*β-cab* klonų protonogramos. **K2** – pPIC9K klono supernatantas; **K1** – komercinė α-KA; 1 – pPIC9K-*β-cab* klono supernatantas (0,5 % MeOH); 2 – pPIC9K-*β-cab* klono supernatantas (1 % MeOH); 3 – pPIC9K-*β-cab* klono supernatantas (1,5 % MeOH); 4 – pPIC9K-*β-cab* klono supernatantas (2 % MeOH)

Gauti rezultatai parodė, jog dalis rekombinantinio baltymo buvo sekretuojamą į užląstelinę terpę. Takeliuose Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4 matomos aktyvumo zonos, kurios neaptinkamos kontroliniame mėginyje K2 (**3.21 pav.**). Tai pat galima matyti, jog tikslinio baltymo sekrecijos lygis 30 °C temperatūroje nepriklausė nuo inkubacijos laiko (**3.21 pav.**). Įdomu, jog eksperimentą vykdant 15 °C temperatūroje, sekretuojamas rekombinantinis baltymas buvo aptiktas tik po 48 val. (**3.21 pav**.).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, jog pPIC3,5K raiškos sistema yra tinkama viduląstelinės rekombinantinės β-karboanhidrazės gamybai, nes baltymas buvo gana efektyviai produkuojamos tirpios ir aktyvios formos. Tuo tarpu, pPIC9K raiškos sistemoje, kuri skirta baltymų sekrecijai į užląstelinę terpę, baltymas buvo gausiai sintetinamas netirpios

būsenos ir neaktyvus. Tai leidžia teigti, jog ši raiškos sistema gali būti pritaikoma rekombinantinės β-karboanhidrazės produkcijai, tačiau turėtų būti atliekami detalesni tyrimai, kurių metu būtų identifikuotos priežastys, dėl kurių neįvyksta laukiama postransliacinė modifikacija, t.y., signalinis peptidas nėra atskiriamas nuo β-KA baltymo sekos.

Be šiame magistriniame darbe aprašytų tiramųjų raiškos sistemų, laisvu nuo studiju metu buvo atlikta ir mokslinė rudens semestro praktika, kurios metu įvertinta trečioji raiškos sistema mielėse *Kluyveromyces lactis*.

IŠVADOS

1. Atlikta *Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės geno *β-cab* raiška skirtinguose mielių *S.cerevisiae* kamienuose ir nustatyta, kad didžioji dalis sintetinamo baltymo lieka viduląstelinių netirpių baltymų frakcijoje.
2. Pirmą kartą atlikta *Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės geno *β-cab* raiška mielėse *P.pastoris.* Naudojant pPIC3,5K-*β-cab* raiškos sistemą, pavyko gauti efektyvią tirpaus β-KA baltymo sintezę ląstelių viduje, o taikant pPIC9K-*β-cab* raiškos sistemą, nedidelė dalis baltymo buvo sekretuojama ir į ląstelės išorę.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

MANTAS BALIUKYNAS

***Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės raiškos ir sekrecijos tyrimai įvairiose mielių gentyse**

Magistrinių studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

β-karboanhidrazė (β-KA) yra fermentas, kuris katalizuoja grįžtamąją CO_2 hidratacijos/dehidratacijos reakciją. Ši savybė suteikia galimybę fiksuotą atmosferinį CO_2 konvertuoti į aukštesnės pridėtinės vertės produktus: akrilatus, metaną, poliuretaną ir kt.

