

**Hovedoppgave for cand.scient.-graden
Nina Helen Nordstrand**

**Kloning, ekspresjon og
karakterisering
av DNA polymerase I fra
*Thermus thermophilus***



**Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
Vår 2005**

FORORD:

Denne oppgaven ble utført i tidsrommet august 1999 til desember 2004, under veiledning av Professor Tom Kristensen på Institutt for molekylær biovitenskap ved Universitetet i Oslo.

Arbeidet under Tom Kristensens veiledning har gitt meg en grundig innføring i DNA polymeraser, struktur og virkemåte. I tillegg har arbeidet med hovedoppgaven gitt meg innblikk i mange bioteknologiske teknikker på DNA-nivå og protein-nivå, og jeg føler at jeg sitter igjen med laboratoriepraksis og ny kunnskap. Jeg har også lært at ting ikke alltid går etter planen og tålmodigheten min har til tider virkelig blitt satt på prøve.

Jeg vil gjerne takke min familie for all støtten de har gitt meg gjennom tøffe tider og mye motgang. Jeg vil også takke Even Fallan som har hjulpet meg med statistikken, Helen Svensson og Lars-Arne Bue for hjelp og kommentarer under skrivingen av denne oppgaven, men den jeg er aller mest takknemlig overfor er min mor, Karin Nordstrand, som har hjulpet meg på alle mulig måter, med både tak over hodet, økonomisk og ikke minst mentalt. Jeg tror at hadde det ikke vært for henne hadde jeg ikke kommet meg dit jeg er i dag.

Til slutt vil jeg takke alle de som har hjulpet meg med nye metoder, kommet med nyttige tips, støtte og oppmuntring i "tunge stunder" på labben. Nevner i tillegg til Tom Kristensen mine medstudenter Ingvild Flåtten og Ahn Thuan Biuba, stipendiatene Ave Toming og Heidi Tveit. Retter også en stor takk til Randi Ose som gav meg motivasjon til å hoppe uti det igjen da jeg måtte starte oppgaven helt på nytt i august 2004.

Oslo, Mars 2005

Nina Helen Nordstrand

SAMMENDRAG:

DNA polymeraser er av fundamental betydning for levende organismer, ettersom de spiller en avgjørende rolle i replikasjon og reparasjon av DNA. I de siste årene er de blitt viktige genteknologiske verktøy, og varmestabile polymeraser blir benyttet i *in vitro*-teknikker som polymerase kjedereaksjon (PCR) og DNA sekvensering.

I denne hovedoppgaven ble det innført en mutasjon i genet for DNA polymerase I fra bakterien *Thermus thermophilus* og testet det muterte enzymet i sekvenseringsreaksjoner og PCR med både DNA og RNA som templat. Mutasjonen ble innført i kodonet for aminosyre 662, hvor arginin ble byttet ut med asparginsyre, i genet for *Tth* DNA polymerase I hvor mutasjonen F669Y alt var innført og blir i denne oppgaven omtalt som den native polymerasen. Andre har innført tilstedeværende mutasjoner i *Taq* polymerase, (Li, Y. *et. al.*, 1999), og vist at enzymet inkorporerer merkede dideoksynukleotider med jevnere hastighet for alle de fire dideoksynukleotidene i en voksende DNA-kjede, noe som er en viktig egenskap i DNA-sekvensering.

Thermus thermophilus er en varmestabil eubakterie som har et temperaturoptimum ved 80°C, noe som er en fordel i sekvensering ved kjedeterminering hvor DNA-fragmentene blir denaturert ved 95°C i hver syklus. Hvis man da benytter varmestabile DNA polymeraser trenger man ikke å tilsette nytt enzym for hver syklus. Denne mutasjonen skulle føre til mindre diskriminering mot fluorescensmerkede dideoksynukleotider og dette ble undersøkt ved Cy5-dCTP merking med RNA som templat.

Både villtype, nativ og muterte *Tth* polymeraser ble uttrykt i *E.coli*-celler og det ble laget lysat som inneholdt de aktive enzymene. Optimal ekspresjonstid, lineært område og antall enheter i lysatene ble bestemt ved hjelp av en fluorescensbasert aktivitetsanalyse. Deretter ble DNA felt ut fra lysatene ved streptomycinsulfat, og videre undersøkelser av enzymene ble gjort på de streptomycinrensede lysatene. De streptomycinrensede lysatene for den muterte og den native DNA polymerasen ble benyttet i sekvensering av både DNA og RNA som templat på ALF Express™.

Det ble også gjort en statistisk sammenligning mellom den muterte og den native DNA polymerasen og leselengden av sekvensene. Det viste seg at den muterte polymerasen leser omtrent 100 baser lengre enn den native polymerasen og ved hjelp av t-test er det vist at det kun er en 0,6% sannsynlighet for å observere de testresultatene som er gjort i forsøkene i denne oppgaven dersom de to polymerasene skulle ha identiske egenskaper. Med en p-verdi lavere enn både 5 prosent og 1 prosent, kan hypotesen om ingen differanse mellom den muterte og den native polymerasen forkastes både på et 95 % og 99 % sikkerhetsnivå. Den alternative hypotesen om at den muterte leser lengre sekvenser enn den native polymerasen støttes ved et resultat som er statistisk signifikant på 0,6 prosentnivå. Begge polymerasene leser altså sekvensene korrekt, men den muterte polymerasen viste seg å kunne lese lengre sekvenser med sikkerhet enn den native polymerasen.

FORKORTELSER:

Her er en liste over forkortelser og uttrykk brukt for ulike bakterier, stoffer, løsninger og så videre som er beskrevet i oppgaven. Det er også tatt med oversikt over aminosyrer og nukleinsyrer og deres forkortelser. Prefikser som benyttet i oppgaven er også forklart.

aa	Aminosyre
amp	Ampicillin
AMV	Avian myeloblastosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-trifosfat
bp	Basepar
BSA	Bovint serum albumin
bis-akrylamid	N,N'-metylenbisakrylamid
<i>Bce</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Cy5	Navn på et bestemt fluorescerende indokarbocyanin
C-terminal	Karboksylysyreenden av et polypeptid
ddNTP	2'-dideoksynukleosid-5'-trifosfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	2'-deoksynukleosid-5'-trifosfat
DOC	Deoksyholat
dsDNA	Dobbeltrådet DNA (double stranded)
DTT	Ditiotreitol
dNMP	2'-deoksynukleosid-5'-monofosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EMBL	Det europeiske molekylærbiologiske laboratorium
<i>et al.</i>	Og andre (Latin: <i>et aliae</i>)
EtBr	Etidiumbromid
FS	Fluorescent Sequencing
FY	Mutasjon fra fenylalanin (F) til tyrosin (Y)
<i>In vitro</i>	Prosess som skjer i reagensrøret
<i>In vivo</i>	Prosess som skjer i levende celler
IPTG	Isopropyl-tio- β -galaktosid
kb	Kilobaser
kDa	Kilodalton
Klenow	Klenow-fragmentet til DNA polymerase I fra <i>E. coli</i>
Klen T_{th}	Klenow-fragmentet til DNA polymerase I fra <i>Thermus themophilus</i>
LB-medium	Luria/Bertani buljong
min	minutt
mRNA	Messenger RNA
NaOAc	Natriumacetat
N-terminal	Aminosyreenden av et polypeptid

NTP	Nukleosidtrifosfat
OD ₆₀₀	Optisk tetthet ved 600 nm (optical density)
PAGE	Polyakrylamidgelelektroforese
PCR	Polymerasekjedereaksjonen (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyetylen glykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-N, N'-bis(2-etansulfonsyre)
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid
<i>polA</i>	Genet som koder for DNA polymerase I
pol I	DNA polymerase I
PP _i	Pyrofosfat
<i>pTth</i>	plasmidvektor med gen fra <i>Thermus thermophilus</i>
RD	Mutasjon fra arginin (R) til asparginsyre (D)
RNA	Ribonukleinsyre
rpm.	Omdreining pr. minutt
rRNA	Ribosomalt RNA
RT	Romtemperatur
SDS	Natriumdodesylsulfat (sodium dodecylsulphate)
sek	Sekund
ssDNA	Enkeltrådet DNA (single stranded)
TAE-buffer	Tris-Acetate-EDTA-buffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-buffer	Tris-borat-EDTA-buffer
TCA	Trikloreddiksyre
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin
T _m	Smeltepunkt
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris-hydroksyl-metyl-ammonium-metan (Tris-base)
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>TthFY</i>	<i>Thermus thermophilus</i> med mutasjonen F669Y
<i>TthRDFY</i>	<i>Thermus thermophilus</i> med mutasjonene R662D og F669Y
<i>TthRDWT</i>	<i>Thermus thermophilus</i> med mutasjonen R662D (fra villtypen)
<i>TthWT</i>	Villtype <i>Thermus thermophilus</i>
U	Enzymheter (units)
UiO	Universitetet i Oslo
UV-lys	Ultrafiolett lys
V	Volt
WT	Villtype
Å	Ångstrøm (10 ⁻¹⁰ m)

Aminosyre	Forkortelse	1-bokstavforkortelse
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsyre	Asp	D
Cystein	Cys	C
Fenylalanin	Phe	F
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsyre	Glu	E
Glysin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleusin	Ile	I
Leusin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Nukleotid	Forkortelse	1-bokstavforkortelse
Adenosin-trifosfat	ATP	A
Cytidin-trifosfat	CTP	C
Guanosin-trifosfat	GTP	G
Tymidin-trifosfat	TTP	T
Uridin-trifosfat	UTP	U
Deoksyadenosin-trifosfat	dATP	dA
Deoksytyridin-trifosfat	dCTP	dC
Deoksyguanosin-trifosfat	dGTP	dG
Deoksytymidin-trifosfat	dTTP	dT
Deoksyuridin-trifosfat	dUTP	dU

Prefiks	Ordlyd	Verdi
k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	piko	10^{-12}

INNHALDSFORTEGNELSE:

FORORD:	2
SAMMENDRAG:	3
FORKORTELSER:	4
INNHALDSFORTEGNELSE:	7
1. INNLEDNING:	11
1.1. Ekstremofiler	11
1.1.1. Celle struktur og oppbygging av <i>Thermus</i> -bakterier.	12
1.1.1. Fysiologi og metabolisme hos <i>Thermus</i> -bakteriene.	12
1.2. DNA polymeraser	13
1.2.1. Inndeling av DNA polymeraser i ulike familier.	14
1.2.2. Strukturen av familie A DNA polymerase.....	17
1.2.3. Funksjonene til DNA polymerase I.	20
1.3. DNA polymeraser i genteknologi	28
1.3.1. Anvendelser av DNA polymeraser i PCR.	29
1.3.2. Anvendelse av DNA polymeraser i sekvensering.	30
1.3.3. Forbedringer av polymeraser ved <i>in vitro</i> -mutagenese.	31
1.4. DNA polymerase I fra <i>Thermus thermophilus</i>	34
1.4.1. DNA polymerase fra <i>Thermus thermophilus</i> HB-8.	34
1.5. Målet med oppgaven	35
2. METODER	36
2.1. Arbeid med mikroorganismer	36
2.1.1. Sterilteknikk.....	36
2.1.2. Dyrking av <i>Escherichia coli</i> -bakterier.....	36
2.1.3. Dyrking av bakteriofag M13.....	38
2.1.4. Håndtering av avfall fra bakteriekulturer.....	38
2.2. Arbeid med DNA	38
2.2.1. Plasmidisolering.....	39
2.2.2. Isolering av enkeltrådet DNA fra bakteriofag M13.....	41
2.2.3. Agarosegelelektroforese av DNA.....	42
2.2.4. Kvantifisering av DNA.....	42

2.2.5. Polymerase kjedereaksjon (PCR)	44
2.2.6. Kutting med restriksjonsenzymmer	45
2.2.7. Transformering av kompetente celler	46
2.2.8. Mutagenese av DNA	46
2.3. Analyse av DNA sekvens.	51
2.3.1. Syklisk sekvensering	51
2.3.2. Automatisk sekvensering med ALFExpress™	52
2.4. Ekspresjon av rekombinante proteiner i <i>E.coli</i>.	55
2.4.1. Ekspresjon og produksjon av cellefritt lysat	55
2.4.2. Produksjon av cellefritt lysat fra 1 ml kultur	56
2.5. Rensing og oppkonsentrering av proteiner.	56
2.5.1. Fjerning av DNA	56
2.6. Proteinbestemmelse ved Lowry-metoden.	57
2.6.1. TCA-felling av proteinene	57
2.6.2. Lowry-analysen	57
2.7. SDS-PAGE (Polyakrylamidgelelektroforese).....	58
2.7.1. Tillaging av geler til SDS-PAGE	58
2.7.2. Tillaging av prøver til SDS-PAGE	59
2.7.3. Comassie-farging av proteingeler	59
2.7.4. Sølvfarging av proteingeler	60
2.7.5. Sølvfarging av DNA på ikke-denaturerende polyakrylamidgel.	60
2.7.6. Tørking av polyakrylamidgeler	61
2.8. Måling av polymeraseaktivitet.....	62
2.8.1. Fluorescensbasert polymeraseaktivitetsassay	62
2.8.2. Beregning av antall enzymenheter	63
2.9. Teknikker for å studere RNA.	65
2.9.1. Sekvensering av RNA	65
2.10. Ikke-radioaktiv merking og deteksjon.....	66
2.10.1. Fluorescensmerking og deteksjon	66
3. RESULTATER.	68
3.1. Mutagenese av <i>Tth</i> polymerase I.	69
3.1.1. Oppdyrking av klonene p <i>Tth</i> FY og p <i>Tth</i> WT	69
3.1.2. Mutagenese	69
3.2. Ekspresjon av <i>Tth</i> DNA polymerase I varianter.....	71
3.2.1. Ekspresjon og produksjon av rålysat	71
3.3. Fluorescensbasert DNA polymeraseaktivitetsassay.....	73

3.3.1. Aktivitetsanalyse for <i>Tth</i> RDFY polymerasen.....	73
3.3.2. Aktivitetsanalyse for <i>Tth</i> FY polymerasen.....	75
3.3.3. Aktivitetsanalyse for <i>Tth</i> WT polymerasen.....	77
3.3.4. Varmebehandlet og ikke varmebehandlet rålysat.....	78
3.4. Rensing av polymerase-variantene.....	78
3.4.1 Fjerning av DNA ved hjelp av streptomycinsulfat.....	78
3.5. Sekvensering med <i>Tth</i> polymeraser.....	80
3.5.1. Sekvensering med <i>Tth</i> FY og <i>Tth</i> RDFY polymerase.....	80
3.6. Sekvensering med RNA som templat.....	86
3.7. Cy5-dCTP merking av templat.....	86
4.0 DISKUSJON.....	88
4.1 Oppsummering av resultatene.....	88
4.2 Mutagenese av <i>Tth</i> polymerase I.....	89
4.3 Ekspresjon og isolering av rekombinante proteiner.....	90
4.3.1 Ekspresjon av <i>Tth</i> polymerase I varianter.....	90
4.3.2 Tillaging av rålysat.....	91
4.4. Rensing av proteiner.....	91
4.4.1 Fjerning av DNA.....	92
4.5 Aktivitetsassay.....	92
4.6 Sekvensering med mutert og nativ <i>Tth</i> polymerase.....	93
4.6.1. Sekvensering med DNA som templat.....	94
4.6.2. Sekvensering med RNA som templat.....	94
4.7. Cy5-dCTP merking av templat.....	94
4.8. Videre arbeid.....	95
5. MATERIALER:.....	96
5.1 Arbeid med mikroorganismer.....	96
5.2 Arbeid med DNA.....	96
5.2.1 isolering av plasmid.....	96
5.2.2 Agarosegelelektroforese av DNA.....	97
5.2.3 Sølvfarging av DNA på ikke-denaturerende polyakrylamidgel.....	97
5.3 Analyse av DNA-sekvens.....	98

5.3.1 Løsninger til bruk for nukleotidsekvensering på ALFExpress™	98
5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset <i>Taq</i> DNA polymerase FS	98
5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset <i>Taq</i> og <i>Tth</i> DNA polymerase.	99
5.3.3. Lav dCTP/dNTP termineringsløsning.	99
5.4 Ekspresjon av rekombinante proteiner	100
5.4.1 Løsninger for produksjon av grovlysat:	100
5.5 Rensing og oppkonsentrering av proteiner	100
5.5.1 Fjerning av DNA:	100
5.6 Lowry-metoden	101
5.7 SDS-PAGE.....	101
5.7.1 tillaging av geler til SDS-PAGE	101
5.7.2 Tillaging av prøver til SDS-PAGE	102
5.7.3 Comassie-farging av geler etter SDS-PAGE:	102
5.7.4 Sølvfarging av proteingeler etter SDS-PAGE:	103
5.7.5 Tørking av polyakrylamidgeler:	103
5.8 Polymeraseaktivitetsassay	103
5.9. Generelle løsninger og buffere.....	104
5.10. Formel benyttet under beregning av t-test.....	105
5.11. Kjemikalier og reagenser	105
5.12. Nukleinsyrer, plasmider og kit benyttet i oppgaven.....	106
5.12.1. Nukleinsyrer og nukleotider.	106
5.12.2. Plasmider.....	106
5.12.3. Ulike kit benyttet i oppgaven.....	107
5.12.3. Ulike markører benyttet i oppgaven.	107
5.12. Apparater og utstyr benyttet i oppgaven.....	107
REFERANSER:	109

1. INNLEDNING:

1.1. Ekstremofiler.

Det finnes mikroorganismer som har tilpasset seg økologiske forhold som for mennesker regnes som ekstreme. Mikrobiologer har funnet bakterier som lever 3 kilometer under jordoverflaten, i oljebrønner blant annet i Nordsjøen og ved undersjøiske vulkanutløp i Atlanterhavet hvor temperaturene kan komme opp i over 100°C. Mikroorganismer er også isolert fra varmekilder, geysirer, og fra syrebevart mat og fruktjuicer. Det finnes en rik fauna av saltelskende mikroorganismer i det ekstremt salte Dødehavet og de natriumkarbonatholdige innsjøene i Rift Valley i Kenya. Organismene som er isolert fra disse habitatene beskrives som ”ekstremofiler”, og omfatter termofile, halofile, psycrofile, alkalifile, acidofile og piezofile (tidligere kalt barofile). (Herbert *et. al.* 1992)

- Termofil: En organisme, vanligvis prokaryot, hvor temperatur-optimum for vekst er over 45°C. Nær ekvator kan temperaturen på jordoverflaten bli over 50°C og i en kompost kan temperaturen bli opptil 65°C. Varme kilder, fumaroler og geotermiske kanaler på havbunnen kan også gi høy temperatur hvor det lever organismer, ofte organismer fra Archaea. I tilfellet hypertermofiler er optimumet mellom 80°C og 110°C. Eukaryoter kan ikke leve hvis temperaturen blir høyere enn 60°C.
- Halofil: En organisme som lever i områder med høy ionestyrke og høyt innhold av NaCl (*Halobacterium*, *Haloferax*) (behøver minst 0,2M (3-30%) salt for å vokse). Disse organismene er ofte rosa og rødfarget av karotenoider.
- Psycrofil: En organisme med temperaturoptimum på 15°C eller lavere, og som ikke kan vokse ved temperaturer over 20°C. Noen organismer kan leve ved temperaturer helt ned til -10°C.
- Acidofil: Organismer som lever ved lav pH (surt miljø). Bare noen få arter bakterier kan leve ved pH lavere enn 2. Sopp er som gruppe vanligvis mer syretolerante enn bakterier. Obligate acidofile bakterier er *Thiobacillus* og Archae *Sulfolobus* som oksiderer sulfider og lager svovelsyre.
- Alkalifil: En organisme med optimale vekstforhold ved pH over 10.
- Piezofil: En organisme som har optimale vekstbetingelser ved høyt hydrostatisk trykk.

Forskningen på de termofile mikroorganismene ble stimulert av isoleringen av den termofile eubakterien *Thermus aquaticus* fra en varmekilde i Yellowstone Nasjonalpark i 1969 (Brock *et. al.* 1969). Forskningen på termofiler har ført til oppdagelsen av mer enn 20 klasser av mikroorganismer som vokser best ved temperaturer på 80°C eller mer. Det

har også ført til oppdagelsen av et tredje domene; Archea (Woese *et. al.* 1977). De fleste av Archea i termofilene er ekstremt termofile, eller hypertermofile som de også kalles. De hypertermofile har fått mye oppmerksomhet siden de ikke bare overlever, men også vokser optimalt ved temperaturer over 100°C (Herbert 1992). Siden mange industrielle enzymer benyttes ved temperaturer over 50°C er det stor interesse for å utvikle nye varrestabile enzymer til bruk i moderne bioteknologi. Disse enzymene er tilsatt i produksjonen av naturlige søtningsstoffer, produksjonen av legemidler og som tilsetninger i tekstil industrien. DNA polymeraser er et viktig verktøy i molekylærbiologien, medisinsk og veterinærmedisinsk diagnostikk innen medisin.

1.1.1. Celle struktur og oppbygging av *Thermus*-bakterier.

Bakterier fra familien *Thermus* er Gram-negative og har en cellevegg som ligner på celleveggen til ekte Gram-negative bakterier. Det er mange egenskaper til *Thermus* som er mer i samsvar med Gram-positivitet og det er trolig slik at *Thermus* tilhører en fylogenetisk gren dannet før Gram-positive og Gram-negative organismer skilte lag. Mange stammer fra den opprinnelige isoleringen danner lange filamenter, men etter gjentatte overføringer i laboratoriemedier vokser de fleste cellene nå som pleomorfske stavformede og korte filamenter. Alle stammene er cytokrom oksidasepositive og ubevegelige i væskekultur, og de danner ikke flageller. For kulturer som er dyrket i forskjellige medium, inkludert stacking agar, er det heller ikke observert endosporer.

Elektronmikroskopi viser at celleveggen utenfor plasmamembranen er bygd opp av et tynt, tett, lag som antas å inneholde peptidoglykan, omgitt av et ytre lag med en bølgeprofil som er nært forbundet med peptidoglykan laget, men bare ved fordypningene. Peptidoglykanet inneholder den dibasiske aminosyren ornitin og er en relativt sjelden peptidoglykantype som ikke er funnet hos andre Gram-negative bakterier. En viktig komponent i celleveggen til *Thermus thermophilus* HB-8 består av et kalsium-protein kompleks.

Den polare fraksjonen fra flere gulpigmenterte og fargeløse stammer av *Thermus* inneholder et stort glykolipid som er en diacyl-diglykosyl-(N-acyl)-glukosaminyl-glykosyl-glyserol, hvor hexosen kan være enten glukose eller galaktose og heksosaminet kan være glukosamin eller galaktosamin. Hos *Thermus thermophilus* har dette svære glykolipidet strukturen: galaktofuranosyl- β -1:2-galaktopyranosyl- α -1:6-glukosaminyl-(1:5-metylheksadekanoyl)- β -1:2-glukopyranosyl- α -diglyserid(2,3), og utgjør 70% av totallipidet. Dette rikelige innholdet av karbohydrater i membrankomponentene er karakteristisk for *Thermus*-stammene. (Kristjansson, 1992)

1.1.1. Fysiologi og metabolisme hos *Thermus*-bakteriene.

Bakterier fra *Thermus*-slekten er aerob hetrotrofe og vokser ved lave konsentrasjoner av organiske substrater. Stedene hvor *Thermus* vokser har meget lave konsentrasjoner av oppløste organiske stoffer. En mulig kilde for det organiske materialet er et fotosyntetiserende algebakterie underlag som vokser i de nærliggende kjøligere områdene.

Ved 70°C er løseligheten av oksygen imidlertid så lav at veksten muligens kan like lett bli begrenset av oksygen som av karbon, og dette forklarer den lave veksthastigheten som er rapportert for floraen i varmekilder ute i naturen.

Flere monosakkarider benyttes som karbonkilde av *Thermus*-stammer, mens pentoser vanligvis ikke blir metabolisert i det hele tatt. Proteiner som elastin, fibrin og kasein hydrolyseres av mange isolater, men noen stammer er ikke i stand til å hydrolysere alle disse. Endel stammer vil vokse i basale saltmedier med ammonium som nitrogenkilde og en passende karbonkilde. Mange stammer trenger i tillegg vitaminer for å vokse på minimale vekstmedier med en enkel karbonkilde. Mange stammer benytter seg av acetat, pyruvat, prolin, glyserol og glutamat. (De rødpigmenterte stammene er generelt sett ikke i stand til å vokse på acetat og pyruvat. Disse stammene benytter pyroler.) Opptaket av glutamat i *Thermus* skjer ved høyaffinitets natrium symport og er avhengig av en protongragient. Studier av metabolismen til de termofile bakteriene indikerer en fullstendig trikarboksylsyre (TCA)-syklus, som sammen med isocitrat lyase og malat syntase, i tillegg gir en glykolsylat bypass.

Elektrontransportkjeden til *Thermus thermophilus* omfatter NADH dehydrogenase, menaquinon MK-8 og cytokrom b, c, aa₃ og o. Grunnet den høye permeabiliteten til cellemembranen overfor protoner er den molare innstrømmingen av glukose lav sammenlignet med konstitusjonelle (strukturelle) sammenlignbare mesofiler.

De gule og ikke-pigmenterte stammene har et temperaturoptimum for vekst i *Thermus*-medium på 70-75°C. Minimumstemperaturen er på omtrent 37-45°C og maksimum på ca 79°C, men noen få stammer, som *Thermus thermophilus* HB-8, koker ved temperaturer opp til ca 85°C. pH optimum er mellom 7,5-8,0, men noen stammer vil vokse ved pH 5,1 og mange vil vokse ved pH 9,5. De rødpigmenterte stammene fra blant annet *Thermus ruber* har en lavere vekst temperatur med et optimum på omtrent 60°C, minimum mellom 35-40°C og et maksimum nærmere 70°C. (Kristjansson, 1992)

1.2. DNA polymeraser.

En egenskap som særpreger levende organismer er deres evne til å overføre genetisk informasjon fra en generasjon til den neste. Siden alle levende organismer trenger system for overføring av genetisk informasjon fra generasjon til generasjon, tror man at kopiering av DNA fra foreldre til avkom var blant de første enzymatiske aktivitetene som ble utviklet da livet oppstod for 3-4 milliarder år siden. For å få til dette har naturen utviklet et perfekt justert replikasjonssystem for hver enkel organisme med flere DNA polymeraser som utfører funksjonene i replikasjonen og reparasjon.

DNA polymeraser er en gruppe enzymer som syntetiserer DNA og finnes i alle typer organismer. De sørger for en korrekt videreføring av den genetiske informasjonen, slik at de genetiske funksjonene opprettholdes og det særegne ved hver art overføres til avkommet.

Noen DNA polymeraser utfører replikasjon av DNA, mens andre typer er mer involvert i reparasjon av ødelagt DNA i tillegg til å rette opp feilinkorporeringer fra replikasjonen. Under DNA polymerasenes kopiering av arvematerialet kan det imidlertid oppstå feil (mutasjoner), og disse mutasjonene har vært med på å bestemme den evolusjonsmessige utviklingen av artene. DNA polymerase kan bare lage DNA i 5' til 3'-retning og dermed ikke starte en ny kjede alene siden enzymet kan bare hekte på nukleotider til 3'-OH-gruppen til en allerede eksisterende oligo/polynukleotid. Derfor er en primer, oftest et kort stykke med RNA laget av en primase, nødvendig.

DNA polymeraser er ikke bare av fundamental betydning for levende organismer, men de er også blitt viktige verktøy i genteknologiske metoder. DNA polymeraser brukes i teknikker som polymerase kjedereaksjonen (PCR) og DNA sekvensering. I disse metodene benytter man varmestabile DNA polymeraser som er stabile også ved temperaturer opptil 70-80°C. DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus*, som studeres i denne oppgaven, er en slik varmestabil DNA polymerase. I dag har man kjennskap til mange typer DNA polymeraser, og deres egenskaper er avgjørende for bruksområdet. Isolering og karakterisering av nye DNA polymeraser er med på å øke kunnskapen om disse enzymene, samtidig som nye enzymer med bedre eller nye egenskaper kan identifiseres. Økt forståelse av disse enzymene gjør også at man kan konstruere nye polymeraser med spesielt ønskede egenskaper.

1.2.1. Inndeling av DNA polymeraser i ulike familier.

De fleste cellyper, både eukaryote og prokaryote, benytter ulike typer DNA polymeraser som har forskjellige oppgaver i replikasjon, rekombinasjon og reparasjon av DNA i cellen. I selve replikasjonen bidrar flere polymeraser i de ulike prosessene; smelting av DNA duplexen ved replikasjonsorigo, elongering av "leading strand", elongering av "lagging strand", fjerning av RNA-primerene og korrekturlesing av nysyntetisert DNA. Disse ulike DNA polymerasene har utviklet seg og blitt spesialisert gjennom evolusjonen. Dette gir grunnlaget for å dele de ulike DNA polymerasene inn i ulike familier, basert på sekvenslikhet og cellulær funksjon. (Tabell 1.1)

Den første DNA polymerasen som ble identifisert og isolert var DNA polymerase I fra *Escherichia coli* (Kornberg *e. al.*, 1956) og man antok at det var denne polymerasen som stod for replikasjonen av DNA i bakterien. Dette ble senere motbevist av eksperimenter på 70-tallet. Det førte til at man startet letingen etter flere DNA polymeraser i *E.coli*, og man fant DNA polymerase II og III (Kornberg, *et al.* 1970, Kornberg, *et al.* 1971, Kornberg og Baker, 1992).

Etterhvert ble flere DNA polymeraser identifisert, isolert og karakterisert, og man forsøkte å dele disse polymerasene inn i ulike familier med utgangspunkt i DNA polymerase I, II og III fra *E.coli*. Familiene ble kalt familie A, B og C etter homologi med de tre genene *polA*, *polB* og *polC* i *E.coli*, som koder for henholdsvis DNA polymerase I, II og III. (Braithwaite og Ito, 1993)

Tabell 1.1: En verden av DNA polymerase: familier, fordeling, aktiviteter, og egenart (Filee *et al*, 2001)

Polymerase familie	Familie A	Familie B	Familie C	Familie D	Familie X	Familie Y
Fordeling	-Bakterier -Mitokondrion (γ) -Metazoa, Planter (mus308) -Bakteriofag	- γ -Proteobakterie -Eukaryoter ($\alpha, \delta, \zeta, \epsilon$) -Archaea -Plasmid, Virus, Bakteriofag	-Bakterier -Kryptiske bakteriofag -Plasmid	 -Euryarchaeota	-Bakterier -Eukaryoter (μ, β, TdT) -Archaea -Virus	Rad30/Din/UmuD -Bakterier (DinX, DinB, UmuD) -Eukaryoter (Rad30, ι , DinB, REV1) -Archaea (Dbh) -Plasmid
Assosierende Aktivitet	3'-5' Exonuclease	3'-5' Exonuclease	3'-5' Exonuclease	3'-5' Exonuclease	5' phosphatase (β)	
Særegenhet	5'-3' Exonuclease	Primase (α) 2 kategorier: -Protein-primet, -RNA-primet Eukaryotisk polymerase ζ utfører translaterende reparasjon			Templat-uavhengig polymerase	

I tabell 1.2 blir de 3 første familiene, A, B og C tatt for seg. Det er siden blitt opprettet enda flere nye familier av polymeraser.

Tabell 1.2: Hovedfamilier og subklassifisering av de tre første DNA polymerase familiene. I oversikten er bare et utvalg av ulike polymeraser tatt med (Braitwaite og Ito, 1993)

DNA polymerase familie A	DNA polymerase familie B	DNA polymerase familie C
1. Bakterielle DNA polymeraser - <i>E.coli</i> DNA polymerase I - <i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase I - <i>Thermus thermophilus</i> DNA polymerase I 2. Bakteriofag DNA polymeraser - T7 DNA polymerase 3. Mitokondrielle DNA polymeraser - Gjær mitokondrielle DNA polymerase (MIP1) 4. 5' til 3' exonukleaser med homolog sekvens til <i>E.coli</i> DNA polymerase - T4 Rnase H (gp 33,2) - T5 eksjonuklease (gp D15) - T7 eksjonuklease (gp 6)	1. Bakterielle DNA polymeraser - <i>E.coli</i> DNA polymerase II 2. Bakteriofag DNA polymeraser - T4 DNA polymerase 3. Archeabakterielle DNA polymeraser - <i>Therococcus litoralis</i> DNA polymerase (Vent) - <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA polymerase (Pfu) 4. Eukaryote DNA polymeraser - DNA polymerase alpha - DNA polymerase delta - DNA polymerase epsilon - Andre eukaryote DNA polymeraser 5. Virale DNA polymeraser - Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase - Epstein Barr virus DNA polymerase	1. Bakterielle replikative DNA polymeraser - <i>E.coli</i> DNA-polymerase III α - <i>Bacillus subtilis</i> DNA-polymerase III 2. <i>E.coli</i> dnaQ (MutD) - <i>E.coli</i> DNA polymerase III ϵ

Familie A DNA polymeraser:

Denne gruppen viser sekvenshomologi med *E.coli* DNA polymerase I og er DNA avhengige DNA polymeraser, bestående av en enkel polypeptidkjede på ca. 100 kDa. I tillegg til polymeraseaktivitet har de også 3'-5' og 5'-3'eksonukleaseaktivitet. *E.coli* DNA polymerase I har trolig rolle som reparasjonsenzym under replikasjonen. Det antas at *E.coli* DNA polymerase I reparerer ødelagt dupleks-DNA og fjerner RNA-primeren i Okazaki fragmentene under replikasjonen. De fleste kommersielt benyttede enzymene hører til i denne gruppen. Gruppen kan deles inn i fire undergrupper (se tabell 1.2);

Familie B DNA polymeraser:

Denne gruppen viser sekvenshomologi med *E.coli* DNA polymerase II og er DNA avhengig DNA polymeraser. Enzymene i denne gruppen består av en polypeptidkjede på ca. 90 kDa med assosierte subenheter på henholdsvis 27.5 og 10 kDa. *E.coli* DNA polymerase II innehar polymerase- og 3'-5' eksonuklease aktivitet, men mangler 5'-3' eksonuklease aktiviteten. Funksjonen til denne gruppen er noe uklar, men de har antakeligvis en funksjon i reparasjon av DNA. Også i mange kommersielt utnyttede enzymer som Vent, Pfu og alle de andre Archae-enzymene (se tabell 1.2)

Familie C DNA polymeraser:

Denne gruppen med DNA polymeraser viser strukturell homologi med *E.coli* DNA polymerase III. De er proteinkomplekser på ca 900 kDa, med over 20 subenheter. Dette er også det hovedreplikerende enzymet i *E.coli* bakterien, og tilsvarende enzymkompleks er identifisert i flere bakterietyper. Det er homologi med den polymeriserende α -subenheten som angir plassering i polymerase familie C.

Familie D DNA polymeraser:

Familie D DNA polymerase finnes i stor utstrekning i Euryarchaeota fra Archeaene og mye tyder på at de deltar i DNA replikasjon, reparasjon og rekombinasjon. Denne familien er nylig oppdaget og til nå er det funnet 12 Archea som inneholder familie D DNA polymeraser. De har en molekylær masse på 420 kDa, men strukturen er foreløpig ikke kjent, man vet bare at den består av en liten subenhet, DP1, og en stor subenhet, DP2. Samspillet mellom disse subenhetene er essensielt for stabiliteten og hele aktiviteten til enzymet. DP1 eller DP2 uttrykt i *E.coli* er ustabil og degraderes lett. Polymerase D har, som de andre DNA replikasjons polymerasene en sterk DNA polymerisering og '3-5' eksonuklease aktivitet, men vanlige katalytiske motiv fra andre polymeraser er fraværende eller ikke-funksjonelle i polymerase D (Shen *et al*, 2003).

Familie X DNA polymeraser:

Denne familien består av DNA polymeraser som viser homologi med den mammalske ikke-replikerende DNA polymerase β (Pelletier, *et al.* 1994), reparasjons polymerasen,

som er avhengig av templat for å fungere. Denne polymerasen tilhører nukleotidyl-transferase superfamilien og inkluderer et stort antall forskjellige molekyler (Filee *et al.*, 2001).

Blant medlemmene av familie X DNA polymerase-superfamilien omfattes den lille subenheten til eukaryotisk primase. Dette er en RNA polymerase som syntetiserer et diribonukleotid som elongeres og termineres når oligomeren når en bestemt lengde. Terminal deoksyribonukleotidyl transferase, som legger til en deoksyribonukleotid til DNA terminus, og er templat-uavhengig, tilhører også DNA polymerase X-familien. I tillegg tilhører kanamycin nukleotidyl transferase, som overfører et ribonukleotid til kanamycin for å deaktivere forbindelsen, denne familien.

Familie Y DNA polymeraser:

Denne familien kalles også for UmuC/DinB familien. Denne siste familien er blitt oppdaget i løpet av de siste få årene og er en superfamilie som ved dags dato består av over 30 ulike medlemmer. Denne nye familien omfatter alle enzymer som overfører nukleotider til hydroksyl akseptorgrupper. Det vil si enzymer som ulike DNA/RNA ligaser og primaser, og proteiner som er involvert i ulike aspekter ved transkripsjon, prosessering og replikasjon. Fellestrekket mellom disse enzymene er at de ofte er involvert i tilfeller der det har oppstått skade på templat-DNA, og de replikerer med lav fidelitet over det skadete området. Best kjent er vel SOS-responsen hos *E.coli* hvor tre proteiner, kodet av *umuC*, *umuD* og *dinB*, som alle er medlem i denne familien, deltar. (Friedberg, 2001, Sutton *et al.*, 2001) Når *umuC* og *umuD* interagerer, dannes det et tettpakket kompleks, *umu D₂C*, med iboende DNA polymerase aktivitet, polymerase V (Goodman og Tippin, 2000).

1. Error-prone DNA polymeraser

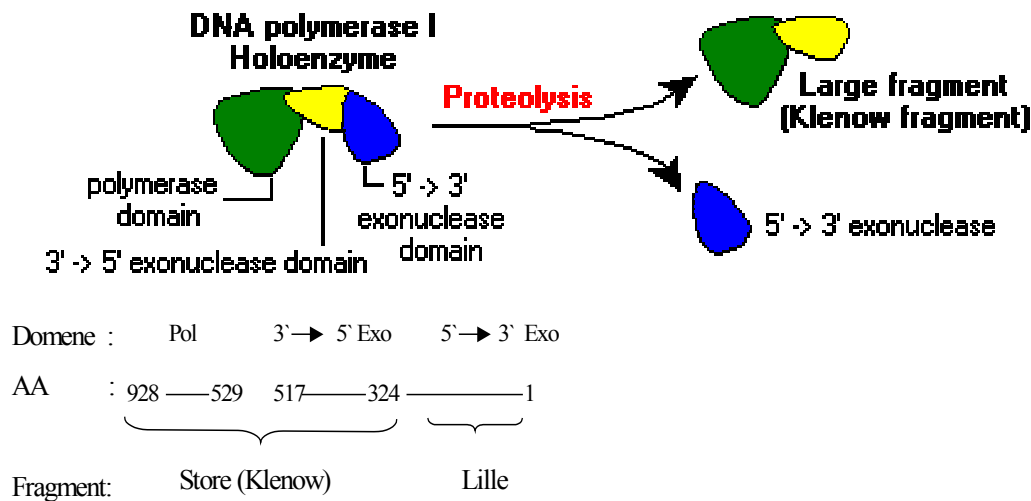
- *E.coli* polymerase IV(*dinB*)
- *E.coli* polymerase V (*umu D₂C*)
- *S.Cerevisiae* polymerase η (RAD30)
- *S.Cerevisiae* Rev1 (REV1)

DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus* (*Tth* polymerase) som blir studert i denne oppgaven er en varmestabil polymerase som tilhører familie A, og har sekvenshomologi med *E.coli* DNA polymerase I.

1.2.2. Strukturen av familie A DNA polymerase.

E.coli DNA polymerase I var den første polymerasen som ble oppdaget, og dermed den polymerasen som er grundigst studert både med tanke på sekvens, utgangspunktsstruktur og mekanisme. Studier av denne polymerase blir derfor ofte benyttet som prototype for å beskrive enzymer som tilhører samme familie.

E. coli DNA polymerase I er et globulært protein på 65Å som ved begrenset proteolyse spaltes i to fragmenter; 1) et stort C-terminalt fragment (Klenow-fragmentet) på 68 kDa (605 aa) som består av polymerase- og 3'-5'-eksonukleasedomenet, og 2) et lite N-terminalt fragment på 35 kDa (323 aa) bestående av 5'-3'-eksonukleasedomenet. De tre domene kommer etter hverandre som perler på en snor med rekkefølgen N-(5'-3'-eksonuklease)-(3'-5'-eksonuklease)-(5'-3'-polymerase)-C og er vist i figur 1.1. DNA polymerase I har nødvendigvis ikke alle disse tre domene, og selv om de foreligger, er de ikke nødvendigvis enzymatisk aktive. *Taq* DNA polymerase I har for eksempel 3'-5'-eksonukleasedomenet, men ingen 3'-5'-eksonukleaseaktivitet.



Figur 1.1 *E. coli* DNA polymerase I. Figuren viser foreslått domenestruktur av *E. coli* polymerase I. Enzymet arbeider med et brudd (nick) i DNA-molekylet. I den C-terminale enden av dette 103 kDa (928 aa) store enzymet finnes polymerasedomenet, i midten 3'-5'-eksonukleasedomenet og i den N-terminale enden, er 5'-3'-eksonukleasedomenet.

På tross av miljødiversitet, er enzymene i denne familien bemerkelsesverdig konservert. Dette vises blant annet i studier der en polymerase fra en organisme kan erstatte polymerasen i en annen organisme, hvor polymeraseaktiviteten er fjernet. For eksempel kan DNA polymerase I fra *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase) erstatte DNA polymerase I i *E. coli*. (Suzuki *et al.*, 1996). Dette tyder på at DNA polymerase I har en lignende funksjon og benytter mye av de samme mekanismer i ulike organismer.

Den første røntgenkrystallografiske strukturen av en DNA polymerase var av Klenow-fragmentet, og strukturen viste seg å kunne sammenliknes med en delvis åpen høyre hånd bestående av α -heliksene I, H, H₁ og H₂ som "tommel", β -plater som "håndbak" og α -heliksene L, M, N, O₁, O₂ og Q som "fingre" (Joyce, C.M., Steitz, T.A., 1995) (fig. 1.2). Alle hittil kjente polymeraser, uavhengig av deres detaljerte domenestrukturer, har denne håndstrukturen felles. Håndbak-subdomenet har stor strukturell homologi familiene imellom, mens finger- og tommel-subdomenene varierer.

Håndbak-subdomenet.

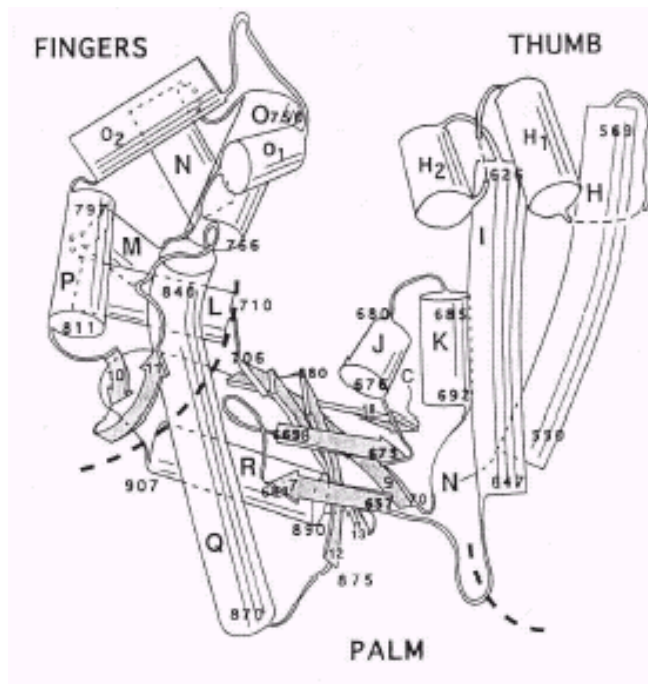
Funksjonen til håndbak-subdomenet som hovedsakelig består av β -plater, ser ut til å være katalyse av fosforyl overføringsreaksjonen. I dette området ligger de katalytisk viktige karboksylatsidekjedene som er essensielle for polymeriseringen.

Finger-subdomenet.

Finger-subdomenet består hovedsakelig av α -helikser som binder og orienterer det enkeltrådede DNA-molekylet (ssDNA-molekylet), samt binder β - eller γ -fosfatgruppen i den innkommende dNTPen (Astatke, M., *et al.* 1995, Joyce, C.M., Steitz, T.A., 1994, Beese, L.S., *et al.* 1993).

Tommel-subdomenet.

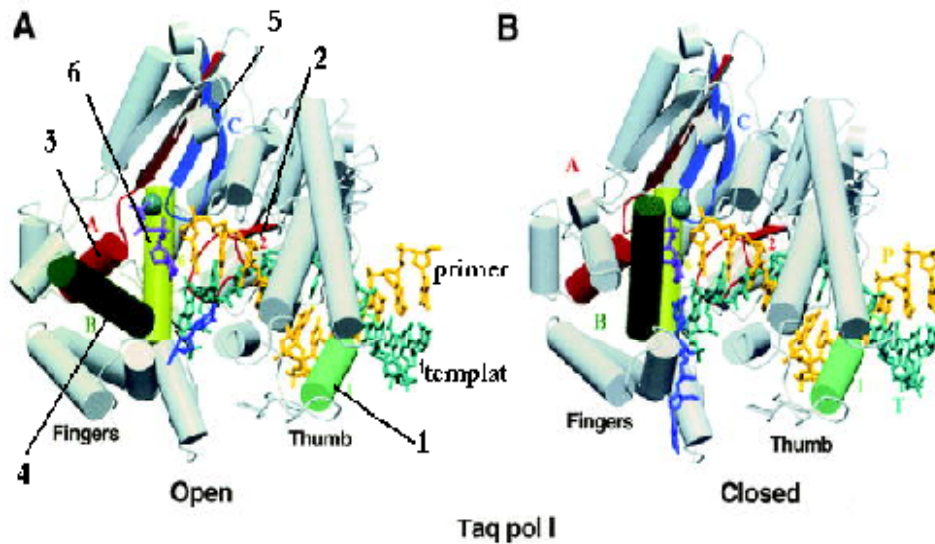
Dette subdomenet inneholder stort sett α -helikser (parallele eller antiparallele), og er festet til polymerasedomenet på en fleksibel måte. Denne fleksibiliteten kan være viktig for primer-templatets tilgang til bindingssetet. Ved mutageneseforsøk er det vist at tuppen av tommelen blant annet påvirker DNA-binding og prosessivitet (Minnick, D.T., *et al.* 1996).



Figur 1.2: Skjematiske representasjon av polymerase domenet til Klenow fragmentet, med α -heliksene vist som sylindere og β -platene som piler. Aminosyre sekvensnummerer gir et omtrentlig indikasjon på overgangene av de sekundære strukturelle egenskapene. Finger, tommel og håndflate domeneene danner en dyp kløft med det katalytiske setet i håndflaten i bunnen av kløften (Joyce og Steinz, 1995).

I tillegg til dette kan man ved sekvenssammenstilling av aminosyresekvensene til relaterte enzymer påvise konserverte regioner med felles katalytiske funksjoner. En sammenstilling av DNA polymerase I fra tre ulike organismer, *Taq*-, *Bst*- og *T7*-polymerase, viser 6 slike konserverte regioner. (Delarue *et al.*, 1990)

Alle disse konserverte regionene viser seg å ha betydelige roller i DNA syntese er vist i figur 1.3. Aminosyreresiduen i region 1 er lokalisert på tuppen av tommeldomenet, og danner en heliks-løkke som interagerer med minor groove på dsDNA i det DNA-bindende trinnet. Residuen i region 2 sitter inne i håndflate-domenet, og interagerer med templattråden langs minor groove. Region 3, 4 og 5 ligner de mest konserverte områdene, motiv A, B og C, i mammalske polymeraser, og danner deler av den nukleotid bindende kløften i DNA polymerasens aktive sete. Motiv A og C (region 3 og 5) er lokalisert i håndflate-domenet, mens motiv B er lokalisert i finger-domenet. Region 6 interagerer med den første templatbasen, og gjør at denne kan ”flippes” ut av heliks-aksen med 90°, slik at den ikke kan basepare med det innkommende nukleotidet.

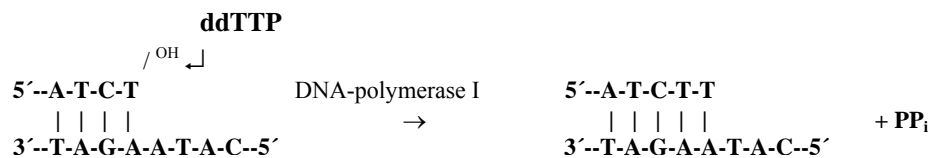


Figur 1.3: Figuren viser plasseringen til de seks konserverte områdene i *Taq* polymerase I, i åpen og lukket konformasjon. Region 1 (lys grønn) er lokalisert i tommel-domenet og interagerer med minor groove på DNA. Region 2 (oransje) er lokalisert i håndflate-domenet og holder templatet ved hjelp av interaksjoner nær minor groove. Region 3, også kalt motiv A (rød) interagerer med det innkommende divalent kation-dNTP komplekset. Region 4, eller motiv B (mørk grønn) interagerer også med det innkommende nukleotidet, men er lokalisert i finger-domenet og endrer konformasjon i det nukleotid-bindende trinnet slik at proteinet går over til en mer lukket form. Region 5/ motiv C (blå) sitter sammen med motiv A i håndflate-domenet. Disse to domenene inneholder de katalytisk essensielle karboksyl-holdige aminosyrene. Region 6 (grønn-gul) sitter i håndflate-domenet, og interagerer med templattråden nær stedet hvor basen ”flippes” ut. Primer- tråden er vist i gult og templattråden i turkis. (Patel *et al.*, 2001)

1.2.3. Funksjonene til DNA polymerase I.

1.2.3.1. Polymeraseaktiviteten.

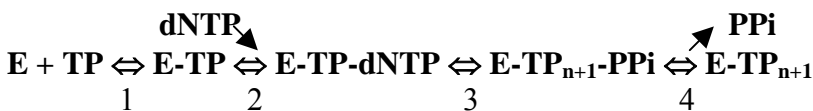
Alle polymeraser katalyserer den samme polymeriseringsreaksjonen hvor deoksynukleotider legges til i 3`-enden av en primertråd som vokser i 5`-3`-retning. DNA-templatet dirigerer seleksjon av nukleotider gjennom Watson/Crick-baesparing.



Figur 1.4: Polymeraseaktiviteten. Figuren viser inkorporering av deoksynukleotider i en voksende kjede av DNA. Den nye nukleotidet festes til den ledige 3`OH ved hjelp av DNA polymerase I og pyrofosfat spaltes av.

Under replikasjonen av DNA vil hver av de to DNA trådene i utgangs-DNA fungere som templat i syntesen av en ny DNA-tråd. Man sier derfor at replikasjonen er semikonservativ fordi de to nye dsDNA etter replikasjonen består av en nysyntetisert tråd og en gammel tråd. Syntesen av den nye DNA-tråden vil alltid starte ved et startpunkt hvor det dannes en løkke av "datter" DNA. I begge ender dannes det replikasjongsjaffel, hvor DNA tvinnes ut og replikeres ved hjelp av blant annet DNA polymerase. DNA templatet avleses alltid i 3`-5`retning, slik at syntesen av de nye trådene går i 5`-3`retning. Dette gjør at bare den ene nye tråden kan syntetiseres sammenhengende, og denne blir kalt "leading strand". Den andre DNA tråden syntetiseres som korte fragmenter, Okazaki-fragmenter. Denne kalles "lagging strand". DNA polymeraser må alltid ha en ledig 3`OH-gruppe hvor den kan feste det neste innkommende nukleotidet. Derfor er DNA polymerasene også avhengige av en primer. Med dette menes ett kort segment av en ny tråd som er festet til, og er komplementær til, templattråden. Denne primeren har en 3`OH-gruppe hvor DNA polymerasen kan feste til neste komplementære nukleotid. Denne primeren består av RNA og syntetiseres av RNA polymerase eller av et enzym som kalles primase. På "lagging strand" sitter det en primer på hvert Okazaki-fragment. I *E.coli* fjernes primerne av 5`-3`eksonukleasen i DNA polymerase I, som også erstatter RNA med DNA. Deretter blir fragmentene koblet sammen av DNA ligase. (Voet og Voet, 2004)

Etter studier av flere av medlemmene i familie A DNA polymeraser er det grunn til å anta at de benytter samme generelle mekanisme for addisjon av enkelt nukleotider:



Figur 1.5: Fremstilling av den generelle mekanismen for nukleotid inkorporering. E står for polymerasen, TP for templat-primer, dNTP for nukleotid og PPI for frigjort pyrofosfat.

Polymeriseringen av DNA kan deles opp i flere trinn:

1. Polymerasens binding til DNA.

Det første trinnet i polymeriseringen er polymerasens binding til templat-primer. Studier av ulike krystallstrukturer viser at tommel-domenet endrer konformasjon slik at det griper nesten fullstendig rundt DNA. Tommel-domenet roterer mot håndflate-domenet og de konserverte aminosyreresiduenene som finnes på tuppen av tommel-domenet (region 1) roterer i motsatt retning i forhold til resten av tommel-domenet, slik at tuppen er i

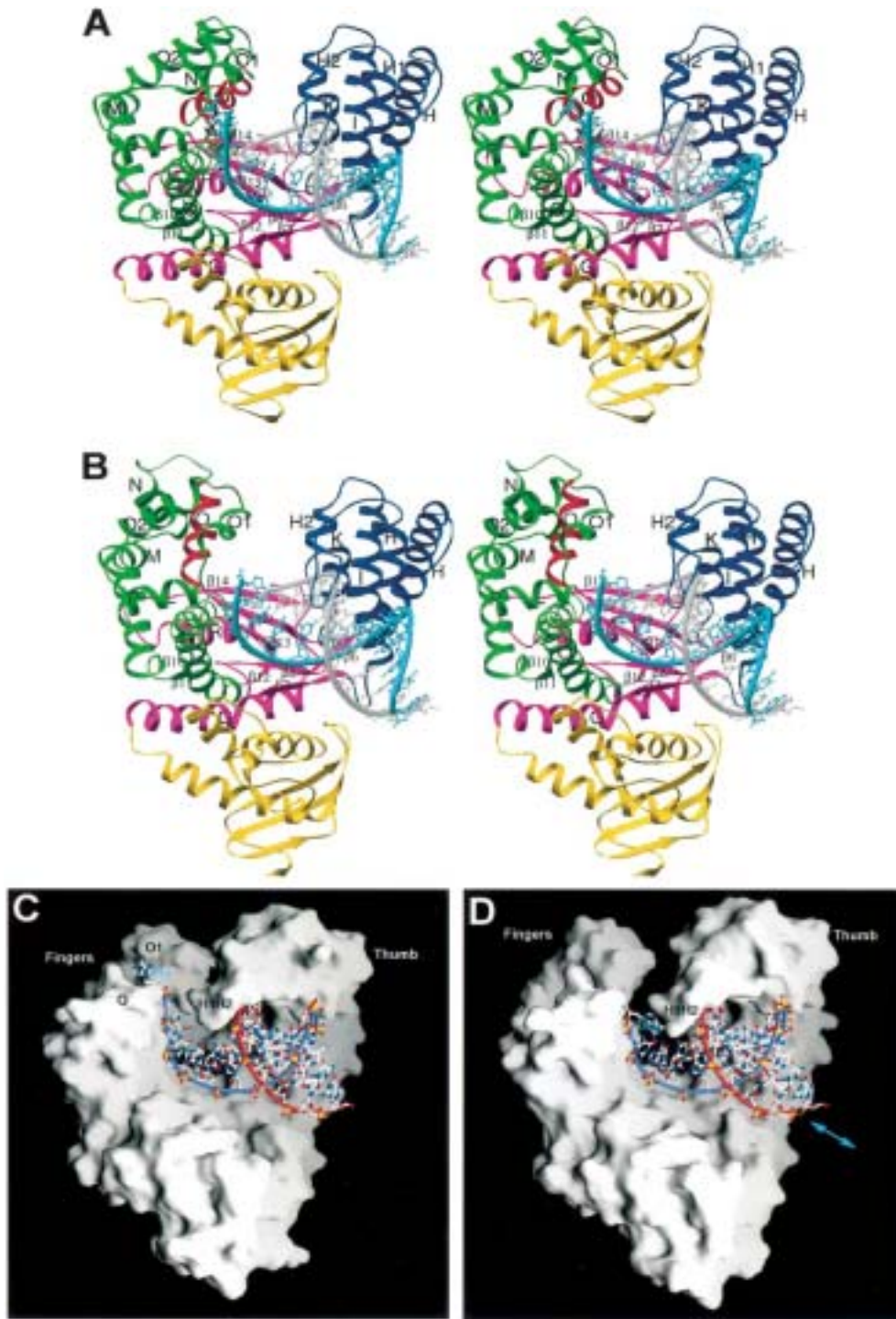
nærheten av DNA. Disse konformasjonsendringene resulterer i en 30 Å bred sylinder hvor de konserverte residuene ”griper” DNA langs minor groove. Interaksjonene er primært langs sukker-fosfat ryggraden på DNA og resulterer i at DNA får en S-formet konformasjon. Et andre sett med interaksjoner, hvor det enkelttrådigte templatet interagerer med håndflate-domenet (region 2) bidrar også til at DNA endrer konformasjon. Ett tredje sett med interaksjoner, resulterer i en 90° rotasjon av den første templatbasen, slik at templat-basene er ”flippet” på utsiden av DNA- heliks aksens og bort fra bindingssetet til det innkommende nukleotidet. Denne plassen okkuperes istedenfor av Tyr 671 (hos Taq), som danner hydrogenbindinger med det innkommende nukleotidet. Disse interaksjonene og konformasjonsendringene er observert i flere ulike polymeraser fra familie A, blant annet *Taq* pol I, *Bst* pol I, T7 pol og HIV-1 RT, og dette kan tyde på at dette er en mekanisme som også benyttes av de andre medlemmene i denne familien.

2. Binding av nukleotidet.

Når nukleotidet bindes til polymerasen skjer nok en konformasjonsendring. Dette er vist i krystallstrukturer av blant annet *Taq* Pol I bundet til DNA i nærvær av en innkommende nukleotid (Li *et al.*, 1998). I dette trinnet er det minst tre ulike trinn;

- Strukturelle elementer i finger-domenet roterer mot 3`enden på primer, slik at strukturen blir mer lukket, og omslutter det innkommende nukleotidet.
- Templat-basen roterer tilbake inn i heliks-aksen ($\geq 90^\circ$).
- Base-delen av det innkommende nukleotidet danner et Watson-Crick basepar med templatbasen, og trifosfat-delen danner metall-medierte ioniske interaksjoner med aminosyreresiduer i det aktive setet.

Disse konformasjonsendringene fører til at base- og riboseden av nukleotidet omslutes av en hydrofob lomme, som følge av interaksjon med Phe667, Tyr671, Ile614 og Glu615. (Tallene henspiller til *Taq* pol I), mens den negative trifosfatdelen interagerer med to basiske aminosyrer i motiv B og to sure aminosyrer i motiv A og C (figur 1.3) noe som bidrar til å stabilisere transisjonsstadiet. (Patel *et al.* 2001, Shinkai *et al.*, 2001). Dette følger en induced-fit modell for nukleotide-inkorporering, og bidrar også til økt spesifisitet for korrekte basepar. Dette fordi ett ukorrekt basepar ikke vil innta samme geometriske form som det korrekte baseparet. Dette vil igjen føre til at 3`OH-gruppen vil bli feilplassert og dermed hindre inkorporering av neste nukleotid. Dette er vist ved blant annet mutasjoner av residuer som deltar i interaksjonene i Klenow-fragmentet fra *E.coli*. Det ble da vist at mutasjoner i disse residuene fører til nedsatt fidelitet hos polymerasen (Kiefer *et al.*, 1998).



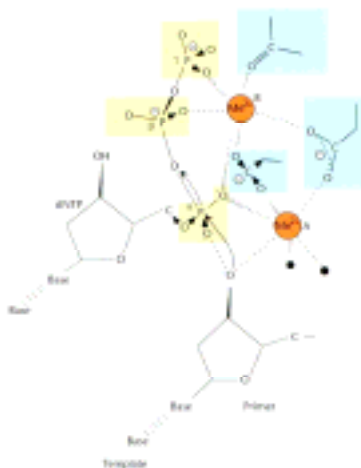
Figur 1.6: Bånd diagram (Carson, 1997), og overflate på den lukkede ternære og den åpne binære kompleksene i Klentaq1. **(A og C)** Det lukkede ternære komplekset. **(B og D)** Det åpne binære komplekset. I **(A)** og **(B)**, er N-terminalen, håndflate, finger og tommel domenenene indikert som bånd, og fargekodet i henholdsvis gult, rosa, grønn og mørk blå. O heliksen i fingerdomenene er vist i rødt. Ribosene og basene i primer (grått) og templat (skarp blå) trådene er vist ved "stick" presentasjon, med ribosefosfat ryggraden vist som bånd. Den innkomne ddCTP i **(A)** er vist i "stick" presentasjon og er svart. Gullsfærer i **A** indikerer metall ioner. I **(C)** er templat og primer trådenes ryggrad vist i henholdsvis blått og rødt. Heliksene O1 og Q, og H1H2 er indikert. Den blågrønne pilen i **D** viser den eneste mulige retningen for DNA bevegelse i det åpne binære komplekset.

3. Nukleofilt angrep.

Det katalytiske setet hos diverse DNA polymeraser består av tre sure aminosyrer med karboksylat-sidekjeder (Asp610, Asp785 og Glu786 hos *Taq*) Strukturere viser at to av karboksylat-sidekjedene binder to metallioner. (Sousa, 1996, Shinkai *et al.*, 2001) Rollen til den tredje aminosyren er uklart.

Begge metallionene er oktaedrisk koordinert og har seks ligander. Metallion A er koordinert av 3'OH, α -fosfatet, oksygenatomer på de to aspartat-sidekjedene og to vannmolekyler. Metallion B er koordinert av α -, β - og γ -fosfatet, karboksylat-sidekjeden på de to Asp-residuen og en karbonylgruppe fra en tyrosin som er naboresidu til den ene Asp-residuen (Tyr611 hos *Taq*). De to metallionene kan være Mg^{2+} , Mn^{2+} eller Zn^{2+} , men Mg^{2+} er mest vanlig.

Ved polymerisering reagerer metallion A (se figur 1.5) både α -fosfatet og med 3'OH på primertråden. Antakeligvis bidrar dette til å øke den elektropositive karakteren til fosfatet i tillegg til at det bidrar til deprotonering av 3'OH, slik at den igjen kan utføre et nukleofilt angrep på α -fosfatet på det innkommende nukleotidet.



Figur 1.7. “To-metallion”-mekanismen til polymerasereaksjonen. Figuren viser de to katalytiske metallionene (A og B) som er forankret i det aktive setet på polymerasen (Steitz, T.A., 1999).

4. Frigjøring av pyrofosfat og translokasjon.

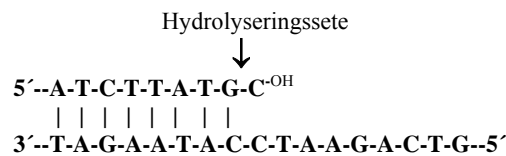
Etter at baseparringen er komplett og det nye nukleotidet er festet til den voksende kjeden av DNA, må pyrofosfatet, det vil si β - og γ -fosfatet frigjøres. Strukturstudier tyder på at etter at nukleotidet er inkorporert, inntar polymerasen en mer åpen konformasjon igjen, translokerer til neste templatposisjon og frigjør pyrofosfat før neste nukleotideinkorporering.

I studier av *E. coli* i åpen og lukket konformasjon kan det se ut som om PP_i er i kompleks med to konserverte residuer i O-heliksen, en Arg og en Lys. I lukket konformasjon er PP_i i tillegg i kompleks med to Asp-residuer i motiv A. Når polymerasen da går fra lukket til

åpen konformasjon kan de to residuene på O-heliksen (Lys og Arg) bidra til å fjerne PP_i fra det katalytiske setet. Deretter kan polymerasen translokere til neste templatposisjon. Polymerasen kan bevege seg relativt fritt bortover DNA, grunnet at interaksjonene mellom polymerasen og DNA er ikke-spesifikke interaksjoner mellom aminosyre-residuer og sukker-fosfat-ryggraden hos DNA.