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti *Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės raišką bei sekreciją įvairiose mielių gentyse. Pirmą kartą mielės buvo pritaikytos kaip galimas šeimininkas efektyviai rekombinantinio β-KA baltymo gamybai. Tyrimas buvo atliktas su skirtingomis mielių gentimis: *Saccharomyces cerevisiae* bei *Pichia pastoris*. Mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemoje buvo naudojamas šaudyklinis vektorius pFX7αF-*β-cab*. Šioje sistemoje (pFX7αF-*β-cab*) tikslinis baltymas buvo sintetinamas efektyviai, nors ir didžioji dalis β-karboanhidrazės buvo netirpios būsenos t.y., aptikta netirpioje baltymų frakcijoje (ląstelių nuolaužose). Tuo tarpu, mielių *P.pastoris* sistemoje naudoti šaudykliniai vektoriai pPIC9K-*β-cab* ir pPIC3.5K-*β-cab* buvo sukonstruoti homologinės rekombinacijos principu bakterijose *E.coli*. *P.pastoris* raiškos sistemoje (pPIC3,5K) β-KA baltymas buvo efektyviai produkuojamas tirpios būsenos (aptinkamas viduląstelinių tirpių baltymų frakcijoje). Taip pat, heterologinis baltymas pasižymėjo tiek esteraziniu, tiek hidrataciniu aktyvumu. Antroje *P.pastoris* raiškos sistemoje (pPIC9K), didžioji dalis rekombinantinio baltymo buvo produkuota netirpios būsenos, nepaisant to, dalis tikslinio baltymo buvo aptikta užląstlinėje terpėje, naudojant protonogramos metodą.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

MANTAS BALIUKYNAS

***Bacillus mojavensis* β-karboanhidrazės raiškos ir sekrecijos tyrimai įvairiose mielių gentyse**

Master Thesis

SUMMARY

β-carbonic anhydrase (β-CA) is an enzyme, which has a unique feature - is able to catalyze reversible CO_2 hydration reaction. The fixed atmospheric CO_2 can be converted into high-value products: acrylates, methane, polyurethane, etc.

This study was focused on examination of various yeast genus for efficient heterologous expression and secretion of β-CA from bacteria *Bacillus mojavensis*. For the first time, the yeasts were shown to be a promising host for efficient β-CA protein production. The investigation was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* yeast strains. Vector pFX7αF-*β-cab* was used in *Saccharomyces cerevisiae* expression system. The targeted protein was produced efficiently, albeit majority of the recombinant enzyme was in the insoluble form. The two shuttle vectors pPIC9K-*β-cab* and pPIC3.5K-*β-cab*, which were constructed by principle of homologous recombination in bacteria *E.coli,* were applied in *Pichia pastoris* expression system. In *P. pastoris* expression system (pPIC3.5K), β-CA was efficiently synthesised in the soluble form. The heterologous protein had esterase and hydratase activities. In the second *P. pastoris* expression system (pPIC9K), the majority of β-CA was produced in the insoluble form; nevertheless, the part of synthesised targeted protein was detected in extracellular matrix by the protonogram method.

MOKSLINIŲ PASIEKIMŲ SĄRAŠAS

Moksliniai pranešimai konferencijose:

1. Baliukynas M, Veteikytė A, Šiekštelė R, Matijošytė I. Development of expression systems for β-carbonic anhydrase from *Bacillus mojavensis*. 2019.02.26-2019.02.28. The Coins, 2019, Vilnius, Lietuva, **stendinis pranešimas**.
2. Baliukynas M, Veteikytė A, Šiekštelė R, Matijošytė I. Bacterial β-carbonic anhydrase – promising biocatalyst in bio-based industries. 2019.07.07-2019.07.02. Biotrans2019, 2019, Groningenas, Nyderlandai, **stendinis pranešimas**.
3. Baliukynas M, Veteikytė A, Šiekštelė R, Krutkevičius J, Matijošytė I. *Kluyveromyces lactis* and *Pichia pastoris* - promising yeast expression systems for efficient production of β-carbonic anhydrase from *Bacillus mojavensis*. 2020.02.25-2020.02.27. The Coins, 2020, Vilnius, Lietuva, **stendinis pranešimas**.