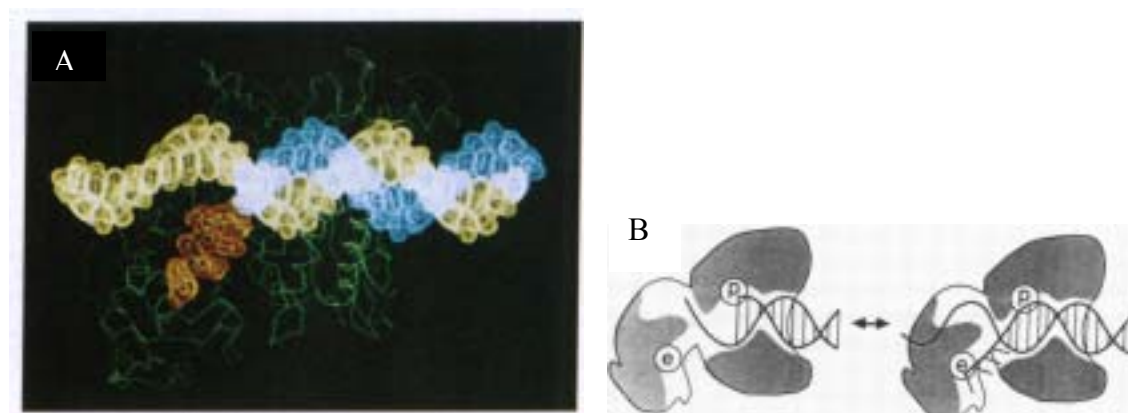
1.2.3.2. 3'-5'-eksonukleaseaktiviteten.

Denne aktiviteten er den korrekturlesende funksjonen og skjer i motsatt retning av DNA-syntesen. Hvis polymerasen setter inn en feil nukleotid vil denne ikke basepare med templatnukleotidet. Dette vil da detekteres av visse konserverte residuer i polymerase-domenet.



Figur 1.8: 3'-5'-eksonukleaseaktiviteten. 3'-5'-eksonukleasen i DNA polymerase I fjerner uparede nukleotider fra den voksende DNA-kjeden

Mekanismen for denne deteksjonen av galt parede nukleotider er ikke helt klar, men mye tyder på at noen av residuene i polymerasetet danner stabiliserende hydrogen-interaksjoner med korrekte basepar. Disse interaksjonene vil ikke kunne finne sted ved en mismatch fordi hydrogen-bindingsakkseptorene da ville være feil plassert i forhold til disse residuene. Andre residuer i polymerase-domenet fungerer ved å diskriminere mot binding av en feil baseparet primer ende til det aktive setet i polymerase-domenet. Etter at ett nukleotid har blitt feilinkorporert, vil hastigheten for fortsatt elongering synke.



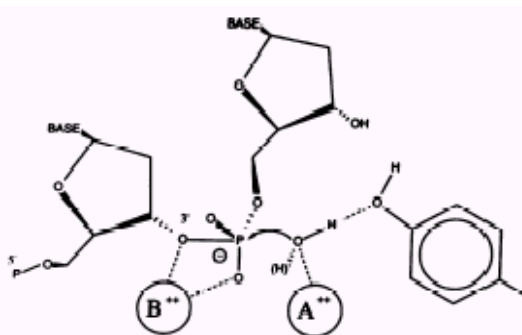
Figur 1.9: Modell av Klenow fragmentet og en modell av DNA med 3'-terminus av primertråden (blå og oransje) plassert i det aktive setet i eksonukleasen (A). DNA er vist ved en skjelettmodell og lagt over en Van der Waals "dot" overflate. Strukturen til de fire enkeltrådede nukleotidene i modellen er utledet eksperimentelt (oransje), mens de gjenværende DNA er modellbygd. Den 3' terminus på den modellbygde dsDNA er i nærheten av 5' terminus av ssDNA. Figur B viser en skjematisk tegning av Klenow fragmentet med DNA det aktive setet til polymerasen (venstre) og det aktive setet i eksonukleasen (høyre). Å gå over fra polymerasens aktive sete til eksonukleasens aktive sete, følger omtrent fire nukleotider av dsDNA 3'-terminus og fire nukleotider med ssDNA. (Freemont *et al.* 1988)

Det at hastigheten synker gjør at DNA-tråden kan bli forflyttet til eksonukleasetet, slik at det feilinkorporerte nukleotidet kan kuttes vekk før elongeringen fortsetter. (Kunkel *et al.*, 2000).



Figur 1.10. Figuren viser Klenow fragmentet til *E. coli* pol I (Klenow) i kompleks med DNA. Klenow består av et stort C-terminalt polymeriseringsdomene som polymeriserer og binder dsDNA, og et N-terminalt 3'-5'-eksonukleasedomene som korrekturleser og binder ssDNA. Strukturen til Klenow kan minne om en høyre hånd, der subdomenene har fått navn som "håndbak" (polymeriseringssetet), "fingre" (O-heliks) og "tommel" (I heliks) (Steitz, T.A. 1999)

Det som skjer er antakeligvis at de tre til fire siste baseparene blir smeltet slik at den enkelttrådig DNA-enden kan overføres til eksonuklease-setet. Her kuttes det feilinkorporerte nukleotidet vekk, mens dupleks-DNA fortsatt er bundet til den polymerase-bindende kløften i polymerase-domenet. (Freemont *et al.*, 1988) Overføring av primer enden fra polymerase-setet til eksonuklease-setet kan være et resultat av økt smeltekapasitet hos DNA med mismatch og/eller et resultat av at DNA med mismatch binder svakere til polymerase-setet. (Carver *et al.*, 1994).



Figur 1.11: Foreslått enzymatisk mekanisme for 3'-5' eksonuklease reaksjonen. Metallionene (Mg^{2+} , Mn^{2+} eller Zn^{2+} *in vitro*) er representert i A og B. Metallion B er foreslått å stabilisere den forbigående pentakovalente sorten og fjerningen av et 3' oksyanion, mens metallion A kan lette "dannelsen" av angrep av vann eller hydroksid ion. Metallionene ligger 4,3Å fra hverandre. (Freemont *et al.* 1988)

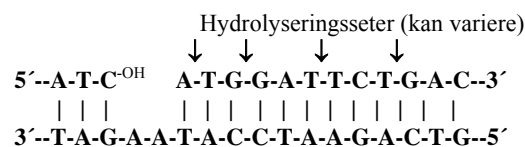
I likhet med polymerasen benytter også eksonukleasen en to-metallion-mekanisme i katalysen (figur 1.10). De to metallionene er bundet til konserverte sure residuer i det aktive setet. Det ene metall-ionet er bundet til karboksyl-gruppen til Asp355, Glu357 og Asp501, mens 5`fosfatet i dNMP er den fjerde liganden og et vannmolekyl er en femte ligand. Det andre metall-ionet er bundet til Asp355, to av 5`fosfat-gruppene og tre vannmolekyler som igjen er bundet til Asp424 (Tallene henspiller DNA polymerase I fra *E.coli*). De fleste residuene i det aktive setet i 3`-5`-eksonukleasen er meget konservert i andre prokaryote og eukaryote polymeraser, slik at det er sannsynlig at disse bruker samme mekanisme som DNA polymerase I fra *E.coli*.

Etter at de siste baseparene på DNA-enden er blitt smeltet, blir det dannet et kompleks mellom ssDNA og residuer i eksonukleasen. De tre siste nukleotidene på 3`enden på ssDNA passer inn i en hydrofob lomme som inneholder de to divalente kationene. Nukleotidene bindes til enzymet ved hjelp av hydrofobe interaksjoner og hydrogenbindinger som er uavhengig av basens identitet.

Ved hydrolyse av DNA vil antakeligvis metallion A bidra til dannelse av et nukleofilt hydroksidion, som angriper fosfatgruppen på nukleotidet slik at bindingen brytes og nukleotidet frigjøres. Metallion B bidrar muligens til stabilisering av et pentakovalent mellomprodukt og til frigjøring av 3`oxy-anionet. (Derbyshire *et al.*, 1991, Beese *et al.*, 1991, Freemont *et al.*, 1988).

1.2.3.3. 5`-3`-eksonukleaseaktiviteten.

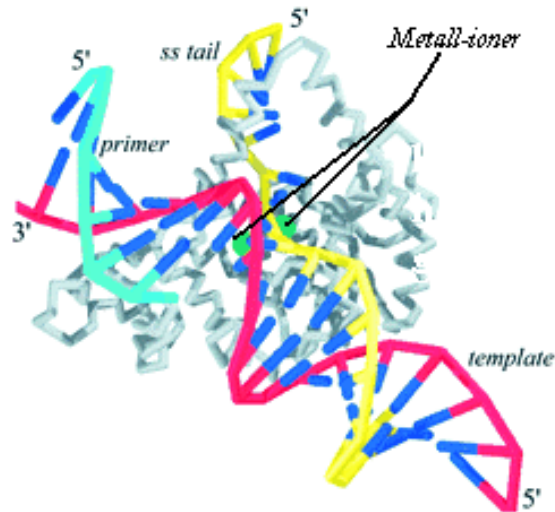
Det N-terminale proteolytiske fragmentet av *E.coli* DNA polymerase I, 5`-3`-eksonukleasedomenet danner en struktur uten omfattende interaksjoner med de to andre domenene fra Klenow-fragmentet. Domenet har en dyp kløft med det aktive setet som er lokalisert i bunnen av kløften og som ved eukaryot DNA replikasjon er ansvarlig for fjerning av RNA primerne i Okazaki-fragmentene i ”lagging strand”. Denne er kjent for å være en struktur-spesifikk nuklease, som kløyver en 5` forskjøvet tråd ved overgangen mellom enkeltrådige og dobbeltrådige regioner. Kløyving skjer da vanligvis mellom de to første parede basene ved overgangen. Studier viser også at foretrukket substrat for bakterielle 5` nukleaser har en enkel uparet base på 3` enden på primeren som sitter oppstrøms for kløyvingsstedet.



Figur 1.12: 5`-3`-eksonukleaseaktiviteten. Figuren viser mulige hydrolyseringssteder for 5`-3`-eksonukleaseaktiviteten som fjerner baseparede nukleotider i front av den voksende DNA-kjeden

5`-3`-eksonukleasen samarbeider med polymerasen om å reparere DNA i ”excision repair” og ved i fjerning av RNA-primerene fra Okazaki-fragmentene under syntese av ”lagging strand”. Dette samarbeidet ser ut til å foregå uten noen form for fysisk kontakt mellom 5`-3`-eksonuklease-domenet og polymerase-domenet.

En fri 5` ende er helt nødvendig for at nukleasen skal binde seg til DNA. Dette sørger for at nukleasen kun kutter i korrekte substrater dannet ved ”lagging strand” replikasjon, DNA-reparasjon eller rekombinasjon, og forhindrer kutting på feil substrater som for eksempel ved replikasjonsgaffelen.



Figur 1.13: Hypotetisk modell av T5 5`nuklease bundet til DNA med enkel 5`ende. De to grønne kulene representerer to divalente metallioner som er bundet til det aktive setet. (Xu *et al.*, 2001)

Når det gjelder mekanismen for kuttingen er denne noe uklar, men mye tyder på at også denne aktiviteten benytter seg av metall-ioner i katalysen. Ved en sammenstilling av sekvensene til flere 5`-3`-eksonukleaser fra ulike organismer, både prokaryote og eukaryote, fant man 6 konserverte regioner. Innen disse regionene fant man 14 aminosyrer som var identiske hos alle, deriblant 10 med karboksylgrupper som kan fungere som ligander for eventuell metall-ioner. Krystallstrukturer av T5 og *Taq* polymerase støtter denne teorien. Her kan man se at nukleasens aktive sete består av en gruppe med karboksylat-residuer som koordinerer metall-ligandene som er essensielle for den katalytiske aktiviteten. Antallet metall-ligander og de ulike karboksylat-residuenes rolle er ikke helt klart og kan muligens variere fra art til art, eller variere for nukleasen ettersom hva slags substrat den har. I alle tilfelle har noen av de konserverte residuene som funksjon å binde til DNA, mens andre binder til metallioner. Metallionene er involvert i å danne et hydroksylion som angriper fosfodiesterbindingen, og i stabilisering av ”leaving”-gruppen og den pentavalente transisjonstilstanden som dannes under reaksjonen. (Xu *et al.*, 1997, Amblar *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2001)

1.3. DNA polymeraser i genteknologi.

I tillegg til å være av fundamental betydning for cellen, er DNA polymeraser blitt viktige verktøy i genteknologi. Det er per i dag flere sentrale metoder innen molekylærbiologisk forskning, klinisk diagnostikk og rettsmedisinsk sammenheng som er avhengig av DNA polymeraser og da særlig de varmestabile DNA polymeraser. De blir benyttet i en rekke ulike teknikker, som for eksempel i PCR og i DNA sekvensering. Det er flere ulike

egenskaper hos DNA polymerasene som avgjør kvaliteten på resultatene, og utvikling av nye, mer optimale polymeraser for den enkelte teknikk er derfor meget viktig.

1.3.1. Anvendelser av DNA polymeraser i PCR.

PCR er en *in vitro* teknikk som benyttes for amplifisering av et spesifikt DNA fragment fra genomisk eller klonet DNA. En PCR reaksjon inneholder dobbeltrådig DNA, hvor hele eller deler av det ønskes amplifisert, oligonukleotider (primere) som hybridiserer til flankerende ender til DNA sekvensen på motsatte tråder, alle fire deoksynukleotider og en DNA polymerase. Reaksjonen er en tre trinns prosess bestående av;

1. Denaturering av dsDNA templat.
2. Hybridisering (annealing) av primere til templatet.
3. Forlenging (elongering) av primerne.

Disse tre trinnene gjentas i en serie sykluser der nysyntetisert DNA blir templat i neste syklus. Teoretisk vil dette gi en amplifisering som følger en eksponensiell kurve, med fordobling av antall templat-molekyler for hver polymeriseringssyklus. En kopi av mål-DNA er i prinsippet nok til å få amplifisering. Oppdagelsen av varmestabile DNA polymeraser, som for eksempel *Taq* DNA polymerase I, revolusjonerte denne teknikken (Saiki, R.K. *et al.* 1985), da bruken av varmestabile polymeraser fjernet behovet for å tilsette nytt enzym for hver syklus og muliggjorde amplifiseringen av DNA-templater med høyt smeltepunkt. De ønskede egenskaper hos polymerasen er:

Varmestabilitet:

Både i sekvensering og i PCR benyttes det høye temperaturer for å denaturere DNA som skal sekvenseres/amplifiseres. Det er da helt nødvendig at polymerasen som benyttes er varmestabil, det vil si at den tåler relativt høye temperaturer uten at den blir denaturert. Hvis man ikke benytter en varmestabil polymerase må man tilsette ny polymerase i hver syklus, da den vil bli ødelagt i denatureringstrinnet. Proteinene fra varmestabile bakterier stabiliseres tilsynelatende av flere faktorer. For det første har de ofte en sterkere hydrofob kjerne enn homologe, mesofile proteiner. Dette kan man se ved at de har et høyere innhold av hydrofobe residuer med forgrenete sidekjerder. For det andre har de ofte mindre løkker og andre sekundærstrukturer på overflaten, noe som gjør dem mer stabile. Og sist, men ikke minst, har disse proteinene ofte et høyt innhold av ladete residuer, på bekostning av nøytrale residuer. Dette fører til flere elektrostatiske interaksjoner inne i proteinet. Flere studier tyder på at saltbroer er den viktigste stabiliserende faktoren hos disse varmestabile proteinene. (Kumar *et al.*, 2001, Karshikoff *et al.*, 2001) Slike varmestabile polymeraser finner man hos bakterier som lever ved høye temperaturer, såkalte termofile bakterier. *Thermus thermophilus* er en slik bakterie.

Prosessivitet:

Prosessiviteten angir hvor mye av DNA-molekylet som blir syntetisert før polymerasen dissosieres fra templatet, og det skjer en kjedeterminering. Høy prosessivitet hos polymerasen vil gi en mer effektiv syntese av lange produkter. Nåværende studier har

avdekket to ulike mekanismer som bidrar til prosessivitet. Den ene finner man hos de fleste replikative polymeraser, replikaser, som for eksempel replikasen hos bakteriofag T4. Denne mekanismen involverer ett ringformet protein, ”DNA sliding clamp”, som omslutter DNA og binder samtidig til den katalytiske enheten på polymerasen slik at de to holdes sammen. En annen mekanisme har blitt oppdaget hos T7 replikasen. Denne polymerasen har vanligvis lav prosessivitet, og blir først prosessiv etter at den assosieres med et vertskodet protein,; thioredoxin. Dette proteinet binder til polymerasen i en tommel-regionen, hvor T7 har 71 ekstra aminosyrer mellom heliks H og H1, og danner sannsynligvis en klemme rundt DNA. Det er vist at flere polymeraser, blant annet T3 polymerase, også inneholder slike regioner som kan binde thioredoxin. Det er også vist at flere eukaryote polymeraser assosierer med mindre proteiner for å bli prosessive enzymer (Kelman *et al.*, 1998).

Fidelitet og korrekturlesing i PCR:

Når man amplifiserer DNA er det en fordel at produktet ikke inneholder mutasjoner. Fidelitet angir polymerasens evne til å skille mellom korrekt og ikke korrekt substrat, det vil si, evnen til å inkorporere rett nukleotid i forhold til templatet. Skulle polymerasen inkorporere feil nukleotid, er det viktig at polymerasen har 3`-5`eksonukleaseaktivitet, eller korrekturlesingsaktivitet. Denne aktiviteten sørger for at den gale nukleotidet kuttet vekk, slik at den korrekte kan settes inn.

1.3.2. Anvendelse av DNA polymeraser i sekvensering.

Sekvensering av DNA er en *in vitro* teknikk for å bestemme den genetiske informasjonen i en DNA prøve. Metodene som benyttes i dag har sitt utspring i Sangers dideoksykjedetermineringsmetoden. I denne metoden benyttes en DNA polymerase til å lage komplementære kopier til enkeltrådig DNA og terminering skjer ved inkorporering av dideoksynukleotider (ddNTP) (Sanger, F. *et al.* 1977). Dideoksynukleotidene fører til kjedeterminering når de inkorporeres fordi de mangler 3`OH gruppen som benyttes i fosfodiesterbindingen. En tilfeldig kjedeterminering finner sted når ddNTP inkorporeres i den voksende DNA tråden i stedet for deoksynukleotider (dNTP). Detektering av de terminerte produktene gjøres ved radioaktiv eller fluorescens merking.

De ønskelige egenskapene hos DNA polymeraser ved sekvensering er:

Også i sekvensering er varmestabilitet og høy prosessivitet viktig. I tillegg er det viktig med evne til å akseptere nukleotidanaloger og med lav eksonukleaseaktivitet.

Evne til å akseptere nukleotidanaloger:

I sekvensering er det som sagt tidligere viktig at polymerasen ikke diskriminerer for mye med hensyn på nukleotidanaloger, som for eksempel dideoksynukleotider som benyttes i Sanger-sekvensering. En del polymeraser har liten evne til å inkorporere slike modifiserte nukleotider, noe som fører til at man må bruke høye ddNTP-konsentrasjoner i forhold til dNTP. Dette kan føre til at man får sekvensdata som er vanskelige å tolke.

Lav eksonukleaseaktivitet:

Hos polymeraser som benyttes i sekvensering kan eksonukleaseaktiviteten hos enzymet virke ødeleggende når man benytter kjedetermineringsmetoden. 5'-3' eksonukleasen er et problem fordi den kan fjerne nukleotider fra 5'enden av den terminerte tråden. Hvis tråden er merket i 5'enden, skaper dette et problem fordi merkingen da vil forsvinne. 3'-5' eksonukleasen er et mindre problem, men kan virke forstyrrende hvis den fjerner innsatte nukleotidanaloger og dermed hindre kjedeterminering.

1.3.3. Forbedringer av polymeraser ved *in vitro*-mutagenese.

Flere DNA polymeraser fra familie A har blitt modifisert ved *in vitro*-mutagenese for å bli bedre egnet for genteknologiske metoder. Et eksempel er fjerning av det N-terminale området på DNA polymerase I fra *E.coli*. I dette området sitter 5'-3' eksonukleasen. Denne polymerasen uten det N-terminale området kalles Klenow fragmentet. Et annet eksempel er modifisering av *Taq* polymerase for å gjøre den til et bedre sekvenserings-enzym. En punktmutasjon hvor fenylalanin byttes ut med tyrosin i posisjon 667 (F667Y) fører til at enzymet får økt evne til å akseptere dideoksynukleotider og andre nukleotidanaloger (Tabor & Richardson, 1995).

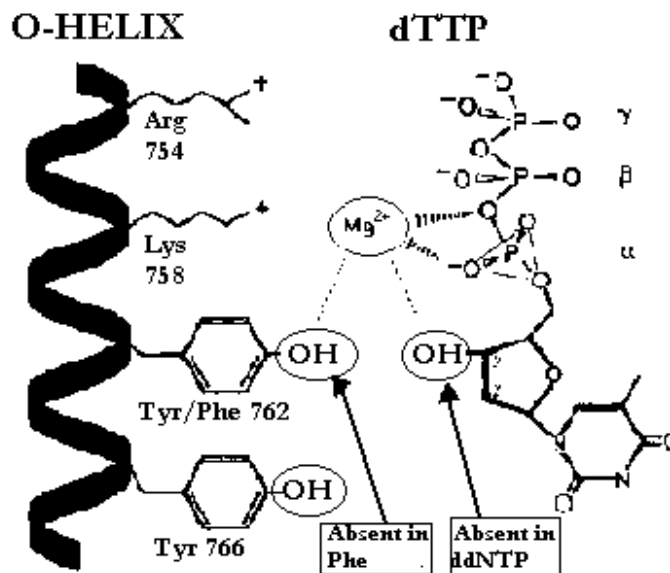
Punktmutasjonen R660D, hvor arginin er byttet ut med asparginsyre (Li, Y. *et al.* 1999) jevner ut inkorporeringshastigheten av alle de fire dideoksynukleotidene slik at resultatet av sekvenseringer blir mer pålitelig. En annen vanlig modifisering hos sekvenserings-enzym er å redusere eller fjerne 3'-5' eksonukleaseaktiviteten.

1.3.3.4. Diskriminering mot dideoksynukleotider.

Flere DNA polymeraser blir benyttet i sekvensering. I nukleotidsekvensering benytter man gjerne Sangers metode. Denne metoden baserer seg på inkorporering av dideoksynukleotider, etterfulgt av kjedeterminering. Metoden er nærmere beskrevet under kap. 2.3.

Forskjellen på en deoksynukleotid (dNTP), som er polymerasens normale substrat, og en dideoksynukleotid (ddNTP), er at mens dNTP mangler 2'OH-gruppen, mangler ddNTP OH-gruppen på både 2' karbonet og 3' karbonet i ribose-ringen. Ved inkorporering av en ddNTP vil elongeringen stoppe opp fordi 3'OH er nødvendig for å danne en fosfodiesterbinding med neste nukleotid. *E.coli* polymerase I inkorporerer likevel det naturlige substratet dNTP med flere tusen ganger høyere effektivitet enn hva det gjør med ddNTP, mens T7 DNA polymerase derimot ikke diskriminerer mellom dNTP og ddNTP i samme grad. Sekvensstudier viser at polymerase I fra *E.coli*, *Taq*, *Tth* og *Bst* alle har fenylalanin (F) i posisjonen som tilsvarer Phe762 i *E.coli*, mens T7 DNA polymerase I har en tyrosin (Y). Ved å bytte ut tyrosinresiduet med en fenylalanin i T7 DNA polymerase, fikk man 2000 ganger større diskriminering mot ddNTP. Likeledes gav mutasjonen F762Y i *E.coli* en tilsvarende reduksjon i diskrimineringen mot ddNTP. (Tabor, R. *et al.*, 1995, Astatke, M. *et al.*, 1998). Denne mutasjonen er også utført på *Taq* polymerase, med samme resultat. Når krystallstrukturen av komplekset mellom *E.coli* DNA polymerase I og dCTP ble studert, viste det seg at dette residuet (Phe 762), som er

lokalisert på O-heliksens, er det residuet som sitter nærmest 3'OH på det innkommende dCTP. Dette tyder på at mekanismen bak diskrimineringen er at det er nødvendig med en OH-gruppe som kan være med på å stabilisere bindingen til metall-ionet som deltar i den katalytiske reaksjonen. Denne OH-gruppen kan komme fra det innkommende nukleotidet, eller fra et residu på polymerasen. Fenylalanin som sitter på denne posisjonen har ingen OH-gruppe som kan delta i denne reaksjonen. Hvis det innkommende nukleotidet er en ddNTP mangler også denne en 3'OH som kan delta i reaksjonen. Dette fører til at dNTP, som har denne 3'OH-gruppen foretrekkes fremfor ddNTP hos polymeraser som mangler en OH-gruppe i denne posisjonen. T7 polymerase som ikke diskriminerer mot ddNTP har en tyrosin i tilsvarende posisjon, og har dermed alltid en OH-gruppe som kan bidra i reaksjonen. Se figur 1.14.



Figur 1.14: Tabor-Richardson mutasjon. Modell som viser en mulig mekanisme for diskriminering mot ddNTP. Til venstre ser man O-heliksens til *E.coli* pol I og til høyre ser man dTTP.

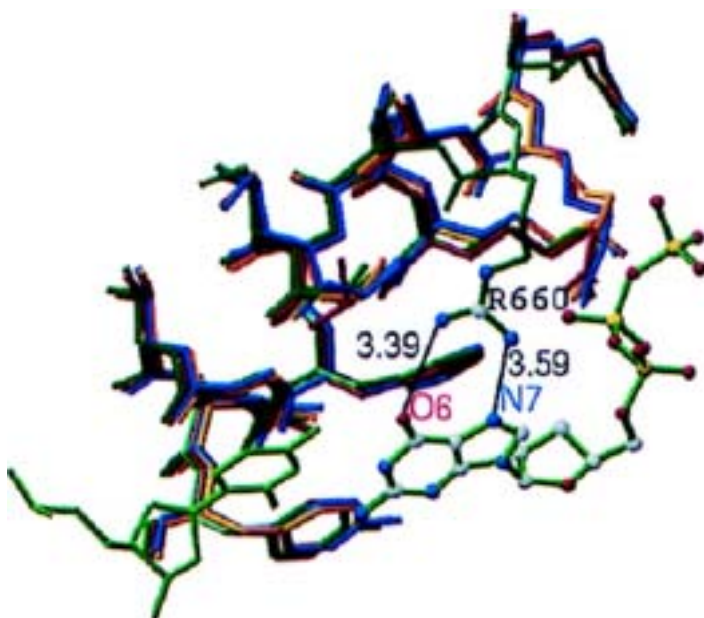
Taq DNA polymerase inkorporerer hver enkelt av de fire ddNTPene med meget forskjellig hastighet under sekvensering. Dette problemet ble løst ved innføringen mutasjonen F667Y.

Inkorporeringen av for eksempel ddGTP er 10 ganger raskere enn de tre andre ddNTPene. Den ddGTP-bundne kompleksstrukturen er forskjellig fra de tre andre trenære kompleksstrukturene ved at sidekjedene til residu Arg660 i O-heliksens endres, noe som igjen resulterer i at flere hydrogenbånd dannes mellom guanidinium-gruppen fra denne residuen og basen i ddGTP. Når Arg660 muteres til Asp (R660D) får enzymet en merkbar og selektiv reduksjon i farten på inkorporeringen av ddGTP. Sekvenserings mønstrene fra dette enzymet gir en bemerkelsesverdig jevn båndfordeling og intensitet, og resulterer i en signifikant forbedring i nøyaktigheten i DNA sekvenseringen.

Alle sekvenserings protokollene som eksisterer i dag er avhengig av inkorporeringen av ddNTP som terminerer kjedereaksjonen og genererer sekvensstiger. Mutasjon i posisjon

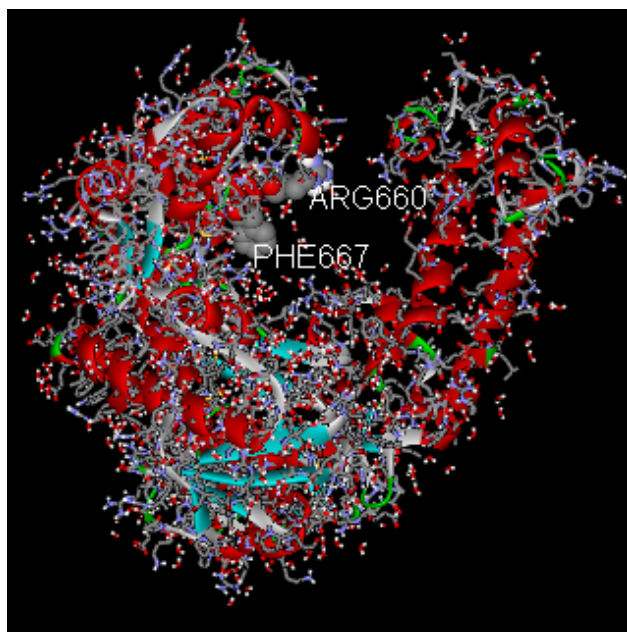
660 hos *Taq* DNA polymerase viser en inkorporeringshastighet av ddGTP som tilsvarer de som er for ddATP, ddTTP og ddCTP (Li, Y. *et al.* 1999).

Tanken bak designet for denne mutasjonen, med forbedret egenskaper av ddNTP inkorporering, er gitt ved sammensetningen av krystallstrukturene til de fire ternære lukkede komponentene av det store fragmentet til *Taq* DNA polymerase som er bundet til primer/templat DNA og et ddNTP. Det er signifikante forskjeller i konformasjonen i to sidekjedene til det ddGTP bundne kompleks i forhold til de tre andre kompleksene. Det er ikke observert at sidekjedene til Arg660 interagerer med ddNTP i ddATP-, ddTTP- og ddCTP-bundne kompleks, men denne sidekjeden interagerer med basen i ddGTP i det ddGTP-bundne kompleks. Konformasjonsendringen som oppstår i sidekjeden til Arg660 i det ddGTP-bundne kompleks forårsaker dannelse av hydrogenbindingsinteraksjoner mellom enden av dets guanidinium-gruppe og O₆ og N₇ atomene til G-basen i ddGTP (figur 1.15).



Figur 1.15: Stereo diagram av interaksjonene mellom sidekjeden til Arg660 i *Taq* DNA polymerase I og den innkomne basen. I proteinet, er kun O heliksen representert og er farget rød, lysebrun, mørk blå og mørk grønn for ddCTP-, ddATP-, ddTTP-, og ddGTP-fangede kompleks, respektivt. H-bånd interaksjoner mellom Arg-660 og O₆ og N₇ atomene på basis av ddGTP er indikert ved linjer. Avstandene mellom atomene involvert er indikert.

Enzymet som vanligvis benyttes for sekvensering i dag er F667Y-mutert *Taq* DNA polymerase, men dette enzymet gir ujevne båndintensiteter, hvor ddGTP har sterkeste intensiteter. Dette medfører at ddGTP overskuddet tømmes raskere enn de tre andre ddNTPene. Dette problemet kan løses ved å innføre en mutasjon i posisjon 660 (R660D) i tillegg til F667Y. Mange bånd som blir svake med *Taq* F667Y er tydelige når *Taq* R660D-F667Y benyttes. Polymerase med mutasjon i posisjon 660 vil med andre ord hjelpe til med å begrense feiltolkninger, og redusere kravene for overskudd, hvilket igjen reduserer kostnader og arbeid (Li, Y. *et al.* 1999).



Figur 1.16: Klenow fragmentet til *Taq* DNA polymerase. De to aminosyrene Phe667 og Arg660, er uthevet med større kuler. Det er disse to tilvarende aminosyrene i *Tth* som er byttet ut med henholdsvis tyrosin og asparginsyre i denne oppgaven (Modifisert bilde fra Protein Data Bank, 1KTQ).

1.4. DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus*.

I denne oppgaven ble det jobbet med DNA polymerase I fra bakterien *Thermus thermophilus*, også kalt *Tth* polymerase (beskrevet i 1.1). *Thermus thermophilus* HB-8 er en termofil eubakterie, som er isolert fra en varmekilde ved Mine, Shizuoka Prefecture, Japan. Bakterien er en Gram-negativ ikke-sporulerende aerob organisme som inneholder gule pigmenter. Den optimale temperaturen for vekst er mellom 65°C og 72°C, med et maksimum ved 85°C og et minimum ved 45°C.

1.4.1. DNA polymerase fra *Thermus thermophilus* HB-8.

Flere enzymatiske aktiviteter er isolert fra *Thermus thermophilus* HB-8 organismen. Tre isoenzymer, A, B og C, ble isolert av Rüttimann, C *et al.* (1985) hvor den relative molekylmassen ble bestemt ved glyserol gradientsentrifugering og ligger mellom 110 og 120 kDa. Disse Enzymene manglet både 3'-5' eksonukleaseaktivitet og 5'-3' nukleaseaktivitet. Tilsatt Mg^{2+} som kofaktor hadde enzym A et temperatur optimum på 50°C, mens enzymene B og C hadde optimum ved 63°C. Et annet termostabilt enzym med molekylær masse på 63 kDa ble isolert av Carballeira *et al.* (1990). Dette enzymet kunne brukes i PCR, det manglet 5'-3' nukleaseaktivitet og kunne forlenge DNA-kjeden med 25 nukleotider pr sekund. Et rekombinant *pol A* gen fra *Thermus thermophilus* ble klonet (Myers *et al.* 1991), som viste seg å kode for et protein med 834 aminosyrer og en dedusert molekylmasse på 94 kDa hvor hele 87% av aminosyrene har likhet med *Taq* DNA polymerase I. Genproduktet har en assosiert 5'-3' nukleaseaktivitet . men ingen 3'-5' eksonukleaseaktivitet (Myers, T.W. *et al.* 1991, Lawyer, F.C. *et al.* 1989, Lawyer, F.C. *et al.* 1993). Rønneberg (1999) klonet *pol A* genet fra den samme HB-8 stammen

som ble benyttet av Carballeira *et al.* PCR-produktet av genet ble klonet og Tabor-Richardson mutasjon (F669Y), innført. Karakterisering av villtypeenzymet og den muterte varianten viser at begge enzymene har temperatur optimum ved 80°C med Mg²⁺ som kofaktor, og den muterte varianten ble vist å være et alternativ til *Taq*FS enzymet i sekvenserings sammenheng.

Mesofile virale revers-transkriptaser (RT), slik som Aviann myeloblastosis virus (AMV-RT), har tradisjonelt blitt brukt for cDNA-syntese og produksjon av cDNA-bibliotek. Et problem med slike virale revers-transkriptaser er deres manglende evne til å produsere cDNA gjennom RNA sekundærstruktur og behovet for et termostabilt enzym ble tidelig kjent (Chien *et al.* 1976). Håpet var at slike termostabile enzymer ville kunne beskyttes ved temperaturer som gav økt primerspesifisitet og destabilisering av sekundærstruktur i RNA templatet.

Tth pol I har vist seg å være en svært effektiv revers-transkriptase dersom Mg²⁺ erstattes med Mn²⁺ i reaksjonen (Meyers *et al.* 1991) og det vil derfor være interessant å teste hvordan R662D mutasjonen vil spille inn på polymerasen. Det ble observert at *Tth* polymerase I var 100 ganger mer effektiv enn *Taq*-analogen og tillot deteksjon av etidiumfargede produkter med så få som 100 kopier av syntetisk cDNA. Det har også blitt rapportert at r*Tth* utviser høyere revers-transkriptase aktivitet i fast fase cDNA syntese enn mesofile revers-transkriptaser, som AMV-RT, (Røsok, Ø, *et al.* 1996).

1.5. Målet med oppgaven

Modifisert DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus* med modifisert diskriminering mot fluorescensmerkede nukleotider.

Delprosjekt 1: Innføring av mutasjonen R662D i F669Y *Tth* polymerase I.

Delprosjekt 2: Ekspresjon og rensing av forskjellige *Tth* varianter.

Delprosjekt 3: Måling av polymeraseaktivitet og sekvensering med de forskjellige *Tth* DNA polymerase variantene

Delprosjekt 4: Måling av revers transkriptase aktivitet hos ulike revers transkriptaser.

Delprosjekt 5: Måling av diskriminering mot fluorescensmerkede nukleotidanaloger.

2. METODER.

Dette kapitlet tar for seg de metodene og teknikkene som ble benyttet i det praktiske arbeidet med denne hovedoppgaven. Hvis ikke annet er oppgitt er metodene hentet fra "Molecular cloning A laboratory manual", 3.utgave (Sambrook, J., et al 2001). Reagenser, utstyr og løsninger som er benyttet blir beskrevet under materialer, kapittel 5.

2.1. Arbeid med mikroorganismer.

Kontaminering av prøver, enten med fremmede bakterier, enzymer eller DNA, kan føre til store vanskeligheter for det videre arbeidet og koste mye tid og ressurser. Man kan med enkle midler redusere denne faren med at man jobber med sterile løsninger og preparater. Det er viktig at arbeidet utføres så sterilt som mulig.

2.1.1. Sterilteknikk.

I arbeidet med mikroorganismer ble det benyttet vanlig, grunnleggende sterilteknikk. Pipettespisser, eppendorfrør og erlenmeyerkolber som ble benyttet ble autoklavert ved 120°C i 20 minutter. De aller fleste løsningene som ble benyttet ble enten autoklavert eller sterilfiltrert gjennom et 0.45µm membranfilter. Glasstaver og podenåler ble sterilisert i 96% etanol og brent av på gassbrenner. Arbeidet ble utført på arbeidsbenk i nærheten av gassbrenner og det ble hele tiden benyttet latexhansker.

2.1.2. Dyrking av *Escherichia coli*-bakterier.

Ved dyrking av *E.coli*-bakterier er det viktig å vite hva slags stamme man har slik at dyrkingen foregår i rett vekstmedium. Det er viktig å vite hva slags tilsetninger som er nødvendig for å sikre vekst av eventuelle plasmider, for eksempel antibiotika. Kulturer med *E.coli*-bakterier dyrkes vanligvis over natt, ca. 16 timer, ved 37°C. Hvis man dyrker opp i væskemedium og ikke på vekstskåler, er det også viktig at kulturen dyrkes opp i beholdere som er ca. ti ganger større enn volumet til kulturen ved kraftig rysting. Dette for å sikre at bakteriene har tilgang på oksygen slik at de ikke dør.

2.1.2.1. Tillaging av vekstskåler.

Vekstskåler brukes til å dyrke opp bakterier som for eksempel er transformert med et plasmid. Når man dyrker opp på skåler vokser bakteriene opp i adskilte kolonier. Man er da sikker på at en koloni kun inneholder en type bakterie. Seleksjon på vekstskåler skjer ved å tilsette ulike typer næringsmidler eller antibiotika.

Prosedyre:

- Tilsett agar til ønsket vekstmedium og autoklaver. Sjekk at all agar er smeltet etter autoklaveringen.
- La vekstmediet avkjøle seg til under 50°C. Tilsett deretter ønsket antibiotika og bland godt. Det er viktig at vekstmediet ikke har en temperatur på over 50°C, da dette kan ødelegge en del antibiotika.

- Overfør vekstmediet til plastskåler på en steril laboratoriebank eller avtrekk. Hell ca. 25 ml i hver skål og unngå å bobler i på overflaten av skålene.
- La skålene tørke et par timer. Snu skålene opp ned og legg dem i en forseglet plastpose. Skålene kan da lagres ved 4°C i flere uker. Det kan være lurt å innkubere et par av skålene over natt ved 37°C for å kontrollere at de ikke er forurenset.

2.1.2.2. Oppdyrking av bakterier på vekstskåler.

Krav til dyrkingsmedium og tilsetninger som er nødvendig for å opprettholde stabilitet og vedlikehold av eventuelle plasmider og tilfredstillende cellevekst, varierer med hvilken bakteriestamme man arbeider med.

Prosedyre:

- Ønsket mengde med bakterieløsning (50 ng<) tilsettes på skålen.
- En bøyd glasstav dyppes i etanol og brennes av over gassbrenneren og brukes til å stryke bakterieløsningen utover skålen.
- Lokket settes på og skålene innkuberes over natt ved 37°C. Det er da viktig at skålene står opp ned for å hindre at kondens drypper ned på vekstmediet.

2.1.2.3. Oppbevaring av bakterieceller som frysekultur.

Hvis bakterieceller skal oppbevares over lang tid, bør de fryses ned ved -70°C i 15% glyserol.

Prosedyre:

- Dyrk en 5 ml kultur av bakteriene du ønsker å fryse ned over natt.
- Overfør 850 µl av kulturen til et sterilt eppendorfrør. Tilsett 150 µl steril 100% glyserol og bland godt.
- Frys røret raskt ned i et etanol/tørris-bad og plasser røret raskt over i fryser som holder -70°C.

2.1.2.4. Oppdyrking av *E.coli*-bakterier fra frysekultur.

Bakterier fra frysekultur kan ofte vokse dårlig hvis de strykes rett ut på vekstskåler. En måte å unngå dette problemet på kan være å dyrke opp en liten bakteriekultur som så fortynnes og før de strykes ut på vekstskåler.

Prosedyre:

- Rør med frysekultur tas ut av -70°C -fryseren og tines forsiktig på is. Overfør deretter litt av frysekulturen til 5 ml LB-medium med ønsket antibiotika. Sett til dyrking ved 37°C i en rysteinkubator.

- Bakteriekulturen fortynnes 10^{-4} , 10^{-6} og 10^{-8} ganger, og 100 μ l av fortynningene plates ut på hver sin vekstskål, og innkuberes over natt ved 37°C.
- Plukk en koloni og overfør den til vekstmedium. Dyrk så kulturen ved 37°C i en rysteinkubator til ønsket celletetthet (ca. 16 timer).

2.1.3. Dyrking av bakteriofag M13.

Bakteriofag M13 inneholder et enkeltrådet DNA-molekyl som i denne oppgaven ble brukt til templat i en fluorescensbasert polymeraseaktivitetsanalyse. For å kunne dyrke bakteriofag M13 må vertsbakterien inneholde en F⁺-faktor (sex-pilus). Det er infeksjonsprosessen som er avhengig av pilustråder. Det spesielle med bakteriofag M13 er at vertscellene ikke lyses når det blir frigitt nysyntetiserte fagpartikler gjennom celleveggen. Det er to måter å dyrke opp M13-fagpartikler på, enten ved å transformere kompetente *E. coli* celler med den dobbeltrådede replikative formen (RF) av M13, eller å infisere celler med intakte M13 fagpartikler. Når bakteriekulturen er infisert skal den dyrkes opp til så høy celletetthet som mulig uten at den går inn i stasjonær fase der bakterielt DNA og RNA fra døde celler kan komme ut i kulturen.

Prosedyre:

- Dyrk opp frysekulturbakterieceller med F⁺-faktor (i dette tilfelle *E. coli* JM103 celler) i 5 ml 2x YT-medium ved 37°C og med risting. Denne dyrkingen tar ca. 7 timer.
- Transformer 0.2 μ g M13-mp18 DNA inn i 100 μ l superkompetente *E. coli* DH5 α -celler, og overfør det til 1 ml 2x YT-medium. La det stå å riste i ca. 3 timer ved 37 °C.
- Bland 5 ml med *E. coli* JM103 celler med 1 ml *E. coli* DH5 α -celler, og overfør det hele til en erlenmeyerkolbe med 400 ml 2x YT-medium. La det stå å riste kraftig ved 37°C i 10-12 timer. Unngå å få bakteriekulturen i stasjonær fase.

Videre isolering og rensing av enkeltrådet M13 blir beskrevet i metoder kap. 2.2.2

2.1.4. Håndtering av avfall fra bakteriekulturer.

Bakterier i bakteriekulturer og vekstskåler inneholder ofte gener for antibiotikaresistens. Det er derfor viktig at slike kulturer og skåler destrueres før de kastes, slik at disse genene ikke kan bli overført til den naturlige bakteriefloraen. For å destruere bakteriene tilsetter man overskudd av natriumhydroksid til bakteriekulturen og lar den stå i ca. en time før man heller den ut. Små mengder med avfall kan kastes i spesialavfallsbeholdere som senere blir sendt til forbrenning.

2.2. Arbeid med DNA.

Det finnes mange metoder for å karakterisere, endre og gjøre bruk av gener og DNA. Arbeid som kloning, forskjellige typer DNA-preparering og analyse av DNA ved hjelp av plasmider er noen av metodene som kan benyttes. For å kunne arbeide med DNA-molekyler i laboratoriet, må man ha et stort antall kopier av hvert molekyl, og kloning av DNA kan benyttes. Det kan

gjøres på to måter: enten ved å la bakterier gjøre jobben for oss, eller ved å kopiere DNA ved hjelp av DNA polymerase i et reagensrør ved den såkalte polymerase-kjedereaksjonen (PCR).

2.2.1. Plasmidisolering.

Det finnes flere ulike måter å isolere plasmid på. Felles for de fleste er at de har tre trinn, dyrking av bakteriekultur, høsting og lysering av bakteriekultur og til slutt, rensing av plasmid-DNA fra lysatet. Variasjonene mellom de tre ulike metodene er i hovedsak begrenset til de to siste trinnene. Det finnes en rekke kommersielle kit tilgjengelig for rensing av plasmid-DNA og i denne oppgaven ble GFX™ Micro Plasmid Prep Kit fra Amersham Pharmacia Biotech Inc benyttet. I tillegg ble kvikk-sjekk metoden benyttet.

2.2.1.1. Kvikk-sjekk metoden.

Kvikk-sjekk metoden kan brukes der det er ønskelig å finne ut om en bakteriekultur inneholder plasmid, og eventuelt størrelsen på plasmidet. Denne metoden går ut på å felle ut proteinene i cellene ved hjelp av fenol:kloroform, og sette DNA som finnes i vannfasen på en agarosegel. Metoden er veldig gunstig hvis man skal sjekke mange bakteriekulturer for plasmid samtidig. Man slipper da å rense plasmid før man vet at kulturen virkelig inneholder plasmid. Baktericellene ødelegges ved behandling med fenol og kloroform slik at proteiner felles ut mens nukleinsyrer blir værende i vannfasen.

Prosedyre:

- For kolonier: kolonier plukkes med en tannpirker og resuspenderes i 30 µl av en 10:1 blanding av TE-buffer og loadingbuffer. For overnatte-kulturer: 27 µl av overnatte-kulturen blandes med 3 µl loadingbuffer.
- Tilsett 25 µl fenol:kloroform og vortex i 30 sekunder. Sentrifuger i 3 minutter og sett 15 µl av den øvre vannfasen på en 0.8% agarosegel.
- Agarosegelen kjøres på 100 V i ca. 1 time. Deretter tas det ett bilde av gelen i UV-lys. Metoden er nærmere beskrevet i punkt 2.2.3.

De sterkeste båndene på gelen er ribosomalt RNA. Plasmider vil danne svakere bånd over disse. Disse kan så sammenlignes med molekylvektsstandarder og eventuelt referanseplasmider på gelen.

2.2.1.2. Plasmidrensing med GFX™ Micro Plasmid Prep Kit.

I denne oppgaven ble det benyttet GFX™ Micro Plasmid Prep Kit fra Amersham Pharmacia Biotech Inc. Dette kitet baserer seg på prinsippet om alkalisk lysering av bakteriene. Baktericellene høstes da først ved sentrifugering og cellepelletten løses i en resuspenderingsbuffer som blant annet inneholder RNaseA. Deretter tilsettes en lysisbuffer. Denne inneholder detergenter som SDS (sodium dodecylsulfat) og denaturerende agens som NaOH. Detergenten ødelegger cellemembranen slik at celleinnholdet frigjøres. Den basiske løsningen fører til at DNA denatureres. Neste trinn er å tilsette en nøytraliseringsbuffer som blant annet inneholder kaliumacetat. Dette vil nøytralisere løsningen og føre til at plasmid-DNA vil renatureres, mens proteiner og lange kromosomale DNA-tråder vil felles ut sammen med SDS. Etter påfølgende sentrifugering vil de små sirkulære plasmidene finnes i supernatanten,

mens kromosomalt DNA vil befinne seg i bunnfallet. Supernatanten kan da benyttes videre. DNA bindes så til en glassfiber-matrix. Deretter kan urenheter vaskes bort før DNA elueres ved hjelp av en buffer med lav ionestyrke, som for eksempel TE-buffer.

Rensing av 2-3ml overnattskultur.

Cellelysis:

- Overfør 1-1.5 ml overnattskultur til et 1.5 ml eppendorfrør. Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder for å felle ut cellene.
- Fjern så mye av supernatanten som mulig uten å ødelegge pelletten.
- Overfør på ny 1-1.5 ml overnattskultur til eppendorfrøret, og sentrifuger igjen ved full hastighet i 30 sekunder.
- Fjern supernatanten, og resuspender pelletten fullstendig i 300 µl av løsning I ved hjelp av kraftig vortexing. Løsning I er en isoton løsning som inneholder RNase som bryter ned eventuelt RNA.
- Tilsett 300 µl av løsning II og bland ved å invertere røret 10-15 ganger. Løsningen må ikke stå mer enn 5 minutter etter tilsetting av løsning II. Bakterieløsningen bør begynne å se klarere ut ettersom cellene lyses.
- Tilsett 600 µl av løsning III og bland ved å invertere røret til et hvitt bunnfall kommer til syne. Bland til bunnfallet er jevnt fordelt i røret. Løsning III er en nøytraliseringsbuffer som nøytraliserer pH-verdien til lysatet. Dette fører til renaturering av plasmid-DNA. Løsningen inneholder også kaotrope salter som fremmer binding av DNA til glassfibermatrixen.
- Sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter for å pelettere celledbris.
- Klargjør en GFX-kolonne til hvert prep, ved å plassere kolonnen i et oppsamlingsrør.

DNA-rensing:

- Overfør hele supernatanten til et nytt eppendorfrør
- Overfør ca. halvparten av supernatanten til GFX-kolonnen. Innkuber i 1 minutt ved romtemperatur.
- Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder, og tøm så ut innholdet i oppsamlingsrøret.
- Overfør resten av supernatanten til kolonnen. Innkuber i 1 minutt ved romtemperatur.
- Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder, og tøm så ut innholdet i oppsamlingsrøret.
- Tilsett 400 µl vaskebuffer til kolonnen. Sentrifuger ved full hastighet i 1 minutt for å fjerne buffer og tørke ut matrixen før eluering.

- Tilsett 100 µl TE-buffer til kolonnen. Innkuber i 1 minutt i romtemperatur og sentrifuger så ved full hastighet i 1 minutt for å eluere DNA. Hvis en mer konsentrert DNA-prøve (>0.5µg/µl) er ønskelig, kan man eluere med 50 µl TE-buffer.

2.2.2. Isolering av enkeltrådet DNA fra bakteriofag M13.

M13 fagpartiklene inneholder sirkulært ssDNA. De ødelegger ikke vertscellen slik at man kan få produsert og frigitt M13 fagpartikler i vekstmediumt ved å dyrke opp M13-infisert bakteriekultur til nesten stasjonær fase. Fagpartiklene som er igjen i supernatanten etter at bakteriecellene er spunnet ned kan felles ut med PEG. Ved fenolekstrahering blir proteinkappen fjernet og enkeltrådet M13 er isolert.

Prosedyre: (Kristensen, T., *et al.* 1987)

- Infiser *E. coli* celler (med f⁺-faktor) med M13 fagpartikler, eller transformer de med den replikative formen av M13-DNA. Dyrk som beskrevet i metoder kap.2.1.3.
- Sentrifugeres 400 ml av den infisert bakteriekultur som er dyrket i ca. 10 timer, ved 5.000x g i 15 min ved 4 °C. Bakteriepelleten kastes.
- Tilsett 12 g NaCl og 16 g PEG (8000) til supernatanten for å felle ut fagpartiklene. Løsningen skal stå 1 time i RT.
- Sentrifuger blandingen ved 1000x g i 20 min ved 4 °C. Hell av supernatanten og en hvit fagpartikkelpellet bør være synlig.
- Løs opp pelleten i 16 ml 10mM Tris-HCl (pH 8.0), og overfør det hele til et nytt 30 ml sentrifugerør.
- Tilsett 16 ml fenol til løsningen, og vortex kraftig i 2 min Sentrifuger ved 3000x g i 5 min ved RT.
- Overføre den øvre klare vannfasen til et nytt rør og tilsettes 16 ml fenol:kloroform (1:1) som vortexes i 2 min Sentrifuger så ved 3000x g i 5 min ved RT. Gjenta proteinekstraksjonen 3 ganger, eller til det ikke er mer presipitat igjen mellom de to fasene i røret.
- Tilsettes 1.6 ml 3 M NaOAc og 35.2 ml etanol (96%) til den øvre vannfasen for å felle ut DNAet. Settes løsningen på is i 1 time.
- Sentrifuger det hele ved 12.000x g i 20 min ved 4 °C. Fjern supernatanten og vask DNA-pelleten ved å tilsette 48 ml 70% etanol ved 4 °C og vortex forsiktig.
- Sentrifuger ved 12.000x g i 20 min ved 4 °C, og fjern supernatanten godt ved å sette røret opp ned på benken til all etanol er borte.
- Løs pelleten i ønsket mengde TE-buffer, og oppbevar det hele ved -20°C.

2.2.3. Agarosegelelektroforese av DNA.

Agarose er et polysakkarid som danner en fast gel når det er løst i vann ved konsentrasjoner 0.5-2%. Ved å variere konsentrasjonen av agarose får man geler med ulike porestørrelser, som har ulike separasjonsområder. DNA-prøven appliseres på gelen i brønner, og gelen blir plassert i et elektrisk felt. Siden DNA er negativt ladet vil DNA-fragmentene i en gel vandre mot den positive polen i et elektrisk felt med en hastighet som er avhengig av størrelse og form. I en agarosegel vil alltid små DNA-fragmenter vandre fortere enn større fragmenter. Dette er fordi de større fragmentene blir mer hindret ved sin passasje gjennom porene enn mindre fragmenter. Agarosegelelektroforese kan derfor benyttes til å skille DNA-fragmenter med ulik størrelse fra hverandre. En agarosegel med 2% agarose vil gi god separasjon av små DNA-fragmenter (>0.5 kb), mens en agarosegel med 0.8% agarose gir god separasjon i området 0.5-10 kb, og er den mest benyttede konsentrasjonen. For å kunne synliggjøre DNA på gelen tilsettes Etidiumbromid (EtBr) til gelen før den stivner, eller farger gelen etter endt elektroforese. EtBr er et stoff som interkalerer mellom baseparene i DNA. EtBr vil være synlig i UV-lys slik at man kan se og ta bilde av de ulike båndene med DNA i gelen.

Prosedyre:

- Lag en agaroseløsning med ønsket konsentrasjon.
- Agaroseløsningen tilsettes etidiumbromid til 0.5 µg/ml. Løsningen blandes godt og helles opp i en gelform og en kam som danner brønner settes på plass. La gelen stå til den er stivnet, ca. en halv time.
- Gelen legges i elektroforesekarret og 1X TAE-buffer helles over til gelen er dekket med buffer. Kammen tas ut av gelen.
- DNA-prøvene tilsettes agarosegel loadingbuffer til konsentrasjonen er 1X og appliseres i brønnene ved hjelp av en pipette.
- Elektroforesen kjøres ved omtrent 100 V ved romtemperatur.
- Etter endt elektroforese tar man bilde av gelen i UV-lys, eventuelt etterfarger gelen først.

2.2.3.1. Etterfarging av agarosegel.

- Etter endt elektroforese overføres gelen til et kar med vann eller 1X TAE tilsatt etidiumbromid. La gelen ligge i 1-2 timer.
- Deretter avfarges gelen for å få bort mest mulig bakgrunn fra gelen, for så å ta bilde av gelen i UV-lys.

2.2.4. Kvantifisering av DNA.

Det finnes ulike metoder for kvantifisering av mengden DNA i en løsning. Under arbeidet i denne oppgaven ble det benyttet to metoder, bestemmelse ved hjelp av UV-spektro-fotometri og etidiumbromid.

2.2.4.1. Kvantifisering av DNA ved hjelp av UV-spektrofotometri.

Dersom tilstrekkelig mengde prøve er tilgjengelig og det er ønskelig å få måle den totale mengden av DNA i prøven, kan DNA konsentrasjonen bestemmes ved spektrofotometri. DNA og RNA har absorpsjonsmaksimum ved 260nm, mens det for proteiner er på 280nm. En OD-verdi på 1 tilsvarer en konsentrasjon på ca. 50 µg/ml for dobbeltrådig DNA, 40 µg/ml for enkelttrådig DNA og RNA og 20 µg/ml for enkelttrådig oligonukleotider. Forholdet mellom OD₂₆₀/OD₂₈₀ er et mål på renheten til nukleinsyren. For et rent dsDNA-preparat vil verdien være rundt 1.8, mens verdien vil være signifikant lavere dersom løsningen er forurenset med proteiner, kloroform eller fenol. For rent RNA-preparat vil verdien ligge rundt 2.0.

Prosedyre:

- Lag to 100X fortyninger av DNA-preparatet ved at 10 µl prøve fortynnes med MQ-vann til 1 ml. Bland godt.
- Overfør DNA prøven til en kvartskyvette og mål absorbansen ved 260nm og 280nm. Bruk MilliQ-vann som blindprøve. Husk å nullstille spektrofotometeret på ny når bølgelengden justeres.
- Beregn konsentrasjonen av DNA løsningen ut fra formelen: OD₂₆₀x50µg/mlx100 for de to parallellene.
- Regn ut OD₂₆₀/OD₂₈₀ for å få et anslag over renheten av DNA prøven.

2.2.4.2. Kvantifisering av DNA ved hjelp av etidiumbromid-fluorescens.

Fordi fluorescensintensiteten på grunn av interkalert EtBr er proporsjonalt med DNA-mengden, kan man benytte seg av dette for å estimere mengden DNA i en prøve. Man kjører da de ukjente DNA-prøvene i en agarosegel med EtBr, sammen med en standard av kjent konsentrasjon. Denne metoden egner seg best til små DNA-mengder eller til prøver som er så urene at estimering ved hjelp av UV-spektrofotometer ikke er mulig.

Prosedyre:

- 1, 2, 3, 4 og 5 µl av den ukjente prøven tilsettes MilliQ-vann til totalt 10 µl
- 1-2 µl standard-DNA, for eksempel λ-DNA kuttet med *EcoRI* og *HindIII*, tilsettes vann til totalt 10 µl
- Alle prøvene tilsettes 2 µl 6 X loadingbuffer og kjøres på en agarosegel som beskrevet ovenfor, og man tar et bilde av gelen i UV-lys.
- Deretter sammenlignes intensiteten på DNA-båndene i de ukjente prøvene med intensiteten i båndene som inneholder standardprøvene. DNA-bånd med samme intensitet antas å inneholde samme mengde DNA og man kan da regne ut konsentrasjonen i de ukjente prøvene.

Hvis man benytter λ-DNA kuttet med *EcoRI* og *HindIII*, bestemmes mengden av DNA i de ulike båndene som DNA-fragmentets prosentvise del av total DNA (se tabell 2.1)

Tabell 2.1 Viser størrelsen av DNA-fragmentene fra λ -DNA kuttet med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *HindIII*. Total størrelse av λ -DNA er 48500kb. Markøren er levert fra Fermentas.

Bånd	Fragmentstørrelse, kb	% av total størrelse
1	21.22	43.8
2	5.14 , 4.97	20.8
3	4.26	8.8
4	2.02	4.2
5	1.90	3.9
6	1.58	3.3
7	1.37	2.8

DNA i den ukjente prøven regnes da ut etter formelen:

$\mu\text{g } \lambda\text{-DNA (p\aa gel)} \times \% \text{ av total størrelse} = \mu\text{g ukjent DNA (p\aa gel)}$

2.2.5. Polymerase kjedereaksjon (PCR).

PCR er en metode som benyttes for å amplifisere et spesifikt DNA-fragment *in vitro* i en thermosyklus-maskin. Man bruker da to oligonukleotidprimere som hver er komplementær til en av endene til DNA-sekvensen som skal amplifiseres. Disse primerne forlenges mot hverandre av en varmestabil polymerase i en reaksjonssyklus som består av tre trinn; denaturering, primer-annealing og elongering. Først blir reaksjonen varmet opp til ca. 95°C i 3-4 minutter. Dette kalles hot-start og sørger for at alt DNA blir denaturert til enkelttråder. Deretter følger et visst antall sykluser. Både antall sykluser og lengden på hvert trinn tilpasses den individuelle reaksjonen. Det første trinnet i hver syklus er denaturering av DNA til enkelttråder. Reaksjonen blir da varmet opp til ca. 95°C i ca. 30 sekunder. Deretter følger annealingstrinnet. I dette trinnet skal oligonukleotidprimerne feste seg til sin komplementære DNA-sekvens. Temperaturen senkes i dette trinnet til ca. 55°C i omtrent 30 sekunder. Så økes temperaturen igjen til ca. 72°C i elongeringstrinnet hvor DNA polymerasen forlenger primerne. Lengden på dette trinnet avhenger først og fremst av størrelsen på DNA-fragmentet som skal amplifiseres. For at dette trinnet skal bli vellykket må det være frie dNTP'er og Mg²⁺-ioner i løsningen. Etter elongeringstrinnet blir løsningen igjen varmet opp til 95°C for et nytt denatureringstrinn. I den andre syklusen vil primerne binde seg til de nysyntetiserte ssDNA-trådene, og kopiere enden av de første primerne slik at etter syklus 2 vil reaksjonen inneholde syntetiserte DNA-molekyler med korrekt og ønsket lengde. Antallet med korrekte DNA-molekyler vil deretter doble seg for hver syklus. Hvis en PCR var 100% effektiv ville DNA-sekvensen bli kopiert til 2ⁿ etter n sykluser. En av fordelene med PCR er at man ikke trenger mye eller spesielt rent DNA som utgangspunkt. Det eneste man trenger er noe sekvensinformasjon slik at man kan lage primere som er tilnærmet komplementære.

Når det gjelder de to oligonukleotidprimerne er disse vanligvis 18-30 nukleotider lange og er designet slik at de festes på hver sin side av målsekvensen, slik at de forlenges mot hverandre ved addisjon av nukleotider til 3'enden. Primerne bør ha omtrent samme smeltepunkt slik at de annealer til DNA ved lik temperatur.

Prosedyre:

- Bland i et 0.5 ml sterilt PCR-rør:
 - DNA-templat
 - Varmestabil DNA polymerase (ca. 2 units)
 - DNA polymerasebuffer (varierer med polymerasen som benyttes)
 - dNTP-mix (200 μ M av hver)
 - N-terminal primer (ca. 1 μ M)
 - C-terminal primer (ca. 1 μ M)
 - MilliQ-vann

Man bør også kjøre to kontroller; en uten templat og en uten primer. Volumet erstattes da med MilliQ-vann. Bland godt, spinn raskt ned og oppbevar reaksjonsblandingen på is.

- Sett PCR-rørene i PCR maskinen og start et PCR program som er tilpasset reaksjonen.
- 5 μ l av den ferdige PCR reaksjonen undersøkes på en agarosegel for å verifisere produkt dannelse.

I denne oppgaven ble PCR benyttet i forbindelse med mutagenese av *Tth* polymerase I, som blir beskrevet under punkt 2.2.8, og i forbindelse med sekvensering.