Mokslinė publikacija:

1. **Baliukynas M**, Veteikytė A, Kairys V, Matijošytė I. The hydrolysis of indoxyl acetate: a versatile reaction to assay carbonic anhydrase activity by high-throughput screening. *Enzyme Microb Technol*. 2020;139:109584. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109584.

Dalyvauta Lietuvos mokslų tarybos (LMT) projektuose:

- Projektas (**Nr. 09.3.3-LMT-K-712-15-0041**) finansuojamas iš Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos 9 prioriteto „Visuomenės švietimas ir žmogiškųjų išteklių potencialo didinimas“ 09.3.3-LMT-K-712 priemonės „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“.
- Projektas (**Nr. 09.3.3.-LMT-K-712-16-0192**) finansuojamas iš Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos 9 prioriteto „Visuomenės švietimas ir žmogiškųjų išteklių potencialo didinimas“ 09.3.3-LMT-K-712 priemonės „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“

Mokslo populiarinimas:

- **Europos biotechnologijų savaitė** (2018 m.). Programa „Biotechnologijos – mūsų kasdieniniame gyvenime“, Protmūšis „Bioprotas“. Rengėjai Žymantas Venckus, Mantas Baliukynas.
- **Vaikų universitetas (**2019 m.**)**: „Biotechnologijos – mūsų kasdieniniame gyvenime“, Protmūšis „Bioprotas“. dr. Inga Matijošytė, Mantas Baliukynas.
- **Europos biotechnologijų savaitė** (2019 m.). Programa: „Biotechnologijos - mūsų kasdieniniame gyvenime“, Protmūšis „Bioprotas“. Jokūbas Krutkevičius, Mantas Baliukynas.

PADĖKA

Noriu padėkoti VU Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriaus dr. A. Gedvilaitei už raiškos vektorių pFXαF7, dr. R. Slibinskui, dr. E. Čypliui už raiškos vektorius pPIC3,5K, pPIC9K bei patarimus susijusiais su *P.pastoris* raiškos sistemomis.

Noriu padėkoti VU Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriui už perduotas žinias, patirtį, supratingumą, palaikymą tiek mokslo, tiek gyvenimiškaisiais klausimais, gražius susibūrimus, įdomias bei turiningas keliones.

Ypač dėkoju dr. Ingai Matijošytei už nuoširdumą, didelį supratingumą, neišsenkančią kantrybę, paskatinimus siekti savo tikslų, svajonių bei spręsti ir įveikti net sudėtingiausias situacijas.

Ypač dėkoju Rimantui Šiekštelei už perduotas genetikos žinias, kantrybę, supratingumą bei patarimus įvairiausiais gyvenimo klausimais.

Ypač dėkoju likusiam TBS kolektyvui už pagalbą rengiant mokslinį darbą, postūmius judėti į priekį, už smagiai praleistą laisvą laiką, kavą bei stalo žaidimus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

addgene.org [internetinė svetainė]. Teddington (UK): Addgene, Inc.; sukurta 2004-01 [atnaujinta 2018-05-21; cituota 2020-04-07] Adresas: https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/

Adivitiya, Dagar VK, Khasa YP. Yeast expression systems: current status and future prospects. In: Satyanarayana T, Kunze G, editors. Yeast diversity in human welfare. Singapore: Springer; 2017. p. 215-250.

Akhondzadeh S. Ethical issues in medical biotechnology. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014;6:129.

Akindoyo JO, Beg MDH, Ghazali S, Islam MR, Jeyaratnam N, Yuvaraj AR. Polyurethane types, synthesis and applications – a review. *RSC Adv*. 2016:6;114453-114482.

Ashwini M, Murugan, SB, Balamurugan S, Sathishkumar R. Advances in molecular cloning. *Mol Biol*. 2016;50**:**1–6.

Attieh MD. Enzymatically initiated synthesis of biomimetic receptors based on molecularly imprinted polymers by free radical polymerization. Biotechnology. Université de Technologie deCompiègne, 2016. English. NNT: 2016COMP2266

Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Younes G, Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M. Yeast expression systems: overview and recent advances. *Mol Biotechnol*. 2019;61:365-384.