2.2.6. Kutting med restriksjonszymer.

Restriksjonszymer er bakterielle enzymer som inngår i en forsvarsmekanisme hos bakterien. Den virker ved å kutte opp fremmed DNA. Bakterien skiller mellom eget og fremmed DNA ved at bakteriens eget DNA er metylert i spesifikke seter i sekvensen. Fremmed DNA som mangler metylgruppen i disse setene blir dermed angrepet av restriksjonsenzymene. Det finnes mange ulike restriksjonszymer fra ulike bakterier. Hvert restriksjonsenzym gjenkjenner en spesiell DNA-sekvens på 4-8 basepar, og kutter ett spesifikt sted i denne sekvensen. Enzymene har også ulike måter å kutte på. Noen kutter slik at det blir et 3'overheng eller 5'overheng og andre kutter slik at det blir en butt ende. På 3'overheng sitter alltid hydroksylgruppen igjen og på 5'overheng sitter alltid fosfatgruppen igjen. Disse overhengene kalles for sticky eller kohesive ender, fordi de kan binde seg til hvilken som helst DNA-ende som har den komplementære nukleotidsekvensen. Dette gjør at et fragment etter kutting med et restriksjonsenzym, kan kobles sammen med et annet fragment som er kuttet med det samme restriksjonsenzymet ved hjelp av DNA-ligase. Dette er blant annet prinsippet bak liggering av fragmenter inn i ulike vektorer, noe som er en av de viktigste bruksområdene for restriksjonszymer. Restriksjonszymer kan også brukes til å påvise en mutasjon dersom mutasjonen enten har dannet et nytt restriksjonssete eller fjernet et eksisterende restriksjonssete. Denne metoden ble benyttet i forbindelse med mutagenesen som beskrevet under punkt 2.2.8

Prosedyre:

Ulike restriksjonszymer fungerer best under ulike betingelser. Det som er felles for alle er at de krever Mg^{2+} -ioner (10 mM), men de har forskjellig pH-, salt- og temperatur-optimum.

- Bland ønsket mengde med DNA som skal kuttes, restriksjonsenzym (2-3 units), reaksjonsbuffer og MilliQ-vann til ønsket volum i et eppendorfrør.

- Sett løsningen på is.
- Innkuber reaksjonsblandingen i ca. to timer ved optimal temperatur for enzymet
- Inaktiver enzymet dersom dette anbefales av leverandør, for eksempel ved oppvarming til 75°C i 10 minutter.
- Analyser deler av restriksjonsblandingen på en agarosegel sammen med en størrelsesmarkør. Det kan også være lurt å ta med en prøve med ukuttet plasmid.

2.2.7. Transformering av kompetente celler.

For å oppnå større mengder med plasmid eller for å uttrykke genet slik at man får proteinet genet koder for, må man transformere plasmidet inn i en vertscelle som enten kan replikere plasmidet og eventuelt transkribere og translatere genet som sitter i plasmidet. For å oppnå sistnevnte må man ha en såkalt ekspresjonsvektor. Dette er en vektor som inneholder induserbare promotere og andre kontrollsekvenser som er nødvendige for ekspresjon.

Det finnes flere metoder for transformering av celler. Man kan blant annet benytte sonikering, elektroporering eller kalsiumkompetente celler. Selv om metodene er ulike har de samme hensikt, nemlig å svekke celleveggen hos verten slik at plasmidet blir tatt opp med større effektivitet i cellene. I denne oppgaven ble det benyttet kalsiumkompetente celler som er gjort kompetente med kalsium ved at det har blitt vasket gjentatte ganger med Ca²⁺-holdige løsninger. Disse cellene har blitt dyrket i SOB-medium, vaskes i PIPES-buffer og behandles til slutt med DMSO. Etter behandlingen fryses cellene ned i alikvoter ved -70°C, og kan da lagres i flere måneder. I denne oppgaven ble det benyttet ferdiglagede kompetente DH5α *E.coli*-celler.

Prosedyre:

- Tin de kompetente cellene forsiktig på is.
- 10-50 ng plasmid-DNA tilsettes 150-200 µl kompetente celler.
- La blandingen stå på is i 30 minutter.
- Innkuber blandingen ved 42°C i 45 sekunder.
- Sett blandingen på is i 2-3 minutter.
- Plat ut bakteriene på en vekstskål med ønsket seleksjonsmedium, og innkuber skålene ved 37°C over natt. Deretter kan kolonier plukkes og dyrkes videre i LB-medium.

2.2.8. Mutagenese av DNA

I denne oppgaven skulle mutasjonen R662D innføres i genet som koder for DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus*. Dette genet hadde alt fått innført en såkalt Tabor-Richardson mutasjon, (F669Y) (Rønneberg, J.A., 1999). For å få inn mutasjonen R662D (RD) ble

QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene benyttet. Dette er et kit som kan benyttes til å innføre punktmutasjoner, bytte ut aminosyrer og til å sette inn eller fjerne en eller flere aminosyrer hos store plasmider og i vanskelige målsekvenser.

Metoden utføres ved å benytte *PfuTurbo* DNA polymerase og en PCR-maskin. Metoden tar utgangspunkt i at genet av interesse er ligert inn i en dobbeltrådig vektor. Videre trenger man to syntetiske oligonukletid-primere som inneholder den ønskede mutasjonen.

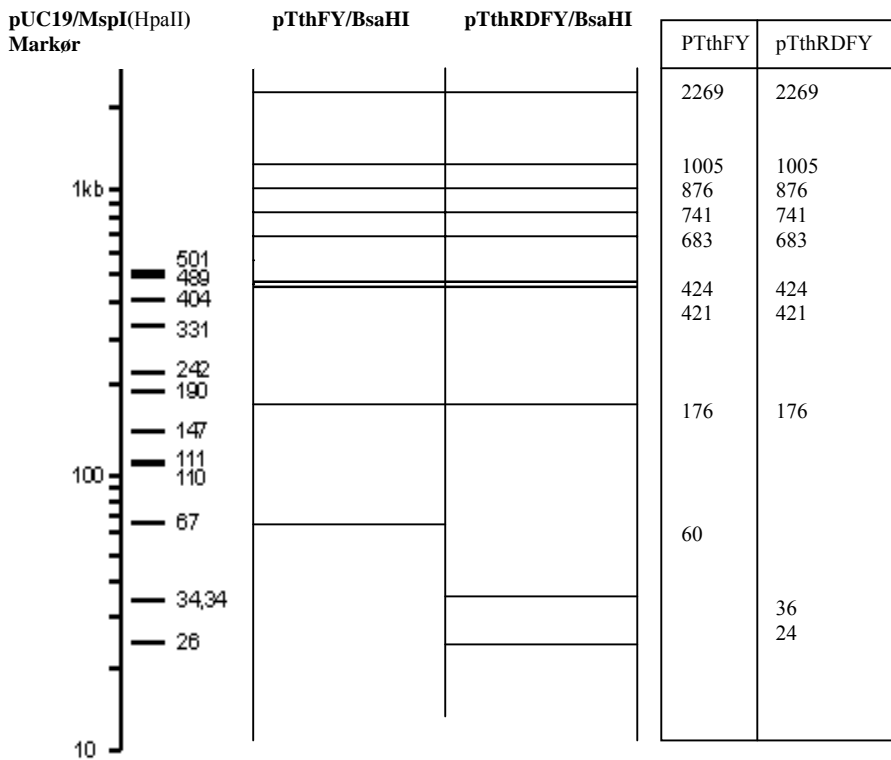
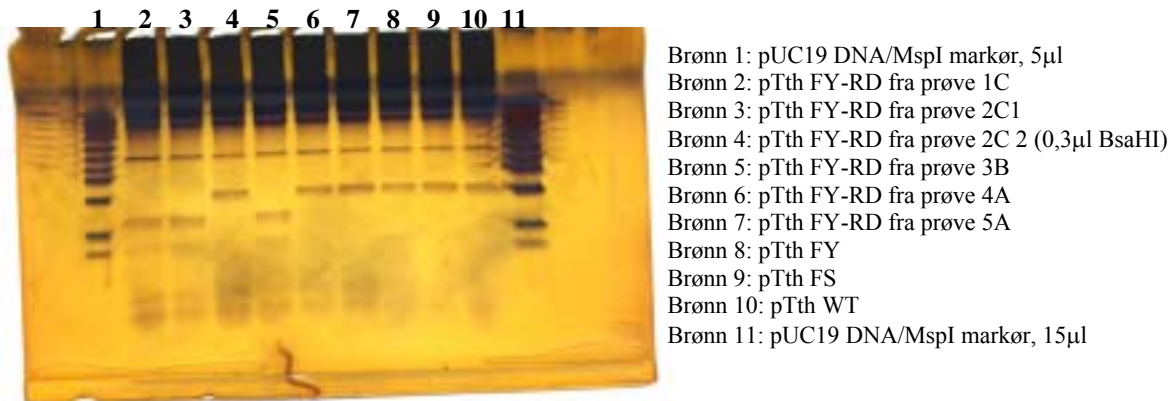
R662D (primer): 5'-ACC GTC TTG GCG GCG TCG CGC ATC AGG GGG TC-3'

R662Drev (primer): 5'-GAC CCC CTG ATG CGC GAC GCC GCC AAG ACG GT-3'

De to primerne er komplementære til hver sin tråd i det dobbeltrådige genet. Primerne forlenges i PCR-maskinen ved hjelp av *PfuTurbo* DNA polymerasen, slik at man får muterte plasmider med enkeltrådig nick i hver tråd. Deretter blir PCR produktet kuttet med *DpnI* endonuklease.

Endonukleasen er spesifikk for metylert og hemi-metylert DNA og brukes for å kutte vekk det parentale DNA-templatet, slik at man kun sitter igjen med muterte plasmider, da disse ikke er metylert. DNA-vektorene med mutasjon blir så transformert inn i XL10-Gold ultrakompetente celler. Mutagenesen er illustrert i figur 2.1 nedenfor, også vist i instruksjonsheftet fra Stratagene. Cellen dyrkes opp i kultur og man rens ut plasmid for å sjekke om mutasjonen er innført ved restriksjonskutting med *BsaHI*.

Ved innføring av RD mutasjonen vil et *GdiIII* ste kuttes ut og et *BsaHI* setet innføres i plasmidet. Dersom mutasjonen er tilstede i plasmidet vil en ved restriksjonskutting med *BsaHI* få to bånd på 24 og 36 nukleotider i stedet for ett bånd på 60 nukleotider uten mutasjon. Figur 2.1 viser kuttemønsteret for *pTth/BsaHI* blir:

A**B**

Figur 2.1: Restriksjonsanalyse. A) Kutting av DNA med *BsaHI*. Hvor mutasjonen er, vil et bånd på 60 nukleotider kuttes og danne to nye bånd på 24 og 26 nukleotider. B) Polyakrylamidgel (15%TBE gel), kuttet med *BsaHI* og sølvfarget.



Figur 2.2: Illustrasjon av mutagenese med QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis kit (Modifisert bilde fra Bones, A., 2003).

Prosedyre: Fremgangsmåten i instruksjonsheftet fra Stratagene ble fulgt.

- I oppgaven ble det benyttet gen som var ligert inn i pTrc99A-plasmidet (Rønneberg, J.A.,1999). Fem ulike prøver med forskjellige konsentrasjoner ble benyttet (Tabell 2.2):

Tabell 2.2: Reaksjonsoppsettet for de forskjellige prøvene.

	Prøve 1: p <i>Tth</i> FY 10 ng DNA	Prøve 2: p <i>Tth</i> FY 20 ng DNA	Prøve 3: p <i>Tth</i> FY 30 ng DNA	Prøve 4: p <i>Tth</i> FY 22 ng DNA	Prøve 5: p <i>Tth</i> WT 22ng DNA
10× reaction buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dsDNA templat	0,5 µl	1 µl	1,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
125 ng R662D primer	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
125 ng R662Drev primer	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
dNTP mix	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
QuikSolution	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
MilliQ-vann	37,9 µl	37,4 µl	36,9 µl	37,9 µl	37,9 µl

- Så ble 1 µl *PfuTurbo* DNA polymerase tilsatt (2.5U/µl).
- Deretter ble reaksjonen kjørt PCR maskinen med følgende sykluser:

Tabell 2.3: Oversikt over de ulike trinnene som ble gjennomført i mutagenesen.. For elongeringstrinnet ble det anbefalt 1min/kb plasmid.

Segment	Syklus	Temperatur	Tid
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C	50 sek
		60°C	50 sek
		68°C	7 min
3	1	68°C	7 min

- Etter endt PCR settes reaksjonene på is i 2 min for å avkjøles til 37°C.
- Tilsett 1 µl *DpnI* restriksjonsenzym (10 U/µl). Løsningen blandes forsiktig, sentrifugeres i 1 min og innkuberes ved 37°C i 1 time for å fordøye supercoilet ”parentalt” dsDNA. Deretter settes reaksjonene på is.

Transformering av XL10-Gold ultrakompetente celler:

- Tin de XL10-Gold ultrakompetente cellene forsiktig på is og fordel så 45µl celler til forhåndsavkjølte rør. Tilsett så 2µl β-ME miks som følger med kitet til cellene og bland forsiktig. Innkuber cellene så på is i 10 min, men bland forsiktig hvert 2. minutt.

- Overfør 2 µl av det *DpnI* I-kuttete DNA fra hver reaksjon til hvert sitt rør med XL10-Gold ultrakompetente celler.
- Innkuber celleblandingen på is i 30 minutter for så å gi cellene varmesjokk i 30 sekunder på 42°C for å få transformert inn de nye plasmidene. Innkuber cellene så på is.
- Tilsett så 0,5 ml forhåndsvarmet NZY+ medium og dyrk cellene ved 37°C og 250 rpm i 1 time. Plat så de transformerte cellene ut på agar skåler med Ampicillin og innkuberes ved 37°C i 16 timer.
- Dyrk så opp kolonier fra skålene i 5 ml LB-medium med Ampicillin over natt ved 37°C.
- Plasmid renses ut ved hjelp av GFX-kit, og innføring av mutasjonen ble så kontrollert ved restriksjonskutting med *BsaHI*.

2.3. Analyse av DNA sekvens.

DNA sekvensering er en teknikk der man får bestemt baserekkefølgen i et DNA-molekyl. Det finnes flere metoder for sekvensering av DNA, men Sangers kjedeterminerings-metode er den mest benyttede sekvenseringsmetoden i dag (Sanger, F., *et al.* 1977). Denne metoden baserer seg på at DNA-fragmentet som skal sekvenseres er templat for syntesen av en komplementær tråd i nærvær av primere, DNA polymerase, dNTP og ddNTP. Ved inkorporering av et ddNTP nukleotid i den voksende DNA tråden fås en terminering av reaksjonen da ddNTP nukleotidet ikke har en fri 3'-OH gruppe som er nødvendig for å få dannet en ny 3'-5' fosfodiesterbinding. Forholdet mellom dNTP nukleotider og ddNTP er omtrent 99:1. Ved manuell sekvensering, der det vanligvis benyttes radioaktiv merking, og automatisk sekvensering med ALFexpress™ kjøres sekvenseringsreaksjonene i fire ulike rør, en for hver av de fire ddNTP nukleotidene. De ulike sekvenseringsreaksjonene appliseres i fire ulike brønner og de terminerte produktene separeres ved hjelp av polyakrylamid gelelektroforese. Ved manuell sekvensering detekteres molekylene ved autoradiografi, mens de ved automatisk sekvensering detekteres ved hjelp av fluorescens merking av primere eller ddNTP. I denne oppgaven ble sekvenseringen utført med Cy-5 merkede primere. Cy5 er et indokarbocyanin.

2.3.1. Syklisk sekvensering.

Varmestabile DNA polymeraser og PCR teknologi har gjort nukleotidsekvensering til en meget følsom teknikk, der krav til mengden og kvaliteten av DNA templatene ikke er så strenge (Murray, V., 1989). Ved bruk av varmostabile DNA polymeraser kan sekvenseringsreaksjonene kjøres i sykluser med denaturering, festing av primer og forlengning av primerne, som vil gi en lineær amplifisering av de terminerte DNA fragmentene. Denne varianten av DNA sekvensering kalles syklisk sekvensering, og metoden benytter seg av relativt små mengder med dobbeltrådet DNA-templat (0.1 –1 µg).

I denne oppgaven ble det benyttet en Cy5-merket universalprimer. Både den muterte og den umuterte varianten av *Tth* DNA polymerase I ble benyttet, under forhold som var optimale for hver av dem.

Prosedyre: (Analyse av en klon med 4 termineringsreaksjoner).

Buffere, 10x reaksjonsbuffer og termineringsløsninger er beskrevet i materialer kap. 5.3

- Bland følgende løsninger i et sterilt 0.5 ml PCR-rør:

DNA templat (0,1-1 μ g/ μ L)	14 μ l
10x FS Reaksjonsbuffer:	2 μ l
Cy5 merket primer (4 μ mol/ μ L)	1 μ l
Enzymløsning, ulike mengder	
MilliQ vann til 21 μ l	

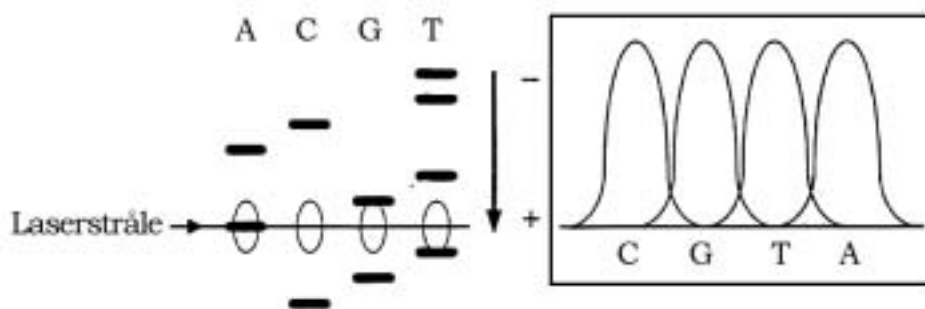
- Fordel blandingen i alikvoter på 5 μ l i 0.5 ml PCR-rør merket A, C, G og T.
- Tilsett termineringsløsningene til hvert sitt rør. Termineringsløsning A skal tilsettes rør A, termineringsløsning C skal tilsettes rør C, og så videre. Bland godt og spinn raskt ned.
- Sett rørene i en PCR-maskin, som utfører følgende sykluser:

Trinn 1: 95°C i 2 min
Trinn 2: 95°C i 30 sek
Trinn 3: 50°C i 30 sek
Trinn 4: 72°C i 40 sek
Trinn 5: 29 sykluser av trinn 2-4
Trinn 6: 72°C i 10 min
Trinn 7: 4°C ∞
Trinn 8: slutt.

Stopp reaksjonene ved å tilsette 4 μ l stoppløsning, og oppbevar prøvene ved 4°C, eller ved -20°C for lagring over lengre tid. Analyser prøvene på en automatisk sekvenseringsmaskin som beskrevet nedenfor.

2.3.2. Automatisk sekvensering med ALFExpress™.

Automatiske sekvenseringsmaskiner benytter en laser for å detektere DNA-fragmenter som er merket med en fluorescerende forbindelse. Ved manuell sekvensering brukes det radioaktivt merkede forbindelser som kan fremkalles ved autoradiografi. ALFExpress™ fra Pharmacia Biotech er konstruert for å separere og detektere fluorescerende DNA-fragmenter ved gelelektroforese. Ved et visst punkt i gelen treffer DNA-fragmentene en laserstråle, og laseren sender ut lys med en bølgelengde der fluoroforene i DNAet eksiteres. Lyset som emitteres detekteres av fotodetektorer som er plassert bak gelen (fig. 2.3). Det er 40 fotodetektorer, og når fire spor benyttes for hver klon som skal sekvenseres, og en detektor er nødvendig for hvert spor, så kan ALFExpress™ dermed sekvensere 10 kloner samtidig. ALFExpress™ inneholder et softwareprogram som omdanner detektorsignalene til sekvens. Data kan prosesseres automatisk, og DNA-sekvensen kan senere rettes manuelt dersom det er ønskelig. Dette gjøres i Sequence Analyser 2.10.



Figur 2.3. Prinsippet for DNA-sekvensering med ALFExpress™.

Fluorescensmerkede DNA-fragmenter i de ulike reaksjonene detekteres av fotoceller montert bak gelen når de belyses av laserstrålen. Signalene fra fotocellene registreres som funksjon av tiden, og DNA-sekvensen bestemmes ut ifra rekkefølgen på signalene (Pharmacia Biotech).

2.3.2.1. Montering av gelkassetten.

Prosedyre: (ALFExpress™ DNA-Sequencer User Manual).

- Vask glassplaten, varmeplaten, glass-spacere og kam godt med lunkent springvann (37°C). Bruk ikke for varmt vann da platene kan sprekke. Bruk oppvaskkost og papir. Tørk av platene og legg de på et stødig underlag med innsiden opp.
- Vask så begge platene med MQ-vann, tørk av med papir, og vask så med 70% etanol. Dette gjentas to ganger, eller til alle gelrester er fjernet fra glassplatene. For å få gelen til å feste seg godt ved området rundt brønnene smøres litt Bind-Silane på de øverste 2-3 cm på varmeplaten. Dette poleres og tørkes av med papir. Vask en siste gang med etanol og tørk godt av med papir.
- Legg de rene spacerne på kanten til varmeplaten, og legg forsiktig glassplaten med innsiden inn oppå varmeplaten og spacerne. Pass på at spacerne ligger rett, og kant i kant med glassplatene. Fest klemmer på hver side for å holde glassplaten på plass (3 stk.. på hver side).
- Sett inn den rene kammen øverst mellom glassplatene, og sett en liten klemme på kammen slik at den sitter fast.

2.3.2.2. Tillaging av akrylamid-gelløsning.

Til nukleotidsekvensering ble det benyttet 6 % polyakrylamidgeler med 7 M urea i 1x TBE-buffer. Sekvenseringsgelen ble laget ut fra en 50 % oppbevaringsløsning med kommersiell Long Ranger™ gelløsning fra BMA.

Prosedyre: (ALFExpress™ DNA-Sequencer User Manual).

Løsninger og buffere til bruk for ALFExpress™ er beskrevet i materialer kap. 5.

- Lag akrylamid-gelløsning med følgende reagenser for 6 % gelløsning:

Long Ranger™ (50 % oppbevaringsløsning).	7.2 ml
10x TBE-buffer	6.0 ml
Urea, ALF grade	25.2 g
MilliQ-vann	25.0 ml

2.3.2.3. Støping av akrylamidgel.

For å starte polymeriseringen av akrylamidgelløsningen tilsettes 10 % Ammoniumpersulfat (APS) og N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin (TEMED).

Prosedyre: (ALFExpress™ DNA-Sequencer User Manual).

- Filtrer 60 ml akrylamidgelløsning gjennom et 45 µm vakuumfilter.
- Overfør gelløsningen til et 250 ml begerglass, og tilsett 400 µl 10 % APS, og 40 µl TEMED og bland godt, men forsiktig for å unngå luftbobler i blandingen.
- Sug opp gelløsningen i en 50 ml sprøyte og press innholdet inn mellom glassplatene nederst på gelkassetten. Press forsiktig på sprøyten for å unngå luftbobler. Bank forsiktig på glassplaten hvis gelfronten henger igjen mellom platene. Fyll på gelløsning til det har dekket kammen.
- La gelen polymerisere i ca. 1 time.
- Kontroller at det ikke er gelmateriale eller andre forurensinger på yttersiden av glass-spacerne der laserlyset trenger inn i gelen.

2.3.2.4. Start og kjøring av ALFExpress™.

Prosedyre: (ALFExpress™ DNA-Sequencer User Manual).

Løsninger og buffere til bruk for ALFExpress™ er beskrevet i materialer kap.5.3.

- Skru på PC-en og deretter på ALFExpress™.
- Sett inn nedre bufferkammer i apparatet og sett inn gelkassetten i riktig posisjon. Den skal henge på to metalltapper på hver side av øvre bufferkammer.
- Koble til vannsirkulasjonsslangene på hver side av gelkassetten. Press dem godt på slik at det høres et tydelig klikk.
- Fyll bufferkamrene med 0.6x TBE-buffer (1x TBE-buffer for fragment analyse) til avmerket nivå inne i kamrene.
- Lukk opp ønsket casebook. Skriv inn navn på prøvene og gjør eventuelle endringer i de eksperimentelle betingelsene.
- Sett i gang de eksperimentelle betingelsene ved å trykke "Preset".

- Lukk lokket til ALFExpress™ og laseren vil begynne å søke gjennom gelen for å finne optimal posisjon (laserverdien bør være på mellom 600-800).
- Denaturer sekvenseringsreaksjonene ved 95°C i 3 minutt før 4-6 µl appliseres på gelen i rekkefølgen A, C, G og T for hver reaksjon.
- Ta ut kammen og skyll brønnene med 1x TBE-buffer når gelen har oppnådd ønsket temperatur (55°C). Sett prøvene på så fort som mulig, siden gelen lekker ut urea i bufferen.
- Sett på elektrodene i øvre og nedre bufferkammer.
- Lukk lokket og start elektroforesen ved å trykke “Start”. Apparatet vil stoppe automatisk etter endt kjøring.
- Slå av apparatet etter endt kjøring, og koble fra elektroder og vannsirkuleringen. Fjern gelkassetten fra apparatet og legg den på et stabilt underlag. Lukk opp gelkassetten og fjern gelen. Vask alt fritt for gelrester.
- Resultatene av elektroforesen blir lagret som *.alx-filer på brukerens område i Datafilene analyseres og prosesseres med Sequence Analyser 2.10.

2.4. Ekspresjon av rekombinante proteiner i *E.coli*.

Proteiner kan produseres i store mengder ved å benytte rekombinante mikroorganismer som inneholder de bestemte proteinkodende genene. Bakterien *Eschericia coli* (*E. coli*) og bakterielle plasmider for disse bakteriene er mye brukt innen rekombinant bioteknologi. *E. Coli* bakterien finnes i mange ulike varianter og kan dyrkes til meget høy celletetthet, og er derfor en ideell vert for produksjon av mange rekombinante proteiner.

2.4.1. Ekspresjon og produksjon av cellefritt lysat.

I denne oppgaven ble det benyttet en modifisert utgave av en metode beskrevet av Pluthero (1993), for ekspresjon og isolering av *Taq* DNA polymerase. (Kristiansen, 2000). Hvis man ikke vet etter hvor mange timer ekspresjonen er på topp, bør man ta uttak ved ulike tidsintervaller, for eksempel hver annen time.

Prosedyre:

- En bakteriekoloni som inneholder plasmid med rett innskudd overføres til 5 ml LB_{amp100}-vekstmedium og dyrkes overnatt ved 37°C i en rysteinkubator.
- 500 µl fra overnatte-kulturen overføres til en kolbe med 500 ml LB_{amp100}- vekstmedium og dyrkes til OD₆₀₀ ~ 0.8. Deretter tilsettes IPTG (iso-propyl-thio-galaktosid) slik at konsentrasjonen blir 0.5mM (125mg/L). Bakteriekulturen dyrkes videre ved 37°C i rysteinkubatoren i 6 timer for de native proteinet og 4 timer for det muterte.
- Bakteriene høstes ved sentrifugering ved 5000x g i 10 minutter ved 4°C, og bakteriepelletten resuspenderes i 50 ml buffer A (resuspensjonsbuffer).

- Løsningen sentrifugeres igjen ved 5000x g i 10 minutter ved 4°C, og bakteriepelletten resuspenderes i 25 ml buffer B (pre-lysisbuffer). La løsningen stå i 15 minutter i romtemperatur.
- Tilsett så 25 ml av buffer C (lysisbuffer), bland forsiktig og sett løsning i vannbad som holder 75°C i en time.
- Sentrifuger løsningen ved 3000x g i 15 minutter ved 4°C, og overfør det klare lysatet til et rent rør.
- Lysatet fortynnes 1:1 med buffer D (lagringsbuffer), og oppbevares i fryser for videre undersøkelse.

2.4.2. Produksjon av cellefritt lysat fra 1 ml kultur.

Ved undersøkelse av polymeraseaktivitet i cellefritt lysat i liten skala, og ved undersøkelse av polymeraseaktiviteten under ekspresjonen, ble det produsert et cellefritt lysat av uttak på 1 ml bakteriekultur.

Prosedyre:

- Spinn ned 1 ml bakteriekultur ved 5000x g i 5 min ved 4°C, og vekstmediet fjernes fullstendig.
- Bakteriepelletten løses i 50 µl Buffer B (Buffer A med 4 mg/ml lysozym) og la røret stå i 5 min i romtemperatur.
- Tilsett 50 µl Buffer C.
- Eventuelt varmebehandlingstrinn utføres på varmeblokk ved 75°C i 15 min.
- Sentrifuger løsningen ved 16000x g i 10 min ved 4°C og bruk 1-10 µl av den øvre fasen til undersøkelse av polymeraseaktivitet.

2.5. Rensing og oppkonsentrering av proteiner.

2.5.1. Fjerning av DNA.

Rester av DNA i løsningen kan forstyrre binding av proteinene til kolonnematerialet i ulike kromatografimetoder. Det er derfor viktig at disse restene fjernes før man starter med rensing ved hjelp av kromatografi.

2.5.1.1. Streptomycinsulfatfelling av DNA.

DNA felles ut i nærvær av streptomycinsulfat og dette er en enkel og effektiv måte å fjerne DNA i en løsning på. Det man må være oppmerksom på er at enkelte proteiner også kan felles ut i nærvær av streptomycinsulfat. Det er derfor viktig å måle aktiviteten i både grovlysatet, det rensede lysatet og den resuspenderte pelletten (Hamilton, 1974, Lehman, 1974, Setlow, 1974).

Prosedyre:

- Tilsett 1 del 5% streptomycinsulfat til 5 deler av grovlysatet under omrøring.
- La blandingen stå med omrøring i 30 minutter og sentrifuger den deretter ved 10000 rpm i 15 minutter.
- Hell supernatanten over i en ren beholder. Tilsett ønsket buffer, for eksempel TN-buffer til pelleten slik at denne får samme volum som supernatanten. La pelleten løses over natt.
- Test aktiviteten i den resuspenderte pelleten og det rensede lysatet. Sjekk også grovlysat, rensed lysat og pelleten på en 0.8% agarosegel for videre behandling.

2.6. Proteinbestemmelse ved Lowry-metoden.

I denne oppgaven ble det benyttet en modifisert utgave av Lowry-metoden for å bestemme proteinmengde (Eisenthal og Danson, 1992). Metoden baserer seg på at en reagens; Folin Ciocalteu-reagens, danner et blåfarget kompleks i nærvær av proteiner. Blåfargen (745-750nm) er proporsjonal med mengden proteiner. Den aktive komponenten er fosfomolybdenwolfram-mikset syre. Siden metoden lett kan la seg interferere av flere ulike forbindelser, f. eks EDTA og DTT, blir proteinene først felt ut med trikloreddiksyre (TCA) for å fjerne slike forbindelser.

2.6.1. TCA-felling av proteinene.

De fleste proteiner denaturerer og felles ut i nærvær av sterke organiske syrer som TCA. I løsninger med små mengder proteiner bør proteinene felles ut sammen med en "carrier", som for eksempel deoksykholat (DOC), da dette vil gi en mer fullstendig utfelling.

Prosedyre:

- 500 µl av proteinprøven (<0.1 mg/ml protein), tilsettes 75 µl 1% DOC i 0.1 M NaOH. La blandingen stå i romtemperatur i 5 minutter.
- Tilsett 100 µl 50 % TCA. Bland godt og sett på is i 15 minutter.
- Sentrifuger løsningen ved 13000 rpm i 15 minutter. Kast supernatanten, og løs proteinpelleten i ønsket mengde buffer eller MilliQ-vann.

2.6.2. Lowry-analysen.

Prosedyre:

- Tilsett 500 µl Lowry-B løsning til det utfelte proteinet. La blandingen stå ved romtemperatur i 10 minutter.
- Tilsett så 250 µl Lowry-C løsning og bland godt (vortex). La stå ved romtemperatur i 30 minutter.

- Avles A_{750} i et spektrofotometer. Som blindprøve tilsettes MQ-vann i stedet for proteinløsning. Proteinkonsentrasjonen bestemmes så ut i fra en standardkurve med kjente mengder bovint serum albumin(BSA).

2.7. SDS-PAGE (Polyakrylamidgelelektroforese).

Med elektroforese menes vandring av ladete partikler i en løsning som er under innflytelse av et elektrisk felt. Partiklene vil da vandre mot polen som har motsatt ladning. Vandringshastigheten til den ladete partikkelen vil avhenge av forholdet mellom ladning og masse.

I SDS-PAGE blir proteiner separert med hensyn på størrelse i en polyakrylamidgel. En polyakrylamidgel består av kjeder med polymerisert akrylamid som er krysskoblet med N,N'-metylen-bisakrylamid. Man starter polymeriseringen ved tilsetning av ammonium- persulfat (APS) og N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED). Dette fører til at de kryssbundete kjedene danner porer hvor proteinene må passere. Porestørrelsen minker med økende mengde akrylamid, og man bør velge en mengde som passer til det proteinet man ønsker å studere. Før proteinene settes på gelen blir de behandlet med en reduserende agent, ditiotreitotol (DTT), som bryter eventuelle disulfidbindinger og natrium dodecylsulfat (SDS). SDS er en anionisk detergent som denaturerer proteinene og dekker dem med negative ladninger. Dette gjør at alle proteinene får et likt ladning:masse-forhold slik at de kan separeres kun med hensyn på proteinenes masse. Små proteiner vil bli mindre hindret av porene i gelen og vil dermed vandre raskest i det elektriske feltet.