Baliukynas M, Veteikytė A, Kairys V, Matijošytė I. The hydrolysis of indoxyl acetate: a versatile reaction to assay carbonic anhydrase activity by high-throughput screening. *Enzyme Microb Technol*. 2020;139:109584.

Baliukynas M. Biokatalizatoriaus, skirto poliuretanų sintezei, tyrimas: katalizinės savybės ir geno raiška [bakalaurinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2018.

Barcelos MCS, Lupki FB, Campolina GA, Nelson DL, Molina G. The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. *Fems Microbiol Lett*. 2018;365.

Barrero JJ, Casler JC, Valero F, Ferrer P, Glick BS. An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2018;17:161.

Beller M, Bornscheuer UT. CO_2 fixation through hydrogenation by chemical or enzymatic methods. *Angew Chem Int Edit*. 2014:53;4527–8.

Bertero A, Brown S, Vallier S. Methods of Cloning. In: Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, editors. Basic science methods for clinical researchers. Academic Press, 2017. p. 19-39.

Boone CD, Gill S, Habibzadegan A, McKenna K. Carbonic anhydrase: an efficient enzyme with possible global implications. *Int J Chem Eng*. 2013;6.

Bury-Moné S, Mendz GL, Ball GE, et al. Roles of alpha and beta carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease-dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infect Immun*. 2008;76:497–509.

Capasso C, Supuran CT. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2015;30:325-32.

Castro M, Lopez C, Narayanasamy R, Marszalek J, Luevanos EM, Fajardo G, Balagurusamy N. Potential of enzymes (urease & carbonic anhydrase) for a sustainable construction industry. *Chim oggi*. 2016:34;36.

Celik E, Calık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*. 2012;30:1108-18.

Chang KS, Jeon H, Gu MB, Pack SP, Jin E. Conversion of carbon dioxide to oxaloacetate using integrated carbonic anhydrase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013:36**;**1923–1928.

Chao R, Yuan Y, Zhao H. Recent advances in DNA assembly technologies. *FEMS Yeast Res*. 2015;15:1–9.

Chee JY, Chin CF. Gateway cloning technology: advantages and drawbacks. *Clon Transgen*. 2015;4:138.

Chirica LC, Petersson C, Hurtig M, Jonsson BH, Borén T, Lindskog S. Expression and localization of alpha- and beta-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1601:192-9.

Chuzel L, Ganatra MB, Schermerhorn KM, Gardner AF, Anton BP, Taron CH. Complete genome sequence of *Kluyveromyces lactis* strain GG799, a common yeast host for heterologous protein expression. *Genome Announc*. 2017;5:e00623-17.

Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*. 2005;18:119-38.

Brilhante AMF. Re-formulation and cost optimisation of one component PU foams [disertacinis darbas]. Lisabona: Universidade de Lisboa; 2008.

De Simone G, Monti SM, Alterio V, Buonanno M, De Luca V, Rossi M, Carginale V, Supuran CT, Capasso C, Di Fiore A. Crystal structure of the most catalytically effective carbonic anhydrase enzyme known, SazCA from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25:2002–6.

Del Prete S, Vullo D, Ghobril C, Hitce J, Clavaud J, Marat X, Capasso C, Supuran CT. Cloning, purification, and characterization of a β-carbonic anhydrase from *Malassezia restricta*, an opportunistic pathogen involved in Dandruff and Seborrheic Dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2019;20:2447.

Dobrinski KP, Boller AJ, Scott KM. Expression and function of four carbonic anhydrase homologs in the deep-sea chemolithoautotroph *Thiomicrospira crunogena*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:3561–3567.

Eminoğlu A, Vullo D, Aşık A, Çolak DN, Supuran CT, Çanakçı S, Osman Beldüz A. Cloning, expression and biochemical characterization of a β-carbonic anhydrase from the soil bacterium *Enterobacter* sp. B13. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31:1111-8.

Escudero-Almanza DJ, Ojeda-Barrios DL, Hernández-Rodríguez OA, Chávez ES, Ruíz-Anchondo T, Sida-Arreola JP. Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology. *Chil J Agr Res*. 2012;72:140-146.

Evens R, Kaitin K. The evolution of biotechnology and its impact on health care. *Health Affair*. 2015;34:210-219.

Ferraroni M, Del Prete S, Vullo D, Capasso C, Supuran CT. Crystal structure and kinetic studies of a tetrameric type II beta-carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Acta Crystallogr Sect D Biolog Crystallogr*. 2015;71:2449–2456.

Ferrer-Miralles N, Saccardo P, Corchero JL, Xu Z, García-Fruitós E. General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. In: García-Fruitós E, editor. Insoluble proteins. Methods in molecular biology (methods and protocols). New York: Humana Press; 2015. p. 1-24.

Frazzetto G. White biotechnology. *EMBO Rep*. 2003;4:835–7.

Gartland K, Bruschi F, Dundar M, Gahan P, Viola Magni M, Akbarova Y. Progress towards the 'Golden Age' of biotechnology. *Curr Opin Biotech*. 2013;24:S6–13.

Gianfreda L, Scarfi MR. Enzyme stabilization: state of the art. *Mol Cell Biochem*. 1991;100: 97–128.

Gomes A, Byregowda S, Veeregowda B, Vinayagamurthy B. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4:346-356.

Guilloton MB, Lamblin AF, Kozliak EI, Gerami-Nejad M, Tu C, Silverman D, Anderson PM, Fuchs JA. A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1993;175:1443–1451.

Hermann BG, Blok K, Patel MK. Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environ Sci Technol*. 2007;41:7915–21.

Huang M, Bao J, Hallström BM, Petranovic D, Nielsen J. Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism. *Nat Commun*. 2017;8:1131.

Hultman T, Murby M, Ståhl S, Hornes E, Uhlén M. Solid phase *in vitro* mutagenesis using plasmid DNA template. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:5107–5112.

Yao S, Hart DJ, An Y. Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. *Protein Eng Des Sel*. 2016;29:551-556.

Yashveer S, Singh V, Kaswan V, Kaushik A, Tokas J. Green biotechnology, nanotechnology and bio-fortification: perspectives on novel environment-friendly crop improvement strategies. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2014;30:113–26.

Yevale R, Sharma M, Kakde D, Khan N, Pawar K. A review on "red and green biotechnology." *Asian J Res Pharm Sci*. 2018;8:115–20.

Iimura Y, Sonoki T, Habe H. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*. 2018;141:39-43.

Jajesniak P, Wong TS. QuickStep-Cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids. *J Biol Eng*. 2015;9:15.

Jensen EL, Clement R, Kosta A, Maberly SC, Gontero B. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton. *ISME J*. 2019;13:2094–106.

Jiang L, Ren Z, Zhao W, Liu W, Liu H, Zhu C. Synthesis and structure/properties characterizations of four polyurethane model hard segments. *R Soc open sci*. 2018:5;180536.

Jo B, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Cell Sci The*. 2015;6:1-7.

Kadokawa J, Kobayashi S. Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14:145–53.

Kadokawa J-I. Preparation and applications of amylose supramolecules by means of phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization. *Polymers.* 2012:4;116-133.

Kaur S, Mishra MN, Tripathi AK. Regulation of expression and biochemical characterization of a beta-class carbonic anhydrase from the plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;299:149-58

Kelwick R, MacDonald JT, Webb AJ, Freemont P. Developments in the tools and methodologies of synthetic biology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2014;2:60.

Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics*. 2016;2016:2405954.

Kisker C, Schindelin H, Alber BE, Ferry JG, Rees DC. A left-hand β-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J*. 1996;15:2323–2330.