I dette forsøket blir det benyttet et diskontinuerlig gelsystem. Det vil si at gelen består av to geler, en stacking-gel og en separasjons-gel. Stacking-gelen har som funksjon og samle proteinene i et bånd slik at man får en smal startsoner. Dette gjøres ved hjelp av glysin og klorioner som finnes i elektroforesebufferen og polyakrylamidgelen. I stacking-gelen som har en pH på 6.7 blir partiklene separert etter ladningstetthet og ikke etter størrelse. Klorionene har størst ladningstetthet og vil vandre fortest, etterfulgt av proteiner. Glysin har minst ladningstetthet ved pH 6.8 og vil vandre sist i feltet. Dette fører til at proteinene danner et smalt bånd som går over til separasjonsgelen. Når prøven kommer over i separasjonsgelen som har en pH på 8.8 vil ladningstettheten til glysin øke og disse ionene vil vandre raskere enn proteinene i gelen. Proteinene blir da ikke lenger "presset" sammen av glysin-ionene, og vil da separeres etter størrelse. De minste proteinene vil da vandre raskest.

2.7.1. Tillaging av geler til SDS-PAGE.

Oppskrifter på løsninger og buffere er beskrevet i materialer i kap 5.7

- Vask glassplatene, spacer og kam med 70% etanol og MilliQ-vann. Tørk av med papir.
- Monter glassplatene ved å legge spacer i mellom glassplatene og sett på klemmer. Merk av på glassplaten hvor langt ned kammen går.
- Legg inn en tykk stripe med 0.8% agarose i bunnen hvis det ikke er montert en bunnspacer. La den stivne.

- Lag separasjonsgel-blanding med ønsket konsentrasjon. Hell gelløsningen forsiktig mellom glassplatene til ca. 1 cm under kammen.
- Legg forsiktig på et ca 1 cm tykt lag med vannmettet 2-butanol for å forhindre eksponering av oksygen fra luften.
- La gelen polymerisere i ca. 30 minutter.
- Hell forsiktig av 2-butanolen og skyll godt med MilliQ-vann.
- Lag stackingel-blanding og hell gelløsningen oppå separasjonsgelen helt opp til kanten på gassplaten. Stikk kammen ned i gelen.
- La gelen polymerisere i ca. 30 minutter. Gelen kan lagres i flere dager hvis den pakkes inn i fuktig papir og plast og oppbevares i kjøleskap.

Man kan også benytte ferdiglagede geler. I denne oppgaven ble det benyttet begge deler, men primært ferdiglagede geler fra BioRad (Se materialer, kap.5.6)

2.7.2. Tillaging av prøver til SDS-PAGE.

I små polyakrylamidgeler kan man sette på opptil 25 µl pr. brønn og i store kan man sette på opptil 50 µl pr. brønn.

Prosedyre:

- Bland proteinløsningen, 3x SDS-PAGE prøvebuffer og MilliQ-vann slik at konsentrasjonen av prøvebuffer blir 1x.
- Kok prøvene ved 100°C i 3-5min og sett dem på is til de skal settes på gelen.
- Fest gelen i gelbeholderen og fyll på SDS-elektroforesebuffer slik at det dekker brønnene.
- Prøvene appliseres ved hjelp av en Hamilton-sprøyte.
- Elektroforesen kjøres på ca.80V gjennom stacking-gelen og skrus så opp til ca. 200V gjennom den separerende gelen. Elektroforesen bør utføres på kjølerom for å hindre varmeutvikling i gelen.

2.7.3. Comassie-farging av proteingeler.

Comassie Brilliant Blue er et stoff som binder til proteinene i gelen og kan dermed brukes til å fremkalle båndene i gelen etter elektroforese av proteiner.

Prosedyre:

- Etter endt elektroforeses legges gelen forsiktig i et kar med Comassie Brilliant Blue fargeløsning. Kutt av et hjørne på gelen før den legges i fargeløsningen, slik at det

senere er lettere å se forskjell på brønnene. Karet settes på ett vippebrett i ca. 4 timer. Lengre tids farging gir bedre følsomhet.

- Når gelen har ligget lenge nok i fargeløsningen helles denne ut og avfargingsløsning tilsettes. Gelen settes tilbake på vippebrettet. Avfargingsløsningen byttes med jevne mellomrom til båndene kommer tydelig nok frem til at man kan ta bilde av gelen i hvitt lys.
- Gelen kan oppbevares i 7% eddiksyre i flere dager. Den kan også sølvfarges eller tørkes.

2.7.4. Sølvfarging av proteingeler.

Proteingeler kan også fremkalles ved hjelp av sølvnitrat. Dette er en mer sensitiv metode og kan detektere mengder ned til 1-2 ng protein. Geler som får for svake bånd etter farging med Comassie Brilliant Blue kan derfor sølvfarges for å få et bedre resultat. (Simpson, 2004)

Prosedyre:

- Etter endt elektroforese (eventuelt farging med Comassie Brilliant Blue) overføres gelen til et kar med Reagens A (fikseringsvæske). La gelen ligge i denne løsningen i 30 min. ved romtemperatur.
- Gjenta det første trinnet 3 ganger til.
- Tilsett Reagens B til gelen og la den ligge i 45 min.
- Gelen vaskes i destillert vann i minimum 6 x 10 min. (Kan ligge i vann over natten)
- Gelen innkuberes i Reagens C (sølvløsning) i 1-2 timer, og vaskes i destillert vann i 5-15 sekund.
- Tilsett Reagens D (fremkaller) til gelen. Observer gelen under fremkallingen av proteinbåndene. Når den ønskede sensitiviteten er oppnådd (klare synlige bånd uten en serk bakgrunn), tømmer Reagens D ut og Reagens E tilsettes.
- Gelen skal ligge i 30 min i Reagens E (stoppløsningen) før den overføres til destillert vann hvor den kan oppbevares i inntil 6 måneder, eller alternative kan gelen tørkes og lagres "for evig tid".

2.7.5. Sølvfarging av DNA på ikke-denaturerende polyakrylamidgel.

DNA kan detekteres ved hjelp av sølvnitrat. Dette er en mer sensitiv metode og kan detektere mengder ned til 2-5 ng DNA i en ikke-denaturerende polyakrylamidgel. Geler som får for svake bånd etter farging med etidiumbromid eller SYBER Green kan derfor sølvfarges for å få et bedre resultat. Løsninger er beskrevet i 5.2.3.

Prosedyre:

- Etter endt elektroforese, plasser gelen i et kar. Prøv å unngå å ta borti overflaten på gelen med fingrene for å unngå bakgrunnstøy ved fremkallingen.

- Vask gelen to ganger med destillert vann for å fjerne elektroforesebufferen fra gelen.
- Fikser gelen i 10 % etanol ved forsiktig risting på vippebrett i 10 minutter. Fjern etanolen og gjenta prosessen. Dersom det er nødvendig kan gelen ligge i den andre batchen med 10 % etanol i flere timer.
- Fjern etanolen og tilsett akkurat nok 0,7 % salpetersyre til å dekke gelen. La gelen stå på vippebrettet i 6 minutter. Fjern salpetersyren og vask gelen to ganger med destillert vann.
- Tilsett 0,2 % sølvnitrat slik at det dekker over gelen. La gelen stå på vippebrettet i 30 minutter. Vask gelen og karet tre ganger med destillert vann.
- Til 100 ml fremkaller, tilsett 125 µl formaldehyd løsning. Overfør fremkalleren/formaldehyd løsningen til fargekaret og ristes forsiktig på vippebrett og dekk til med aluminiumsfolie for å unngå direkte lys. Når løsningen blir gul eller når det dannes mørkt bunnfall, tilsett ny batch med fremkaller/formaldehyd løsning. Observer gelen under fremkallingen av DNA-båndene. Når den ønskede sensitiviteten er oppnådd, tømmes fremkaller/formaldehyd løsningen ut.
- Tilsett 3 % eddiksyre og rist gelen i 5 minutter på vippebrettet. Fjern eddiksyren og vask gelen med 10 % etanol. Tøm ut og tilsett på nytt 10 % etanol og la gelen ligge i den i 2 minutter.
- Scan gelen inn eller tørk gelen som beskrevet i 2.7.6.

2.7.6. Tørking av polyakrylamidgeler.

Hvis gelen skal oppbevares over lang tid og eventuelt scannes, er det nødvendig å tørke gelen. Det kan være lurt å ta et bilde av gelen før den tørkes.

Prosedyre:

- Den fremkalte gelen overføres til geltørkerløsning hvor den innkuberes i 15-30 min.
- Fukt et stykke cellofan som er stort nok til å brette rundt gelen. Legg gelen på cellofanpapiret og brett det rundt gelen. Pass på å presse ut luftbobler.
- Plasser gelen i geltørkeren. Sett på vakuumpumpe og varme. Gelen skal ligge i 75°C i 1 time.
- Når gelen er ferdig skrus vakuomet av og gelen fjernes fra geltørkeren. Gelen bør nå legges i press for at den skal holde seg flat. Dette er spesielt viktig frem til gelen er avkjølt, men det kan også være en fordel og oppbevare gelen i press.

2.8. Måling av polymeraseaktivitet.

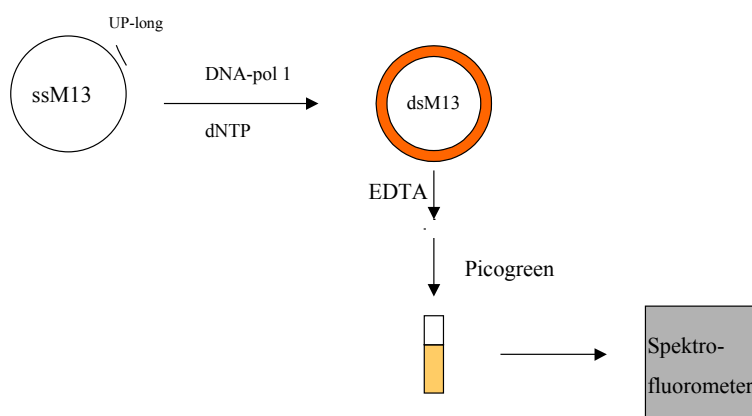
Vanligvis blir DNA polymeraseaktivitet målt ved at radioaktive nukleotider blir inkorporert i DNase-behandlet DNA, såkalt aktivt DNA, etterfulgt av måling av radioaktivitet. I denne oppgaven ble det benyttet en alternativ fremgangsmåte hvor man måler aktiviteten ved hjelp av et fluoriserende stoff. Man benytter det fluoriserende fargestoffet PicoGreen®, som fluoriserer ved binding til dobbeltrådig DNA (Tveit og Kristensen, 2001).

2.8.1. Fluorescensbasert polymeraseaktivitetsassay.

Metoden går ut på at enkelttrådig M13 først blir primet. Deretter blandes primet M13, dNTP og polymerasen sammen. En polymerase aktivitetsbuffer tilsettes også. Denne inneholder blant annet Mg^{2+} som er nødvendig for at DNA-polymerasen skal fungere. Reaksjonen settes så ved ønsket temperatur, her $75^{\circ}C$, i ønsket tid. For å stoppe reaksjonen tilsettes EDTA som binder opp Mg^{2+} -ionene slik at polymerasen blir inaktiv. Deretter settes løsningene på is til fluorescens skal måles.

Når man skal måle fluorescens tilsetter man PicoGreen® fortynnet i TE-buffer, før man måler fluorescensen i et spektrofluorometer. For hver måling blir det også målt en 0-prøve som inneholder alle komponentene utenom polymerasen. Denne målingen blir trukket fra prøvemålingen for å korrigere for eventuelt dobbeltrådig DNA i løsningen. Da det eksisterer et lineært forhold mellom fluorescensutslag og mengde dsDNA, gir det resulterende fluorescensutslaget et mål på syntetisert DNA. Prinsippet vises i figur 2.4.

Polymeraseaktivitetsanalyse Fluorescensbasert



Figur 2.4 Prinsippet for den fluorescensbaserte polymeraseaktivitetsanalysen.

Figuren viser prinsippet for fluorescensaktivitetsanalysen, der en primet ssM13 blir forlenget ved tilstedeværelse av DNA polymerase I, polymerasebuffer og dNTP. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av EDTA, og etter tilsetning av PicoGreen kan fluorescensavlesing i et spektrofluorometer gi et mål på mengde syntetisert dsDNA.

Prosedyre:

- Tillaging av primet M13: 100 μl ssM13, 24 μl UP-long (1 pmol/ μl) og 14 μl 10x Klenow DNA polymerase reaksjonsbuffer blandes. Blandingen kjøres i PCR-maskinen med programmet som kalles exo-anneal. Dette programmet varmer opp til 70°C og blir der i 3 minutter, for så å reduserer temperaturen gradvis til 20°C i løpet av 25 minutter.
- Bland sammen:

10x DNA polymerase aktivitetsbuffer	2.5 μl	
dNTP- miks (2 mM)		2.5 μl
Primet M13 (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1.2 μl	
<u>MilliQ-vann</u>	<u>8.8 μl</u>	
	15 μl	
- Polymeraseaktivitetsløsningen forvarmes på varmeblokken ved den aktuelle temperaturen i 30 sekunder.
- 10 μl enzymløsning med ønsket mengde U/ μl tilsettes reaksjonsblandingen slik at totalvolumet blir på 25 μl .
- Reaksjonen las stå på varmeblokken i ønsket tid.
- Reaksjonen stoppes ved å tilsette 2 μl 0.25 M EDTA og settes på is.
- Tilsett 1 ml TE-buffer med 1.7 μl PicoGreen til løsningen på is og bland godt. La løsningen stå i 2-5 minutter. Alle prøvene må stå like lenge før de måles.
- Da PicoGreen er ømfintlig for lys bør man bruke fargede eppendorfrør.
- Overfør løsningen til en 1 mm kyvette med fire klare sider og avles fluorescensen omgående i et spektrofluorometer der eksitasjonen er 495 nm, og emisjonen avleses ved 520 nm.
- Mål 0-prøven og trekk denne fra resultatet for å få endelig fluorescensutslaget.

2.8.2. Beregning av antall enzymenheter.

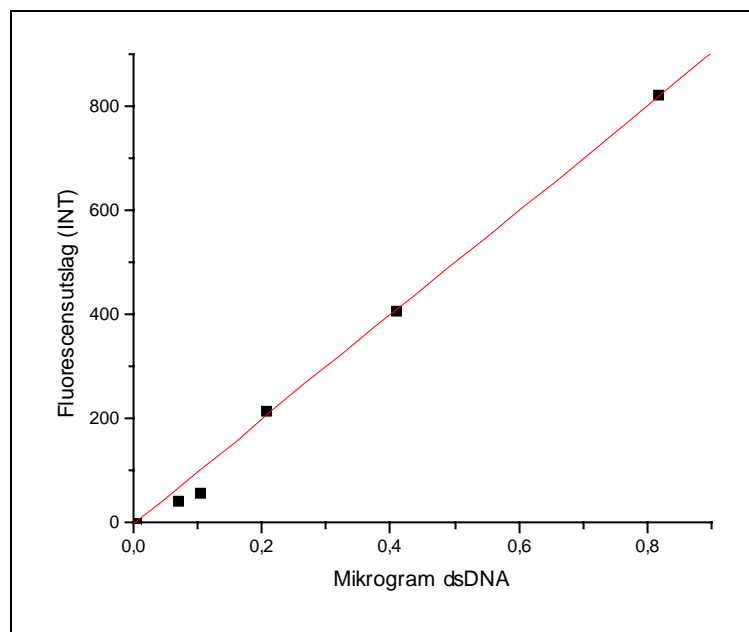
Ut i fra målingene gjort i det fluorescensbaserte aktivitetsassayet, kan man bestemme antall enzymenheter i lysatet. En enzymenhet beregnes som mengden enzym som er nødvendig for å syntetisere 10 nmol dsDNA på 30 min. ved 75°C.

2.8.2.1. Beregning av mengde syntetisert dsDNA.

Beregning av mengde syntetisert dsDNA blir gjort på følgende måte:

- Initialhastigheten til enzymene blir funnet ut fra deres lineære tidskurver, og får benevnningen INT/min.

- Ut fra en standardkurve (fig. 2.5) med forskjellig mengde dsDNA plottet mot INT-utslag, kan man finne mengde dsDNA syntetisert/min (se tabell 3.4).



Figur 2.5: Standardkurve for den fluorescensbaserte polymeraseaktivitetsanalysen.

Forskjellige mengder dsDNA er tilsatt 1.7 μ l PicoGreen i 1 ml TE-buffer, og mengde dsDNA er plottet mot dets fluorescensutslag.

2.8.2.2. Beregning av mengde polymeraseenheter med den fluorescensbaserte polymeraseaktivitetsanalysen.

Når man har funnet mengde dsDNA syntetisert/min, kan man beregne antall polymeraseenheter i løsningen. Det gjøres på følgende måte:

- Beregning av totalt antall mol dNTP/min. som er inkorporert i DNA-molekylet, gjøres ved hjelp av følgende formler:

$$\text{Antall mol} = \frac{\text{Antall gram}}{\text{molekylvekten.}}$$

$$\text{Mol dNTP inkorporert/min} = \frac{\text{Gram syntetisert dsDNA /min} / 2}{324.5 \text{ (molekylvekten til et dNMP).}}$$

- Antall mol dNTP inkorporert/min må så deles på 2 siden den ene DNA-tråden allerede er dannet.
- Beregning av antall enheter som skal til for syntetisering av det beregnede antall mol dNTP/min inkorporert, gjøres på følgende måte:
- Definisjonen på en enhet DNA polymerase er inkorporering av 10 nmol dNTPer i løpet av 30 min, hvilket vil si 0.33 nmol dNTP/min. Ut fra dette kan antall enheter beregnes på følgende måte:

$$\text{Antall enheter (U)} = \frac{\text{nmol dNTP/min}}{0.33 \text{ nmol dNTP/min.}}$$

2.9. Teknikker for å studere RNA.

Mange av teknikkene som er utviklet for å studere DNA molekyler kan tilpasses og benyttes for RNA. Agarose gel elektroforese av RNA er utført etter denaturering av RNA slik at vandringslengden for hvert molekyl er kun avhengig av størrelsen, og er ikke påvirket av intramolekylære basepar som kan dannes i mange RNA molekyler. Denaturanten, vanligvis formaldehyd eller glyoxal, er tilsatt prøven før den er applisert på gelen.

Northern hybridisering refererer til prosedyren hvor en RNA gel er blottet over på en nylon membran og hybridisert til en merket probe. Dette tilsvarer Southern hybridisering og er gjennomført på en lignende måte. Merket RNA molekyl er vanligvis tilberedt ved å kopiere et DNA templat til RNA i nærvær av en merket nukleotid (for eksempel Cy5-dCTP). PCR av RNA molekyl krever en modifisering av det første trinnet i en vanlig reaksjon. *Taq* polymerase kan ikke kopiere et RNA molekyl så det første trinnet blir katalysert av revers transkriptase, som lager en DNA kopi av RNA templatet. Denne DNA kopien er så amplifisert av *Taq* polymerase. Denne teknikken er kalt revers transkriptase-PCR eller RT-PCR. Oppdagelsen av termotabile enzym som lager DNA kopier av både RNA og DNA templat (for eksempel. *Tth* DNA polymerase fra *Thermus thermophilus*) forfremmet muligheten til å utføre RT-PCR i en enkel reaksjon med kun ett enzym. RNA sekvenserings metoder eksisterer, men er vanskelige å gjennomføre og kan anvendes kun på små molekyler. I praksis er sekvensen av RNA molekyler vanligvis oppnådd ved å konvertere RNA til cDNA og sekvenseres som DNA ved kjedeterminerings metoden.

2.9.1. Sekvensering av RNA.

RNA kan sekvenseres med kun en liten modifikasjon av DNA sekvenseringsprosedyrer. RNA som skal sekvenseres er transkribert til komplementær DNA (cDNA) og dette kan igjen sekvenseres på vanlig måte med 4 termineringsløsninger.

Prosedyre: (Analyse av en klon med 4 termineringsreaksjoner).

Buffere, 10x reaksjonsbuffer og termineringsløsninger er beskrevet i materialer kap. 5.3.

- Bland følgende løsninger i et sterilt 0.5 ml PCR-rør:

RNA templat (10-20 μ g/ μ L)	3 μ l
10x FS Reaksjonsbuffer:	2 μ l
Cy5-merket primer (4 μ mol/ μ L)	1 μ l
Enzymløsning, ulike mengder	
MilliQ-vann til 21 μ l	

- Fordel blandingen i alikvoter på 5 μ l i 0.5 ml PCR-rør merket A, C, G og T.
- Tilsett termineringsløsningene til hvert sitt rør. Termineringsløsning A skal tilsettes rør A, termineringsløsning C skal tilsettes rør C, og så videre. Bland godt og spinn raskt ned.

- Sett rørene i en PCR-maskin, som utfører følgende sykluser:

Trinn 1: 95°C i 2 min
 Trinn 2: 95°C i 30 sek
 Trinn 3: 50°C i 30 sek
 Trinn 4: 72°C i 40 sek
 Trinn 5: 29 sykluser av trinn 2-4
 Trinn 6: 72°C i 10 min
 Trinn 7: 4°C ∞
 Trinn 8: slutt.

Stopp reaksjonene ved å tilsette 4 µl stoppløsning, og oppbevar prøvene ved 4°C, eller ved -20°C for lagring over lengre tid. Analyser prøvene på en automatisk sekvenseringsmaskin som beskrevet i 2.3.

2.10. Ikke-radioaktiv merking og deteksjon

Det er ønskelig å unngå bruk av radioaktiv stråling i et laboratorium. Ikke-radioaktiv merking involverer systemer hvor det benyttes ikke-radioaktive prober. Selv om disse systemene ble utviklet ganske nylig blir de stadig mer populære og det oppdages stadig flere områder de kan benyttes. Det finnes to typer ikke-radioaktive metoder for merking:

- **Direkte ikke-isotopisk merking**, hvor en nukleotid som inneholder en merking som vil bli detektert er inkorporert. Slike systemer involverer ofte inkorporering av modifiserte nukleotid som inneholder en fluorofor, en kjemisk gruppe som kan fluorisere når de er utsatt for lys med en bestemt bølgelengde.(fluorescensmerking).
- **Indirekte ikke-isotopisk merking**, omhandler vanligvis den kjemiske koblingen av et modifisert reportertermolekyl til en nukleotid substans. Etter inkorporering i DNA, kan reporter gruppene bindes spesifikt ved et affinitetsmolekyl, et protein eller en annen ligand som har høy affinitet til reportertermolekylet. Koblet til det sistnevnte er et markørmolekyl eller en gruppe som kan detekteres i et passende assay. Reportertermolekylene på modifiserte nukleotider må stikke tilstrekkelig langt nok bort fra nukleinsyrens ryggrad for å lettgjøre deres deteksjon ved affinitetsmolekyl. Det trengs så et langt mellomstykke av karbonatom for å skille nukleotidet fra reporter gruppen.

2.10.1. Fluorescensmerking og deteksjon.

Fluorescensmerking av nukleinsyrer ble utviklet på 80-tallet og har vist seg å være ekstremt verdifullt med mange forskjellige anvendelser. Fluorescensmerking gjør det mulig å analysere flere DNA-fragmenter i samme prøve ved å bruke ulike farger, som i tillegg til størrelsesforskjellen kan skille DNA-fragmenter fra hverandre. Fluorescensmerkingen kan brukes ved direkte merking av nukleinsyrer ved å inkorporere en modifisert nukleotid (for eksempel dUTP eller dCTP) som inneholder en riktig fluorofor, en kjemisk gruppe som fluoriserer når det utsettes for en bestemt bølgelengde av lys. Populære fluoroforer som er benyttet i direkte merking inkluderer fluorescein, en svak grønn fluorescens farge, rhodamine, en rød fluorescens farge og amino metyl coumarin, en blå fluorescens farge. En annen populær farge er cyanin (Cy3-indokarbocyanin og Cy5-indodikarbocyanin).

2.10.1.1. Cy5-dCTP merking.

Cyanin-fargestoffer farger er nyttige for fluorescensmerking av biologiske komponenter. Disse fargene er vesentlig mer fotostabile og lysintensive enn de fleste andre fluorokromer. De er både høyst fluorescerende og vannløslige, skaffer signifikante fordeler over allerede eksisterende fluorescensmerking og de er ideell for ikke-radioaktiv merking av DNA og RNA prober, oligonukleotider og andre nukleinsyrer.

Cy5-merkede dCTP fluorescens befinner seg i den røde området av spekteret. Blandinger som er merket med Cy5 er ideelle for eksperimenter hvor bakgrunnen av cellulære komponenter (som for eksempel pigmenter) er et problem. Cy5 fargestoffet er et ideelt fargestoff i analyser med flere farger hvor deteksjonsutstyr er benyttet.

Prosedyre:

Buffere, 10x reaksjonsbuffer og termineringsløsninger er beskrevet i materialer kap. 5.3.

- Bland følgende løsninger i et sterilt 0.5 ml PCR-rør:

RNA-templat (10 μ g/ μ L)	3 μ l
Random heksamer primer (500ng)	1 μ l
MilliQ-vann til 15 μ l	

- Innkuber blandingen ved 65°C i 10 minutter for denaturering av RNA. Sett så løsningen på is i 2 minutter.
- Tilsett så 3 μ l av 1mM Cy5-dCTP
- Bland så sammen revers transkripsjonsmiksen i et separat rør før det tilsettes i reaksjonsblandingen:

0,1M DTT	3 μ l
10X FS-buffer	6 μ l
Lav dCTP-dNTP miks	0,6 μ l
<i>Tth</i> polymerase	2 μ l

- Innkuber den komplette blandingen ved romtemperatur i 10 minutter.
- Innkuber så ved 72°C i 110 minutter. Settes deretter på is.
- For å fjerne overskuddet av nukleotider som ikke er inkorporert, tilsettes 2M NH₄OAc og felles ut med 2 ganger volumet med 100 % iskald etanol.
- Prøven vaskes flere ganger med 70 % iskald etanol, tørkes og løses i passende volum med for eksempel MQ-vann.
- Mål fluorescensen ved å applisere på en ALFExpress gel. Benytt fragmentanalyse etter endt kjøring av gelen.

3. RESULTATER.

Målet med denne hovedoppgaven var å innføre en mutasjon i genet for DNA polymerase I fra bakterien *Thermus thermophilus* og teste det muterte enzymet i sekvenseringsreaksjoner og PCR med både DNA og RNA som templat. Mutasjonen ble innført i kodonet for aminosyre 662, hvor arginin ble byttet ut med asparginsyre, i genet for *Tth* DNA polymerase I hvor mutasjonen F669Y alt var innført (Rønneberg, J.A. 1999). Andre har innført tilstedeværende mutasjoner i *Taq* polymerase, (Li, Y. *et. al*, 1999), og vist at enzymet inkorporerer merkede dideoksynukleotider med jevnere hastighet for alle de fire dideoksynukleotidene i en voksende DNA-kjede, noe som er en viktig egenskap i DNA-sekvensering.

I denne oppgaven blir DNA polymerasen I som inneholder R662D mutasjonen kalt for *Tth*RDFY og ”den native” F669Y for *Tth*FY og tilsvarende plasmid som inneholder genet for polymerase for *pTth*RDFY og *pTth*FY.

Det eksperimentelle arbeidet besto av 5 hoveddeler:

1. Innføring av RD-mutasjonen i villtypen (*pTth*WT) og den ”native” DNA polymerase I (*pTth*FY) ved hjelp av setestyrte mutagenese. Mutagenesen ble utført ved hjelp av QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene.
2. Ekspresjon av villtype (WT), nativ (FY) og mutert (RDFY og RDWT) *Tth* polymerase I i *E.coli*, og fremstilling av lysater med eksogen polymeraseaktivitet fra bakterieceller transfektert med *pTrc99A-Tth*WT, *pTrc99A-Tth*FY, *pTrc99A-Tth* RDWT og *pTrc99A-Tth* RDFY.
3. Rensing av WT, FY, RDWT og RDFY *Tth* polymerase I. Karakterisering av enzymer foretas tryggest med mest mulig rene preparater av enzymet. Enzymene fra forrige punkt skulle ha blitt rensed ved bruk av ionebytterkromatografi, eller eventuelt affinitetskromatografi på Blue Sepharose i instituttets nye Akta-system. Da ting ikke gikk helt som det skulle i de to foregående punktene ble det kun tid til å gjennomføre en felling av DNA med streptomycinsulfat.
4. Anvendelse av streptomycinsulfatfelt rålysat av WT, FY, RDWT og RDFY *Tth* polymerase I i PCR og DNA-sekvensering. RDFY og FY *Tth* DNA polymerase ble også testet på totalt RNA som templat. Enzymene testes ut på ALF Express-systemet med Cy5-merkede primere.
5. Merking av totalt RNA ved Cy5-dCTP og fjerning av overskudd Cy5-dCTP av for så å teste inkorporeringen av fluorescensmerket nukleotid på en ALF Express systemet og fragmentanalyse. Primeren som ble benyttet i denne reaksjonen var en ”random heksamer” primer. Det ble dessverre ikke satt av nok tid til å optimalisere dette forsøket og resultatene er derfor noe usikre.

3.1. Mutagenese av *Tth* polymerase I.

3.1.1. Oppdyrking av klonene *pTthFY* og *pTthWT*.

Genet til *Tth* DNA polymerase I var ved oppgavens begynnelse allerede klonet og satt inn i en ekspresjonsvektor, pTrec99A og mutasjonen F669Y var innført. Dette arbeidet ble utført av tidligere hovedfagsstudent, Jo Anders Rønneberg, 1999. For å fortsette arbeidet med *Tth* polymerase I, ble denne klonen, *pTthFY*, og villtypeklonen, *pTthWT*, transformert inn i kompetente *E.coli* DH5 α -celler og platet ut på LB agar-skåler tilsatt ampicillin, for så å dyrke opp enkeltkolonier i 5 ml LB-medium med ampicillin. Deretter ble det rensset plasmid fra bakteriekulturene, og plasmidkonsentrasjonen bestemt.

Konsentrasjonen ble bestemt til 20 ng/ μ l for *pTthFY* og 22 ng/ μ l for *pTthWT*. Som markør ble det brukt λ -DNA kuttet med *HindIII* og *EcoRI*.



Brønn 1: Markør, 5 μ l
Brønn 2: Markør, 2 μ l
Brønn 3: Markør, 1 μ l
Brønn 4: *pTthWT*, 1 μ l
Brønn 5: *pTthFY*, 1 μ l

Figur 3.1: Bilde av rensset plasmid etter oppdyrking av klonene *pTthFY* og *pTthWT*.

3.1.2. Mutagenese.

Det ble kjørt mutagenese på 3 ulike konsentrasjoner av plasmidet, henholdsvis 10, 20 og 30 ng DNA plasmid *pTthFY* og 22 ng av *pTthWT*. Disse ble kalt henholdsvis 1, 2, 3 og 4 for RDFY polymerasen og 5 for RDWT polymerasen. Hver reaksjon ble tilsatt reaksjonsbuffer, de to mutagenese-primere, dNTP-mix og dH₂O til 50 μ l. Deretter ble 1 μ l *Pfu* Turbo DNA polymerase tilsatt og reaksjonsblandingen ble kjørt 18 sykluser, i PCR-maskinen slik at de to primere blir forlenget og mutasjonen innført.