Kobayashi S, Uyama H. Synthesis of polyesters I: hydrolase as catalyst for polycondensation (condensation polymerization). In: Kobayashi S, Uyama H, Kadokawa J, editors. Enzymatic polymerization towards green polymer chemistry. Singapore: Springer; 2019. p. 105–63.

Kobayashi S. Challenge of synthetic cellulose. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2005;43:693-710.

Kobayshi S. New developments of polysaccharide synthesis via enzymatic polymerization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2007:83;215-247.

Koeppl H, Densmore D, Setti G, di Bernardo M. Design and analysis of biomolecular circuits engineering. Approaches to systems and synthetic biology. Springer; 2011.

Le Meur S, Zinn M, Egli T, Thöny-Meyer L, Ren Q. Poly(4-hydroxybutyrate) (P4HB) production in recombinant *Escherichia coli*: P4HB synthesis is uncoupled with cell growth. *Microb Cell Fact*. 2013;12:123.

Li MZ, Elledge SJ. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol*. 2012;852:51-9.

Liu CJ, Jiang H, Wu L, Zhu LY, Meng E, Zhang DY. OEPR cloning: an efficient and seamless cloning strategy for large- and multi-fragments. *Sci Rep*. 2017;7:44648.

Maheshwari N, Kumar M, Thakur IS, Srivastava S. Cloning, expression and characterization of β- and γ-carbonic anhydrase from *Bacillus* sp. SS105 for biomimetic sequestration of CO_2. *Int J Biol Macromol*. 2019;131:445-452.

Matyushenko I, Sviatukha I, Grigorova-Berenda L. Modern approaches to classification of biotechnology as a part of NBIC-technologies for bioeconomy. *Journal of Economics, Management and Trade*. 2016;14:1-14.

Muyrers JPP, Zhang Y, Stewart AF. Techniques: recombinogenic engineering – new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*. 2001;26:325 -331.

Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*. 2013;4:207–211.

Nishimura T, Akiyoshi K. Amylose engineering: phosphorylase-catalyzed polymerization of functional saccharide primers for glycobiomaterials: amylose engineering: phosphorylase-catalyzed polymerization of functional saccharide primers. *Wires Nanomed Nanobi*. 2016:9.

old.abmgood.com [duomenų bazė internete]. Richmond (Canada): Applied Biological Materials Inc.; sukurta 2004 [cituota 2020-04-07]. Adresas: https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_dna_pol_var.php

Ozdemir E. Biomimetic CO_2 sequestration: 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam. *Energy Fuels*. 2009:23;5725-5730.

Pander B, Harris G, Scott DJ, Winzer K, Köpke M, Simpson SD, Minton NP, Henstra AM. The carbonic anhydrase of *Clostridium autoethanogenum* represents a new subclass of β-carbonic anhydrases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:7275–7286.

Pichia expression kit. A manual for methods for expression of recombinant poteins in Pichia pastoris. Katologo nr. K1710-041. Invitrogen.

Qin X, Qian J, Yao G, Zhuang Y, Zhang S, Chu J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. Appl environ microb. 2011; 77:3600-8.

Rasmussen RS, Morrissey MT. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Adv Food Nutr Res.* 2007;52:237–92.

Reece-Hoyes JS, Walhout AJM. Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018:pdb.top094912.

Reisch M. Marine paint markers strive to meet environmental concerns. *Chem Eng News*. 1990:68;39-68.

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank [duomenų bazė internete]. Brookhaven (JAV): National Laboratory under the leadership of Walter Hamilton. Sukurta 1971 [cituota 2020-04-02]. Adresas: http://www.rcsb.org/.

Rogers C, Oldroyd GED. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot*. 2014;65:1939–46.

Safder I, Khan S, Islam I-U, Ali M, Bibi Z, Waqas M. *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomed Lett*. 2018;4:1-14.

Sasnauskas K, Jomantiene R, Januska A, Lebediene E, Lebedys J, Janulaitis A. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 1992;122:207-11.

Schwarzhans JP, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact*. 2016;15:84.

Senaratne LS, Park PJ, Kim SK. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish. *Bioresource Technol*. 2006;97:191-197.

smolkelab.weebly.com [internetinė svetainė]. Stanford (USA): http://smolkelab.weebly.com/gateway-cloning.html

Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol*. 2016;222:104-16.

Stevenson J, Krycer JR, Phan L, Brown AJ. A practical comparison of ligation-independent cloning techniques. *PLoS One*. 2013;8:e83888.

Sun X, Bai R, Zhang Y, Wang Q, Fan X, Yuan J, Cui L, Wang P. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds. *Appl Biochem Biotech*. 2013:171;1673-1680.

Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J*. 2016:473;2023-2032.

Supuran CT, Capasso C. New light on bacterial carbonic anhydrases phylogeny based on the analysis of signal peptide sequences. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31:1254–1260.

Supuran CT, Capasso C. An overview of the bacterial carbonic anhydrases. *Metabolites*. 2017;7:56.

Swinkels BW, van Ooyen AJJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993;64**:**187–201.

Šiekštelė R, Veteikytė A, Tvaska B, Matijošytė I. Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp.. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015;42:1309–1317.

Tagliavia M, Nicosia A. Advanced strategies for food-grade protein production: a new *E. coli* lactic acid bacteria shuttle vector for improved cloning and food-grade expression. *Microorganisms*. 2019;7:116.

Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881-1955): discover of penicillin. *Singapore Med J*. 2015;56:366–367.

Teng YB, Jiang YL, He YX, He WW, Lian FM, Chen Y, Zhou CZ. Structural insights into the substrate tunnel of *Saccharomyces cerevisiae* carbonic anhydrase Nce103. *BMC Struct Biol*. 2009;9:67.

Thakur N, Thakur AN. Marine biotechnology: an overview. Indian J Biotechnol. 2006;5:263-268

The 3rd international conference on biological sciences and biotechnology. IOP Conf Ser: *Earth Environ Sci*. 2018;130:011001.

Uyama H. Synthesis of poly(aromatic)s I: oxidoreductase as catalyst. In: Kobayashi S, Uyama H, Kadokawa J, editors. Enzymatic polymerization towards green polymer chemistry. Singapore: Springer; 2019. p. 267–305.

Van der Vlist J, Loos K. Transferases in polymer chemistry. *Adv Polym Sci*. 1970:237;21–54.

Verma AS, Agrahari S, Rastogi S, Singh A. Biotechnology in the realm of history. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3:321–3.

Vieira Gomes AM, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F, Parachin NS. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms*. 2018;6:38.

Vullo D, De Luca V, Scozzafava A, Carginale V, Rossi M, Supuran CT, Capasso C. Anion inhibition studies of the fastest carbonic anhydrase (CA) known, the extremo-CA from the bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:7142–5.

Watson JF, García-Nafría J. *In vivo* DNA assembly using common laboratory bacteria: a re-emerging tool to simplify molecular cloning. *J Biol Chem*. 2019;294:15271–15281.

Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, Figueroa CA, Pessoa A, Farías JG. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol*. 2014;44:1043–1048.

Xu C, Ferdosian F. Lignin-based polyurethane (PU) resins and foams. In: Conversion of lignin into bio-based chemicals and materials. Green chemistry and sustainable technology. Berlin: Springer; 2017. p. 133-156.

Zaret KS, Liu JK, DiPersio CM. Site-directed mutagenesis reveals a liver transcription factor essential for the albumin transcriptional enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5469–5473.

Zavada SR, Battsengel T, Scott TF. Radical-mediated enzymatic polymerizations. *Int J Mol Sci*. 2016;17:195.

Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JPP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*. 1998;20:123-128.