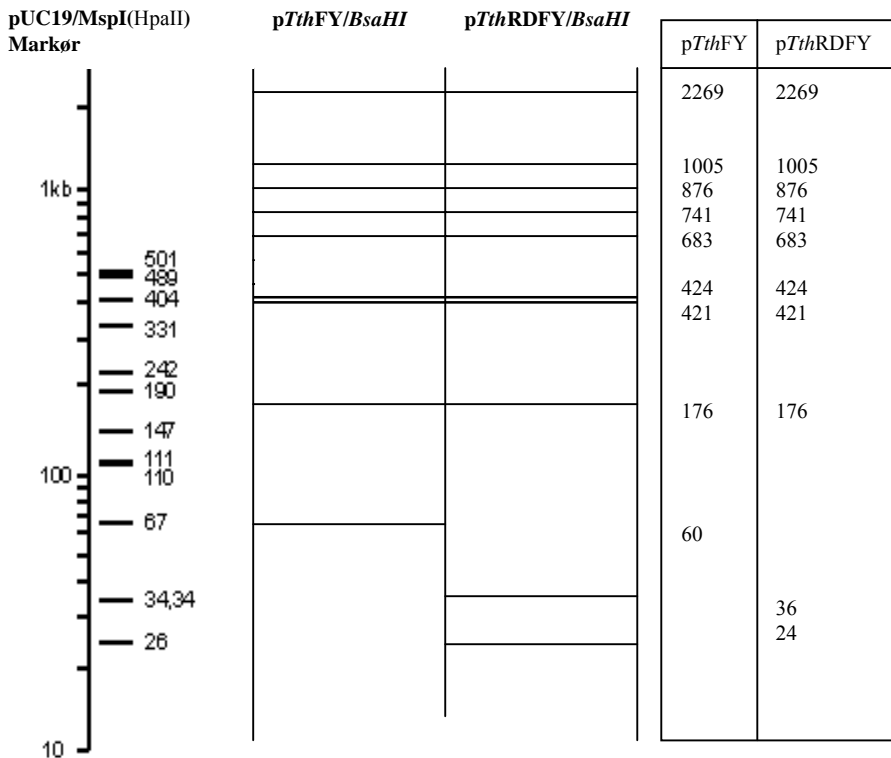
Etter endt PCR-amplifisering ble reaksjonene tilsatt 1 μ l *DpnI* restriksjonsenzym og innkubert i 1 time. Fra hver av reaksjonene ble det tatt ut 5 μ l prøve etter kutting med *DpnI* for fraksjonering ved elektroforese i en agarosegel for å se om det hadde blitt noe PCR produkt (se figur 3.2). Som markør ble det brukt λ -DNA kuttet med *HindIII* og *EcoRI*. Deretter ble 1 μ l av restriksjonsmiksen transformert inn i XL-10-Gold[®] ultrakompetente celler som fulgte med kittet. Etter oppdyrking på skåler var det god vekst i alle skålene. Det ble dyrket opp 3 kolonier fra hver av skålene i LB-medium tilsatt ampicillin. Det ble så rensset plasmid fra disse bakteriekulturene. Det ble i tillegg laget frysekulturer av prøvene.



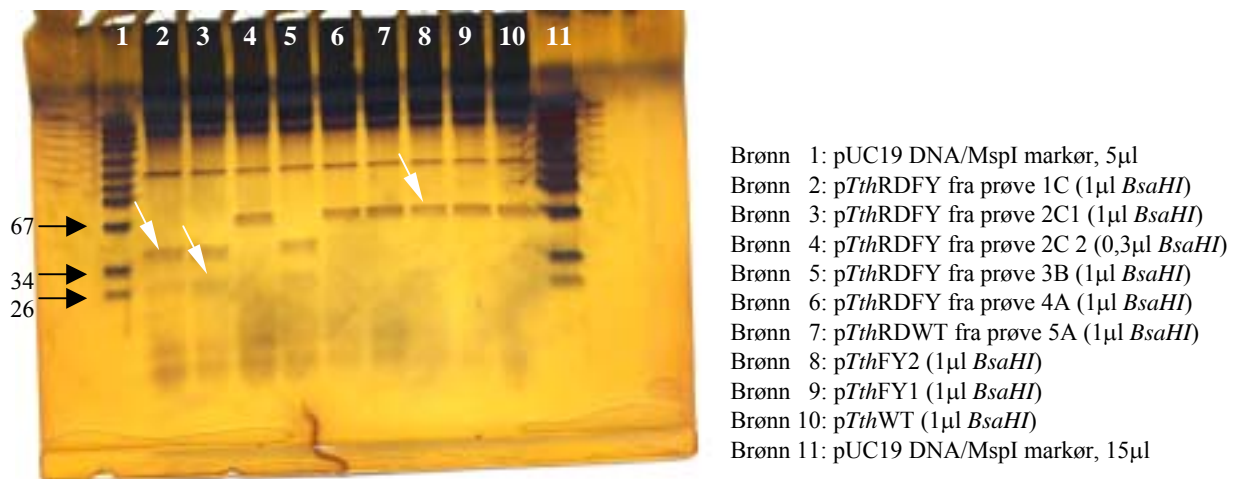
- Brønn 1: Prøve 1, p*Tth*RDFY, 5 µl
- Brønn 2: Prøve 2, p*Tth*RDFY, 5 µl
- Brønn 3: Prøve 3, p*Tth*RDFY, 5 µl
- Brønn 4: Prøve 4, p*Tth*RDFY, 5 µl
- Brønn 5: Prøve 5, p*Tth*RDWT, 5 µl
- Brønn 6: p*Tth*FY1, 1 µl
- Brønn 7: p*Tth*WT, 1 µl
- Brønn 8: p*Tth*FY2, 1 µl
- Brønn 9: Markør, λ-DNA kuttet med *HindIII* og *EcoRI*, 1 µl
- Brønn 10: Markør, λ-DNA kuttet med *HindIII* og *EcoRI*, 5 µl

Figur 3.2: Bilde viser resultatet etter PCR for å undersøke om det er blitt amplifisert opp noe plasmid under mutagenesen.

For å sjekke om mutasjonen var innført ble det kjørt restriksjonskutting med *BsaHI*. Under mutagenesen ble det valgt en primer som innfører et godt D-kodon, GAC, samtidig som et nærliggende A-kodon ble endret fra GCG til GCC. Dette innfører et *BsaHI*-sete og fjerner et *GdiII*-sete. Kutting med *BsaHI* vil gi et bånd på 60 nukleotider for p*Tth*WT og p*Tth*FY, mens p*Tth*RDFY vil få to bånd på henholdsvis 24 og 36 nukleotider. Figur 3.3 viser det teoretiske mønsteret som kutting av p*Tth* med restriksjonsenzymet *BsaHI* vil gi og figur 3.4 viser resultatet av kuttingen.



Figur 3.3: Teoretisk beskrivelse av restriksjonsanalyse ved kutting av p*Tth* med *BsaHI*.



Figur 3.4: Restriksjonsanalyse av plasmidene, kuttet med *Bsa*HI. De sorte pilene indikerer størrelsen på fragmentene til standarden, mens de hvite viser fragmentene på henholdsvis 24, 36 og 60 nukleotider.

3.2. Ekspresjon av *Tth* DNA polymerase I varianter.

3.2.1. Ekspresjon og produksjon av rålysat.

For å uttrykke *Tth* DNA polymerase I, ble det benyttet en metode som før har blitt brukt på *Taq* polymerase I med gode resultater. (Engelke, D.R., et al. 1990, Pluthero, F.G., 1993, Urvi, J., et. al. 1995), med det unntak at det i denne oppgaven ble benyttet XL10-Gold[®] ultrakompetente celler ved ekspresjon av de muterte variantene av *Tth* DNA polymerase I, og kompetente *E.coli* DH5α-celler ved ekspresjon av *Tth*WT, og *Tth*FY DNA polymerase I. Først ble en proteinene produsert i liten skala som beskrevet i 2.4.2 for å kontrollere at *Tth*RDFY og *Tth*FY gav et aktivt og varmestabilt produkt. Varmebehandlingstrinnet ble utført ved 75°C. Aktiviteten i rålysatet av de ulike cellekulturene ble målt i et fluorescensbasert polymeraseassay og er summert opp i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Oversikt over enzymaktiviteten før og etter varmebehandling for et rålysat isolert fra 1 ml kultur under ekspresjonen av *Tth*RDFY og *Tth*FY. Aktiviteten er oppgitt i U/µl.

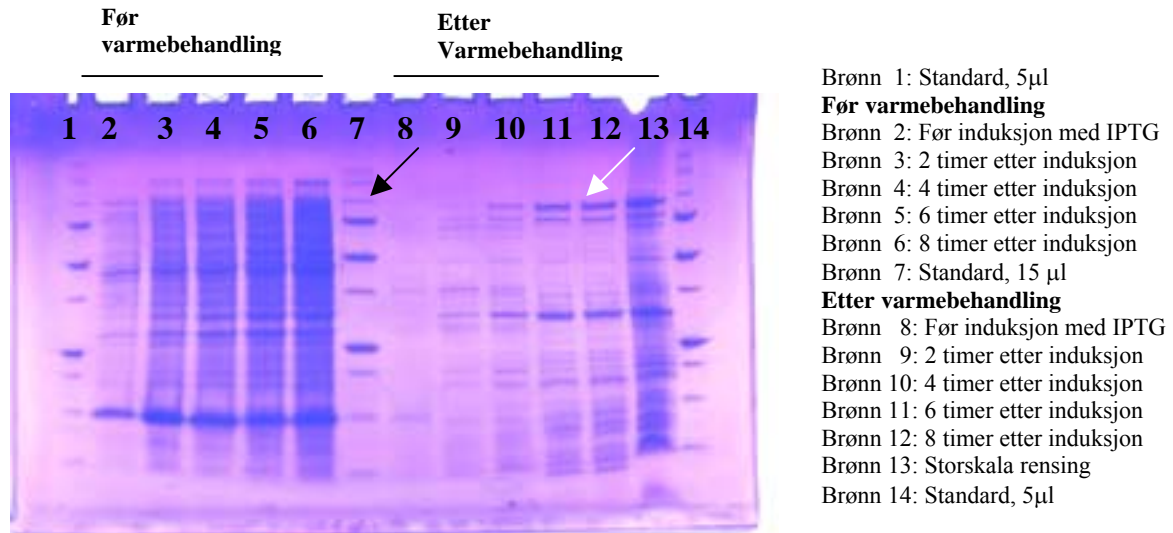
Variant	Før varmebehandling	Etter Varmebehandling
<i>Tth</i> RDFY	3,27	4,53
<i>Tth</i> FY	0,19	4,86

Resultatet viste høyere aktivitet for parallellene som ble varmebehandlet ved 75°C før sentrifugering av den lyserte cellekulturen enn fra parallellene som ble sentrifugert direkte etter lysering. Denne økningen fikk man ikke dersom varmebehandlingen ble utført etter sentrifugeringen av den lyserte cellekulturen, noe som kan tyde på en ineffektiv lysering. Miniekspressjonen bekreftet at *Tth*RDFY og *Tth*FY gav et aktivt genprodukt som tålte innkubering ved 75°C. Det ble derfor startet ytterligere ekspresjoner for å optimalisere induksjonstiden.

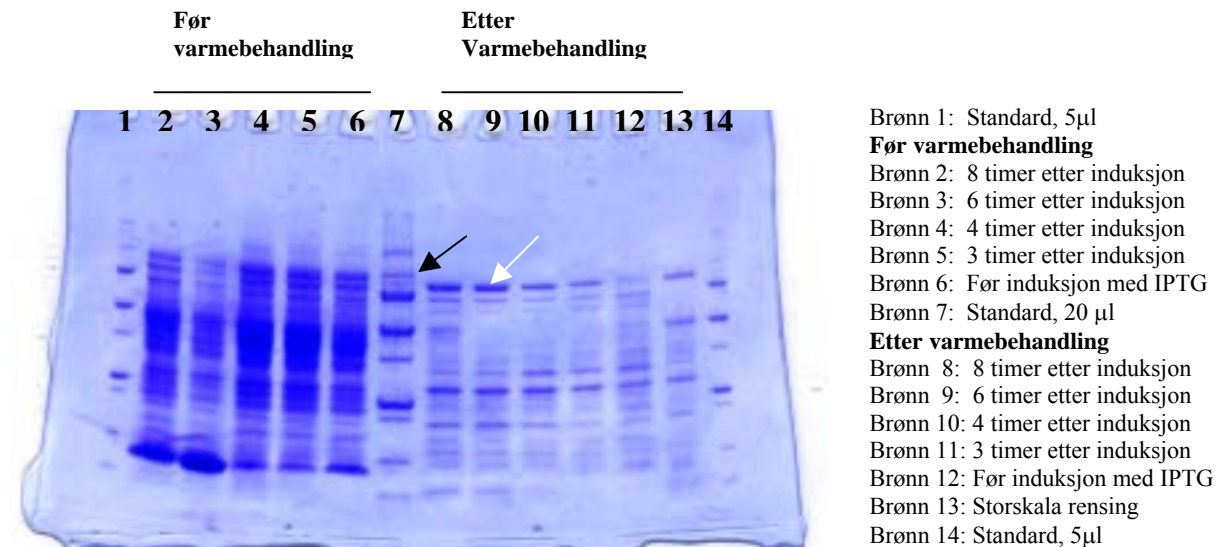
Ved ekspresjon av *Tth*RDFY og *Tth*RDWT DNA polymerase I ble det benyttet XL10-Gold[®] ultrakompetente celler som fulgte med mutagenesekitet fra Stratagene og *E.coli* DH5α-celler for *Tth*FY og *Tth*WT. Kulturen ble dyrket opp til OD 0.2, og deretter induisert med IPTG. Før induksjonen ble det tatt ut to nullprøver, og etter induksjonen ble det tatt to uttak etter 2, 4, 6,

8 og 10 timer. Den ene prøven ble varmebehandlingen utført, men for den andre prøven ble varmebehandlingstrinnet utelatt.

Lysatene ble så kjørt i en denaturerende polyakrylamidgel, SDS-PAGE. Som markør ble det benyttet Precision Plus Protein™ Standards fra BioRad. (Figur 3.5 og 3.6).



Figur 3.5: SDS-PAGE av de fremstilte rålysaten til det muterte proteinet, *TthRDFY* fra prøve 1C. Farget ved Coomasse Brilliant blue. Den sorte pilen viser markørbåndet som har en størrelse på 100 kDa, mens den hvite pilen viser båndet for DNA polymerasen på omtrent 94 kDa 8 timer etter induksjon.



Figur 3.6: SDS-PAGE av de fremstilte rålysaten for det native proteinet, *TthFY*. Farget ved Coomasse Brilliant blue. Den sorte pilen viser markørbåndet som har en størrelse på 100 kDa, mens den hvite pilen viser båndet for DNA polymerasen på omtrent 94 kDa 6 timer etter induksjon.

Figurene 3.5 og 3.6 viser at det et par timer etter induksjon med IPTG begynner å vises et bånd rundt 90-100 kDa som blir sterkere med induksjonstiden. Båndene kommer klarest frem på uttakene som er varmebehandlet.

3.3. Fluorescensbasert DNA polymeraseaktivitetsassay.

For å få litt mer informasjon om hvordan aktiviteten til de forskjellige variantene av DNA polymerasene var og for å få bekreftelse på at mutasjonen i *TthRDFY* var ”aktiv”, ble det foretatt et fluorescensbasert polymeraseassay. Det som i hovedsak er studert i denne hovedoppgaven er forholdene mellom *TthRDFY* og *pTthFY*, men det er også foretatt tester av *TthWT*, som blant annet tidskurve med forskjellige konsentrasjoner. I tillegg er det målt aktivitet på streptomycinsulfatrensede prøver av *TthRDFY*, *TthFY*, *TthRDWT* og *TthWT* som er diskutert i punkt 3.4.

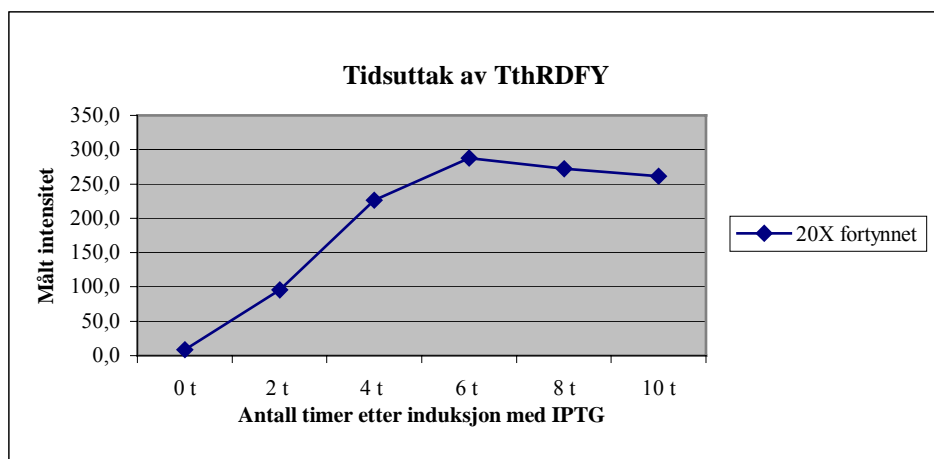
3.3.1. Aktivitetsanalyse for *TthRDFY* polymerasen.

Det første assayet som ble gjennomført var å finne ut hvilket lysat som inneholdt maksimal aktivitet etter induksjonen med IPTG.

Resultatene i tabell 3.2 viser at det var i uttaket 6 timer etter induksjon med IPTG det var mest enzymaktivitet. Dette lysatet hadde en INT-middelverdi på 288,1, noe som tilsvarer antall enzymenheter lik 5,4 U/ μ l. Denne ble da benyttet i videre analyser. Målingene ble gjort med 20X fortynning av rålysatet og en reaksjonstid på 3 minutter.

Tabell 3.2: Oversikt over målte INT-verdier for den muterte polymerasen

	INT	INT	INT	INT, middelverdi
Uttak 0 t.	11,5	6,9	6,6	8,3
Uttak 2 t.	62,8	110,9	112,8	95,5
Uttak 4 t.	217,3	248,8	212,5	226,2
Uttak 6 t.	270,9	281,1	312,4	288,1
Uttak 8 t.	254,8	255,3	307,4	272,5
Uttak 10 t.	250,9	264,4	269,7	261,7



Figur 3.6: Kurve viser aktiviteten i de ulike uttakene etter induksjon med IPTG av *TthRDFY* polymerasen.

Da det var fastslått at det var mest aktivitet i det produserte lysatet etter 6 timer, ble det kjørt en ny ekspresjon for å lage mer lysat. Hele kulturen ble da høstet inn etter 6 timer og det ble laget lysat. Det lysatet ble rensed videre med felling av DNA ved hjelp av streptomycinsulfat. Videre rensing ble av tidsmessige årsaker utelukket. Det neste som ble gjort var å lage tidskurver med forskjellige konsentrasjoner av rålysatet, som beskrevet i metoder under punkt 2.8. Dette gjøres for å se hvordan konsentrasjone av enzymer spiller inn på aktiviteten. Ved

disse tidskurvene kan det lineære området for aktivitet bestemmes, slik at man kan benytte dette til å beregne antall enzymenheter. Målingene ble gjort på 20X, 50X og 100X fortyning av rålysatet og opp til 30 minutter.

Tabell 3.3: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*RDFY polymerasen ved 20X fortyning.

Tid	30 sek	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	123,1	122,8	171,3	285,7	710,9	>1000,0	>1000,0	>1000,0	>1000,0
INT	139,9	165,5	200,2	275,6	837,7	>1000,0	>1000,0	>1000,0	>1000,0
INT	68,2	85,0	115,0	243,4	435,6	>1000,0	>1000,0	>1000,0	>1000,0
INT	110,8	87,4	166,3	191,3	502,8	>1000,0	>1000,0	>1000,0	>1000,0
INT, middelverdi	110,5	115,2	163,2	249,0	621,8	>1000,0	>1000,0	>1000,0	>1000,0

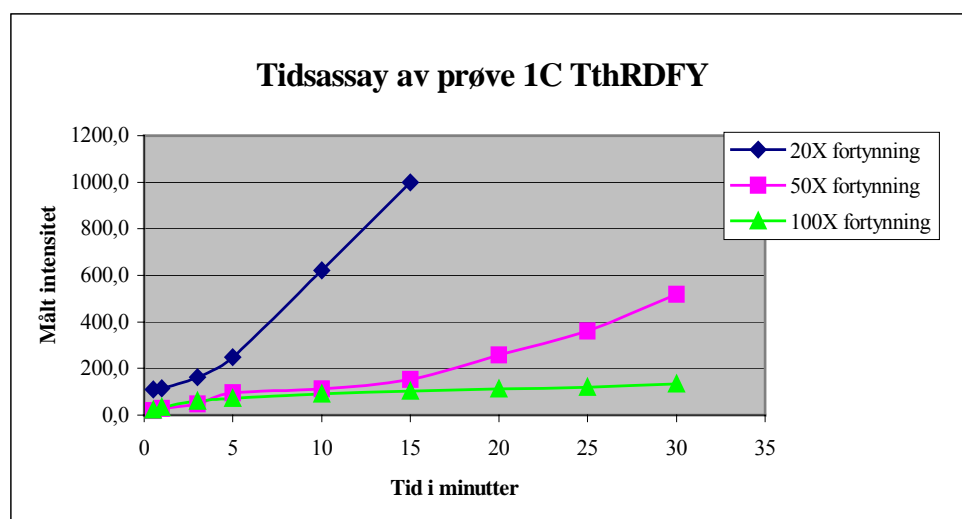
Tabell 3.4: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*RDFY polymerasen ved 50X fortyning.

Tid	30 sek	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	18,1	25,6	55,3	91,5	105,6	145,3	241,1	249,6	476,5
INT	18,6	29,6	58,9	99,9	116,9	159,5	275,4	415,3	545,0
INT	18,2	27,5	26,4	96,4	118,0	155,5	254,5	416,2	534,1
INT, middelverdi	18,3	27,57	46,87	95,93	113,5	153,4	257	360,37	518,5

Tabell 3.5: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*RDFY polymerasen ved 100X fortyning.

Tid	30 sek	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	14,2	24,3	41,0	58,0	78,5	83,3	100,3	107,8	127,6
INT	22,3	33,1	75,2	75,8	96,5	107,7	112,1	122,6	130,7
INT	26,2	41,3	61,1	80,3	97,9	116,9	122,2	126,7	141,8
INT, middelverdi	20,9	32,9	59,1	71,37	90,97	102,6	111,5	119,03	133,4

Figur 3.7 under viser at det for 100X fortyning er polymeraseaktiviteten tilnærmet lineær i hele inkubasjonsområdet, mens det for 50X og 20X fortyningene bare er lineær frem til omtrent 5 minutters inkubering. Antall enzymenheter i det varmebehandlede rålysatet ble derfor beregnet utfra aktivitetsmålingene ved 3 minutter, som er omtrent midt i det lineære området.



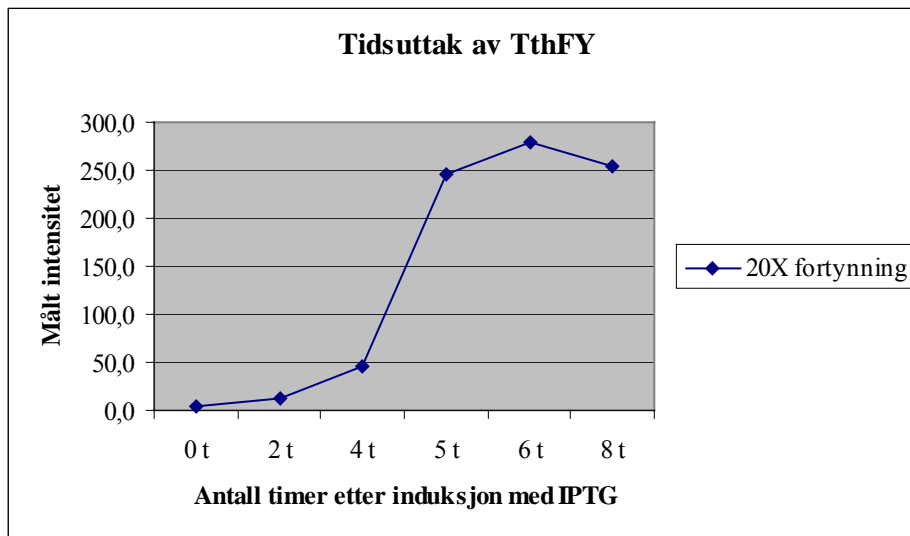
Figur 3.7: Tidskurve for de forskjellige fortyningene av *Tth*RDFY.

3.3.2. Aktivitetsanalyse for *TthFY* polymerasen.

Det ble også for den native polymerasen, gjort en analyse etter fremstilling av grovlysat for å finne ut hvilket lysat som inneholdt mest enzymaktivitet. Dette viste seg å være 6 timer etter induksjon med IPTG. Dette lysatet hadde en INT-middelverdi på 279,2 på uttaket noe som tilsvarer antall enzymenheter lik 5,2 U/ μ l. Målingene ble gjort med 20X fortyning av rålysat og 3 minutter reaksjonstid.

Tabell 3.6: Oversikt over målte INT-verdier for den native polymerasen

	INT	INT	INT, middelverdi
Uttak 0 t.	3,7	2,6	3,2
Uttak 2 t.	14,0	11,0	12,5
Uttak 4 t.	50,8	40,1	45,5
Uttak 5 t.	256,7	233,2	245,0
Uttak 6 t.	279,2	279,2	279,2
Uttak 8 t.	258,7	248,6	253,7



Figur 3.8: Kurve viser aktiviteten i de ulike uttakene som ble tatt etter induksjon med IPTG av den native polymerasen.

Også for *TthFY* polymerasen ble det laget tidskurver med forskjellige konsentrasjoner av rålysatet, som beskrevet i metoder under punkt 2.8 for å se hvordan konsentrasjone av enzymet spiller inn på aktiviteten. Ved disse tidskurvene kan det lineære området for aktivitet bestemmes, slik at man kan benytte dette til å beregne antall enzymenheter. Målingene ble gjort ved 10X, 20X og 50X fortyning av rålysatet og opp til 30 minutter.

Tabell 3.7: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *TthFY* polymerasen ved 10X fortyning.

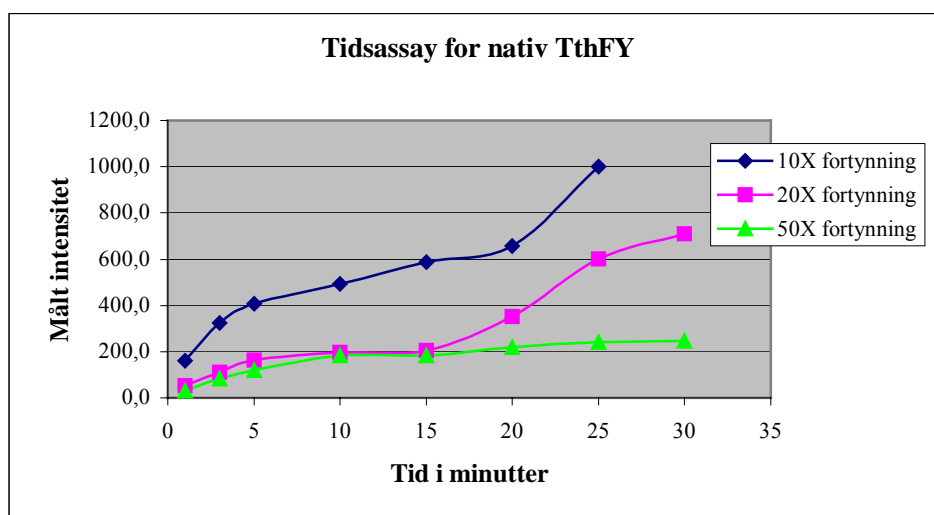
Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	174,8	338,4	449,9	509,0	609,3	685,8	>1000,0	>1000,0
INT	153,1	339,6	400,6	511,6	576,9	665,4	>1000,0	>1000,0
INT	156,3	298,3	374,7	461,2	579,8	622,0	>1000,0	>1000,0
INT, middelverdi	161,4	325,4	408,4	493,9	588,7	657,7	>1000,0	>1000,0

Tabell 3.8: Målte INT-verdier ved lagning av tidskurve for *TthFY* polymerasen ved 20X fortynning.

Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	62,1	109,4	187,2	221,6	218,4	351,8	587,1	691,6
INT	55,3	110,8	154	190,4	218,4	366,7	712,3	799,8
INT	44,3	112,1	145,9	177,9	182,0	333,9	504,8	637,1
INT, middelverdi	53,9	110,8	162,4	196,6	206,3	350,8	601,4	709,5

Tabell 3.9: Målte INT-verdier ved lagning av tidskurve for *TthFY* polymerasen ved 50X fortynning.

Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	24,7	70,7	107,0	149,0	183,6	200,5	242,2	235,8
INT	31,9	91,1	129,3	214,5	173,4	224,9	227,9	230,4
INT	31,9	87,1	124,0	186,2	188,5	230,6	255,7	275,1
INT, middelverdi	29,5	83,0	120,1	183,2	181,8	218,7	241,9	247,1



Figur 3.9: Tidskurve for *TthFY* polymerasen ved forskjellige konsentrasjoner.

Figur 3.9 viser at det for 50X fortynning er polymeraseaktiviteten tilnærmet lineær i hele inkubasjonsområdet, mens det for 20X fortynningene er lineær i området frem til omtrent 15 minutters inkubering. For 10X fortynning av rålysatet er det lineære området frem til 5 minutters inkubering. Antall enzymenheter i det varmebehandlede rålysatet ble derfor beregnet utfra aktivitetsmålingene ved 3 minutter, som er omtrent midt i det lineære området.

3.3.3. Aktivitetsanalyse for *Tth*WT polymerasen.

For *Tth*WT polymerasen ble det også laget tidskurver med forskjellige konsentrasjoner av rålysatet. Ved disse tidskurvene kan det lineære området for aktivitet bestemmes, slik at man kan benytte dette til å beregne antall enzymenheter. Målingene ved 20X, 50X og 100X fortyning av enzymløsningen ble gjort opp til 30 minutter.

Tabell 3.10: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*WT polymerasen ved 20X fortyning.

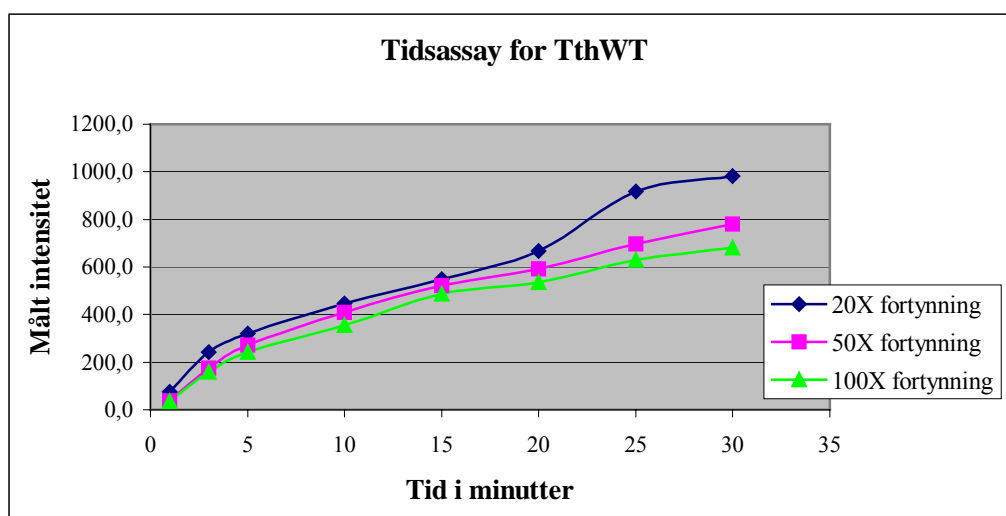
Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	57,4	212,5	318,5	450,7	542,6	680,8	1000,0	1000,0
INT	79,4	259,4	319,8	452,2	572,5	665,4	944,0	1000,0
INT	88,7	255,5	321,4	436,6	528,7	655,7	808,5	944,4
INT, middelverdi	75,2	242,5	319,9	446,5	547,9	667,3	917,5	981,5

Tabell 3.11: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*WT polymerasen ved 50X fortyning.

Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	20,0	135,3	238,9	362,3	517,3	571,9	660,9	755,3
INT	53,2	189,9	297,0	434,4	527,3	609,9	744,3	792,4
INT	41,1	200,4	277,7	426,2	519,2	596,0	688,4	793,8
INT, middelverdi	38,1	175,2	271,2	407,6	521,3	592,6	697,9	780,5

Tabell 3.12: Målte INT-verdier ved laging av tidskurve for *Tth*WT polymerasen ved 100X fortyning.

Tid	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
INT	17,1	125	205,0	310,5	481,1	524,3	592,5	655,3
INT	50,7	173,9	270,9	376,1	479,7	545,2	660,1	692,4
INT	37,9	178,5	252,7	379,8	497,1	535,7	640,2	693,8
INT, middelverdi	35,2	159,1	242,9	355,5	486,0	535,1	630,9	680,5



Figur 3.10: Tidskurve for *Tth*WT polymerasen ved forskjellige konsentrasjoner.

Figur 3.10 viser at det for 100X og 50X fortynning er polymeraseaktiviteten tilnærmet lineær i hele inkubasjonsområdet, mens det for 20X fortynningene er lineær i området frem til omtrent 20 minutters inkubering. Antall enzymenheter i det varmebehandlede rålysatet ble beregnet utfra aktivitetsmålingene ved 3 minutter, som er innenfor det lineære området.

3.3.4. Varmebehandlet og ikke varmebehandlet rålysat.

For å se om varmetrinnet under fremstillingen av rålysat hadde noe innvirkning på aktiviteten, ble det kjørt polymeraseaktivitetsassay på *pTthFY* og *pTthRDFY* fra 1C og enzymenheter beregnet som beskrevet under punkt 2.8. Målingene er gjort ved 20X fortynning av rålysat og 3 minutters reaksjonstid.

Figur 3.13: Varmebehandlet og ikke varmebehandlet polymeraser.

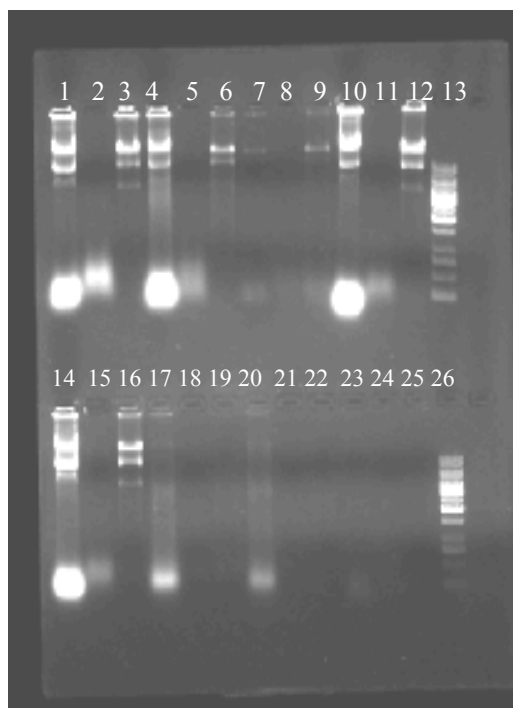
Prøve	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gj.snitt	U/ μ l
<i>TthFY</i> Ikke varmebehandlet	12,7	7,3	10,3	10,1	0,19
<i>TthFY</i> Varmebehandlet	259,5	228,2	292,4	260,0	4,86
<i>TthRDFY</i> fra 1C Ikke varmebehandlet	165,3	155,3	204,0	174,9	3,27
<i>TthRDFY</i> fra 1C Varmebehandlet	243,9	242,0	241,5	242,5	4,53

3.4. Rensing av polymerase-variantene.

Før de forskjellige polymerasene kunne sammenlignes i sekvensering og PCR, måtte de renses for at karakteriseringen skulle bli best mulig. Her ble kun ett rensetrinn gjennomført på grunn av mange feilslåtte, tidkrevende runder med både mutagenese for å få inn mutasjonen, restriksjonsanalyse for å få bekreftet om mutasjonene var tilstede og ekspresjoner som ikke gav aktivitet. Først når QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kitet ble prøvd kom resultatene slik at videre analyser var mulig.

3.4.1 Fjerning av DNA ved hjelp av streptomycinsulfat

Som beskrevet i punkt 2.5.1.1 ble lysatet tilsatt 5% streptomycinsulfat for å fjerne DNA. For å se om det var DNA tilstede i prøvene før, og etter rensing med streptomycinsulfat, ble prøvene applisert på en 0,8% agarosegel.



- Brønn 1: Rålysat, prøve 1C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 2: Strept rensset, prøve 1C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 3: Bunnfall, prøve 1C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 4: Rålysat, prøve 2C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 5: Strept rensset, prøve 2C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 6: Bunnfall, prøve 2C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 7: Rålysat, prøve 3B (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 8: Strept rensset, prøve 3B (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 9: Bunnfall, prøve 3B (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 10: Rålysat prøve 4C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 11: Strept rensset, prøve 4C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 12: Bunnfall, prøve 4C (*TthRDFY*), 10 µl
 Brønn 13: 1Kb DNA ladder, 5 µl
 Brønn 14: Rålysat, prøve 5C (*TthRDWT*), 10 µl
 Brønn 15: Strept rensset, prøve 5C (*TthRDWT*), 10 µl
 Brønn 16: Bunnfall, prøve 5C (*TthRDWT*), 10 µl
 Brønn 17: Rålysat, prøve *TthWT*, 10 µl
 Brønn 18: Strept rensset, prøve *TthWT*, 10 µl
 Brønn 19: Bunnfall, prøve *TthWT*, 10 µl
 Brønn 20: Rålysat, prøve *TthFY1*, 10 µl
 Brønn 21: Strept rensset, prøve *TthFY1*, 10 µl
 Brønn 22: Bunnfall, prøve *TthFY1*, 10 µl
 Brønn 23: Rålysat, prøve *TthFY2*, 10 µl
 Brønn 24: Strept rensset, prøve *TthFY2*, 10 µl
 Brønn 25: Bunnfall, prøve *TthFY2*, 10 µl
 Brønn 26: 1kb DNA ladder, 5 µl

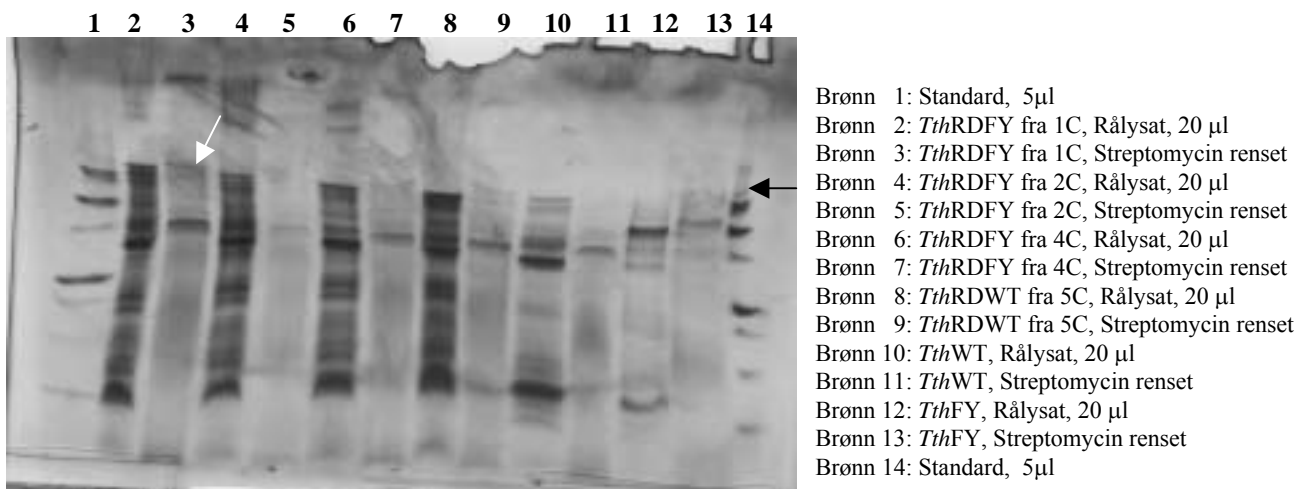
Figur 3.11: Kontroll av rålysat, streptomycinrenset polymerase og det resuspenderte bunnfallet etter endt rensing. Det som ble sjekket på gelen var om det fantes DNA i prøvene.

Ut fra gelen i figur 3.11 kan det ses at rålysatene i prøvene 1C, 2C, 4C (*TthRDFY*) og 5C (*TthRDWT*) gav ganske sterke bånd og inneholdt ganske mye DNA som tydeligvis har blitt felt ut da båndene for bunnfallet også var ganske sterke. Rålysatene for prøvene 3B og WT viste kun svake bånd på gelen og hadde lite innhold av DNA. De native polymerasene *TthFY1* og *TthFY2* innehold lite DNA både før og etter streptomycinsulfatfelling og viste omtrent ikke bånd på gelen i det hele tatt.

Streptomycinsulfat kan også felle ut enkelte proteiner så det ble målt aktivitet i både lysat og resuspendert pellet etter utfellingen. Utgangspunktet før rensingen var et rålysat på 0,8 ml. Dette ble tilsatt 0,2 ml 5% streptomycinsulfat slik at volumet økte til 1 ml. Pelleten ble resuspendert i 1 ml TN-buffer. Siden streptomycinsulfat kan felle ut en del proteiner ble det sjekket aktivitet både i rålysat, i lysatet etter felling på alle lysatene og i resuspendert pelleten. Aktivitetsmålingene er gjort med 10X fortyning av lysat og 3 minutter reaksjonstid.

Tabell 3.14: Aktivitetsmåling før og etter felling med streptomycinsulfat i tillegg til bunnfallet.

	Rålysat		Lysat etter felling		Resuspendert pellet	
	INT	U/µl	INT	U/µl	INT	U/µl
Prøve 1C <i>TthRDFY</i>	522,7	4,88	150,6	1,41	171,2	1,60
Prøve 4C <i>TthRDFY</i>	477,1	4,46	269,4	2,52	266,7	2,49
Prøve 5C <i>TthRDWT</i>	528,3	4,93	281,1	2,63	468,0	4,37
Nativ prøve <i>TthFY1</i>	151,0	1,41	91,3	0,85	3,8	0,04
Nativ prøve <i>TthFY2</i>	212,2	1,98	95,3	0,89	4,3	0,04
Villtypen <i>TthWT</i>	218,3	2,04	120,3	1,12	18,6	0,17



Figur 3.12: SDS-PAGE av rålysat fra et uttall av ekspresjoner. Den sorte pilen viser markørbåndet som har en størrelse på 100 kDa. Den hvite pilen viser *TthRDFY* DNA polymerase I på 94 kDa for den streptomycinrensede prøven av 1C.

Rålysatene og de streptomycinsulfatrensede prøvene ble kjørt på en SDS-PAGE gradientgel fra BioRad og farget med Coomasse Brilliant Blue.

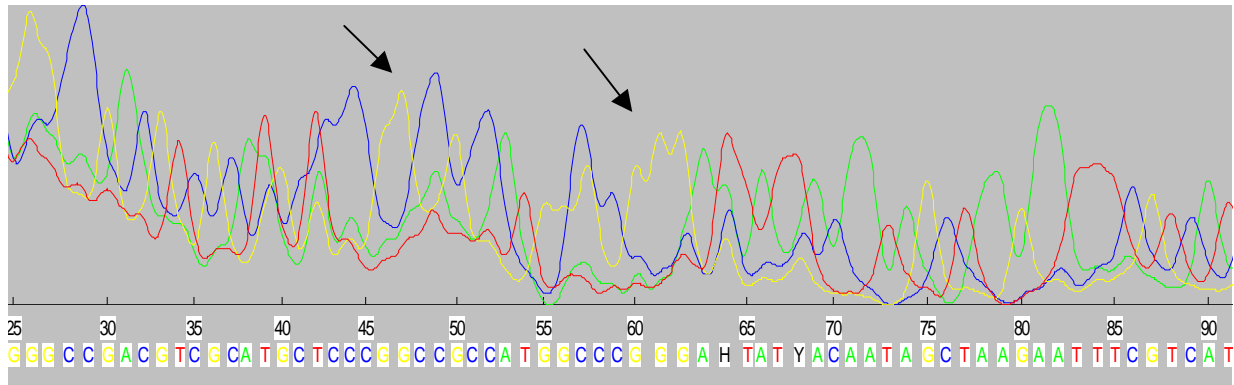
3.5. Sekvensering med *Tth* polymeraser.

Neste trinn i oppgaven var å teste den muterte *TthRDFY* og den native *TthFY* polymerasene mot hverandre i sekvensering og se om det fantes forskjeller mellom dem. *Taq* og *Tth* DNA polymerase har store likheter med hverandre og dermed kan de optimale betingelsene for *Taq*FS DNA polymerase også benyttes av *TthRDFY* og *TthFY* DNA polymerase.

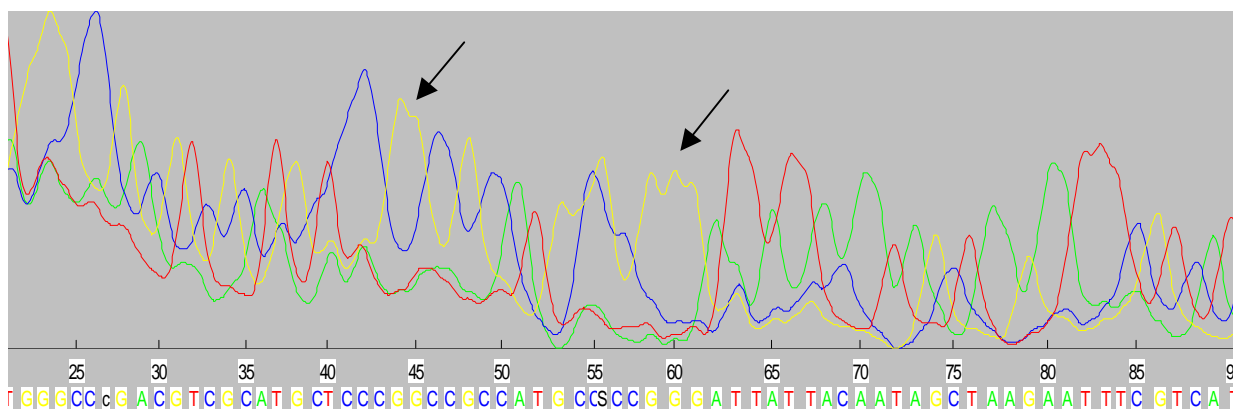
Villtypene av *Taq* og *Tth* DNA polymerase gir ofte sekvenssignaler med ujevn intensitet, slik at noen av toppene blir veldig lave i forhold til andre, og dermed vanskelig for sekvensprogramvaren å tolke. Det er derfor ikke av interesse å studere polymerasene uten FY-mutasjonen ved sekvensering i denne oppgaven.

3.5.1. Sekvensering med *TthFY* og *TthRDFY* polymerase.

For å teste de to enzymene ble de benyttet i sekvenseringsreaksjoner med vektoren pGEM som templat. Etter noe optimalisering av dNTP – og ddNTP konsentrasjonene og nye nukleotidinnkjøp, fungerte begge enzymene. Nedenfor vises et utdrag av sekvenssignalene fra ALFExpress. (figur 3.13 og 3.14).

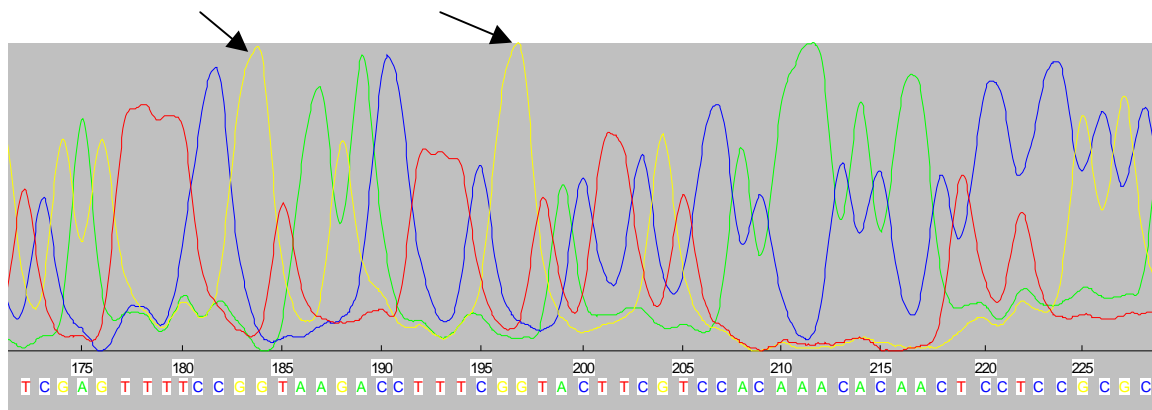


Figur 3.13: Sekvenssignaler fra sekvensering av pGEM med *TthRDFY* DNA polymerase. Pilene peker på en GG og en GGG kombinasjon i sekvensen som har et karakteristisk mønster i forhold til *TthFY*.

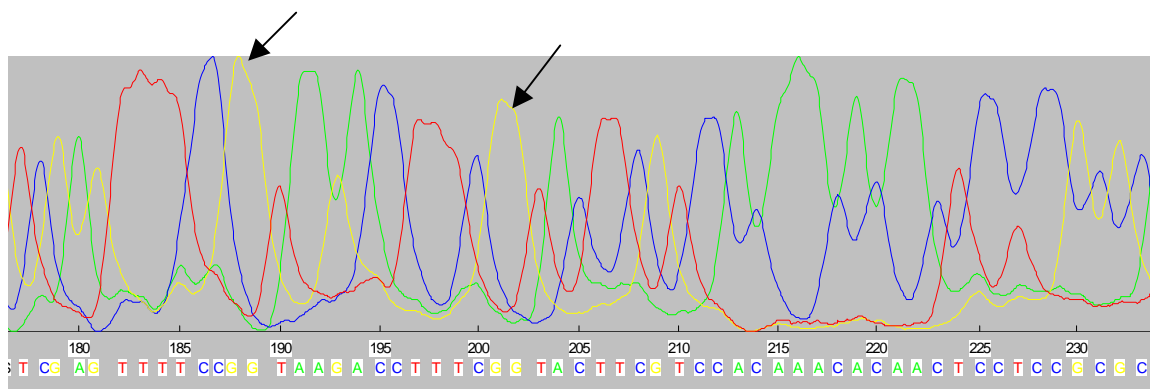


Figur 3.14: Sekvenssignaler fra sekvensering av pGEM med *TthRDFY* DNA polymerase. Pilene peker på en GG og en GGG kombinasjon i sekvensen som har et karakteristisk mønster i forhold til *TthRDFY*.

Siden den native *TthFY* polymerasen ga omtrent like bra sekvenssignaler som *TthRDFY*, var det interessant å sammenligne hvor effektiv disse polymerasene var i forhold til hverandre. Begge disse polymerasene skal gi redusert diskriminering mot ddNTP i forhold til villtypen. Figurene 3.15 og 3.16 i tillegg til figurene 3.17 og 3.18 ble gjort en sammenligning av *TthRDFY* og *TthFY* polymerase på forskjellige steder i sekvensen, for å se om bruken av den ene *Tth* polymerasen førte til bedre sekvenssignaler enn den andre.

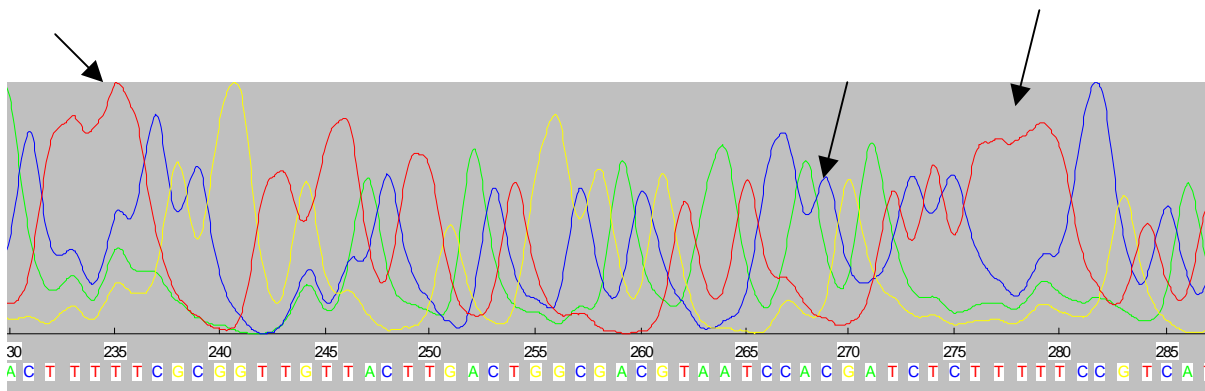


Figur 3.15: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av pGEM med *TthRDFY* polymerase. Pilene peker på en GG kombinasjon i sekvensen hvor mønsteret går igjen.

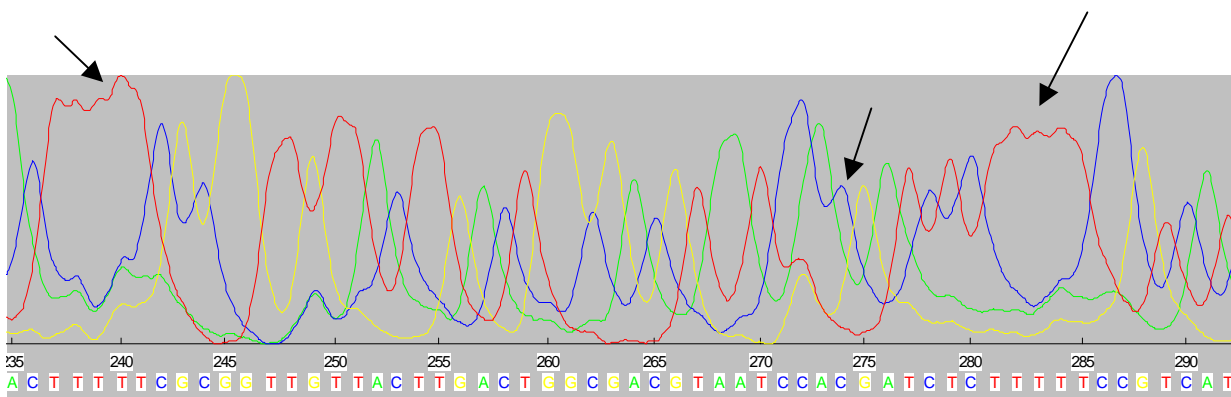


Figur 3.16: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av pGEM med *TthFY* polymerase. Pilene peker på en GG kombinasjon i sekvensen hvor mønsteret går igjen, men i motsatt rekkefølge i forhold til *pTthRDFY*.

Ved nærmere gjennomgang av sekvensen ble det observert at de to polymerasene har stort sett like sekvenssignaler, det vil si at det ble tolket lik base i samme posisjon, men intensiteten i toppen kan variere noe. I flere posisjoner for GG-topper og GGG-topper har det blitt markante forskjeller mellom *TthRDFY* og *TthFY*. Mens *TthRDFY* har først et svakere signal, så et sterkere i GG kombinasjonen, har *TthFY* det motsatte; sterk-svakt signal. Dette går også igjen ved kombinasjonen GGG. Her er det først et svakt, så to sterke signaler for *TthRDFY*, mens det for *TthFY* har to sterke så et svakt signal. Dette er markert med piler i figurene 3.13, 3.14, 3.15 og 3.16.



Figur 3.17: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av pGEM med *TthRDFY* polymerase. Pilene peker på blant annet T sporet som varierer i TTTTTT kombinasjonen i forhold til *TthFY*.



Figur 3.18: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av pGEM med *TthFY* polymerase. Pilene peker på blant annet T sporet som varierer i TTTTTT kombinasjonen i forhold til *TthRDFY*.

Studier av figurene 3.17 og 3.18 viser at det også kan oppstå forskjeller for sekvensen TTTTTT ved de to forskjellige variantene av *Tth*. Styrken i C-toppen som også er markert i figurene 3.17 og 3.18 er noe svakere for *TthFY* enn *TthRDFY*. Til tross for disse forskjellene i styrke på signalene er sekvensene like for de to variantene for *Tth* polymerase. Dette viser at det egentlig ikke spiller så stor rolle for sekvenseringen hvilke av de to polymerasene som velges. Begge polymerasene leser sekvensene korrekt, men *TthRDFY* viste seg å kunne lese lengre sekvenser med sikkerhet enn *TthFY*.

Det ble kjørt mange identiske sekvensreaksjoner for å se om det statistisk sett var forskjeller i lengden av sekvenser som er lest med sikkerhet. Resultatene av disse sammenligningene viste at *TthRDFY* polymerase i gjennomsnitt kunne leste omtrent 100 baser mer enn *TthFY*. Intensjonen var å vise at verdiene fra prøver med *TthRDFY* er statistisk signifikant høyere enn verdiene fra prøver med *TthFY*.

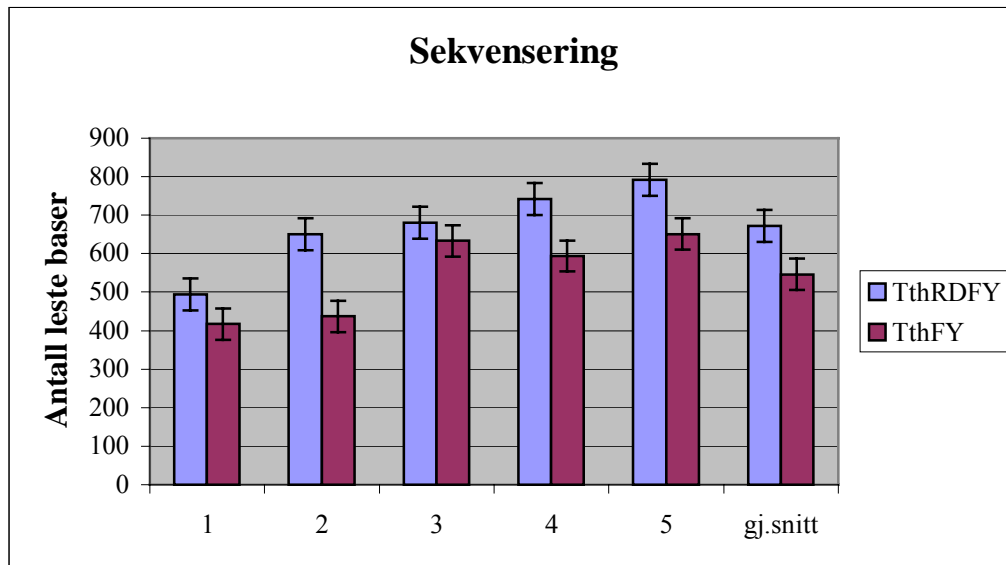
Nullhypotesen sier at det ikke er noen differanse mellom resultatene fra *TthRDFY* og *TthFY*:

$$(1) H_0: \Delta = 0$$

Datagrunnlaget er satt opp basert på sekvensering bestående av fem parvise testresultater for henholdsvis *TthRDFY* og *TthFY* og er angitt i tabell 3.15 og vist i figur 3.19.

Tabell 3.15: Sekvensering av *TthRDFY* og *TthFY* og antall leste baser med sikkerhet.

Brønn på gelen	<i>TthRDFY</i>	<i>TthFY</i>
1	494	450
2	650	503
3	681	633
4	742	624
5	792	651
Gjennomsnitt	$\bar{X} (TthRDFY) = 671,8$	$\bar{X} (TthFY) = 572,2$



Figur 3.19: Statistikk over leste baser av sekvenseringsprogrammet. Figuren viser antall leste baser for *TthRDFY* og *TthFY*. Det er også tatt med standardavviket for hver bane. Bane 1 tilsvarende den ytterste banene for A, C, G og T på gelen og bane 5 tilsvarende de midterste banene. Sekvens nummer 6 viser gjennomsnittet av antall baser som er lest av programmet for de to polymerasene *TthRDFY* og *TthFY*.

En kan se fra tabell 3.15 at gjennomsnittlig verdi for den muterte polymerasen ($\bar{X} (TthRDFY)$) er mye høyere enn den umuterte polymerasen ($\bar{X} (TthFY)$). På denne bakgrunn lanseres en alternativ hypotese som sier at resultatene fra den muterte polymerasen er statistisk signifikant høyere enn resultatene fra den umuterte polymerasen:

$$(2) H_A: \Delta > 0$$

For å teste nullhypotesen (H_0) er det benyttet en ensidig (enhalet) t-test for parvise prøver/data for å finne p-verdien. p-verdien (kritisk punkt) viser sannsynligheten for å observere gitte data fra utvalget, gitt at H_0 er sann. Innen standard statistiske tester er det vanlig å operere med krav om at H_0 må ligge utenfor et konfidensintervall på 95 % (eller 99 %) før nullhypotesen kan forkastes. Det vil si p-verdi lavere enn 5 % (1 %).

Det forutsettes at utvalget er normalfordelt. Variansen i utvalget er ukjent og må estimeres.

Følgende formel benyttes for å estimere p-verdien for H_0 :

$$(3) t = \frac{\bar{D} - \Delta}{\frac{s}{\sqrt{n}}}, \text{ hvor}$$

\bar{D} = gjennomsnittet av differansene mellom muterte (*TthRDFY*) og umuterte (*TthFY*) data

Δ = nullhypotesen (H_0), som her er at $D = 0$, jf. (1) ovenfor

s = standardavviket for utvalget, som her er differansene mellom *TthRDFY* og *TthFY*

n = antall "forsøk"

For å estimere standardavviket (s) benyttes følgende formel:

$$(4) s = \sqrt{\frac{\sum ((D - \bar{D}) ^ 2)}{n-1}}, \text{ hvor}$$

D = differanse mellom *TthRDFY* og *TthFY*

$n-1$ = antall frihetsgrader

Tabell 3.16 gir tall for innsetting i formel (4):

Tabell 3.16: Differansen av antall baser lest ved sekvenseringen ved *TthRDFY* og *TthFY*.

Forsøk	$D = TthRDFY - TthFY$	$(D - \bar{D})^2$
1	44	3 091,36
2	147	2 246,76
3	48	2 662,56
4	118	338,56
5	141	1 713,96
	$\bar{D} = 99,6$	$\sum (D - \bar{D})^2 = 10 053,2$

$$(5) s = \sqrt{\frac{10053,2}{4}} = \sqrt{2513,3}$$

Standardavviket gir grunnlag for estimering av standardfeilen, som utgjør nevneren i formel (3). Nullhypotesen, definert i (1) ovenfor, sier at gjennomsnittsverdien for $D = 0$. Standardfeilen gir grunnlag for å angi hvor stort intervall en må ha fra denne verdien for å ha en valgt prosentvis sannsynlighet for at ett nytt forsøk skal ligge innenfor, gitt at hypotesen er sann.

På bakgrunn av informasjonen ovenfor kan en estimere t-verdien fra formel (3):

$$t = \frac{99,6 - 0}{\frac{\sqrt{2513,3}}{\sqrt{5}}} = 4,44$$

En vet at antall frihetsgrader = $n - 1 = 4$

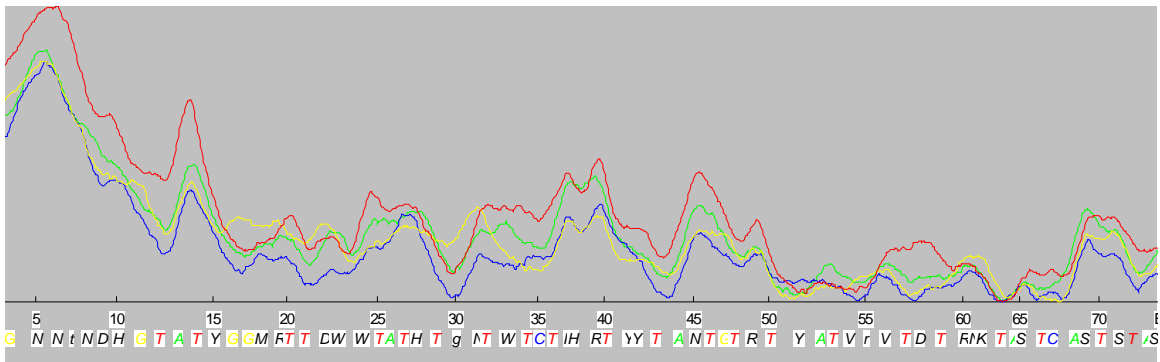
Ved å bruke en t-tabell, vil en se at for 4 frihetsgrader er det en enhalet p-verdi på 0,006 som gir en t-verdi på 4,44. Det betyr at gitt at H_0 er sann, er det 0,6 prosents sannsynlighet for å observere de testresultater (differanser mellom *TthRDFY* og *TthFY*) som er gjort i disse forsøkene.

Med en p-verdi lavere enn både 5 prosent og 1 prosent, kan nullhypotesen om ingen differanse mellom *TthRDFY* og *TthFY* forkastes både på et 95 % og 99 % sikkerhetsnivå.

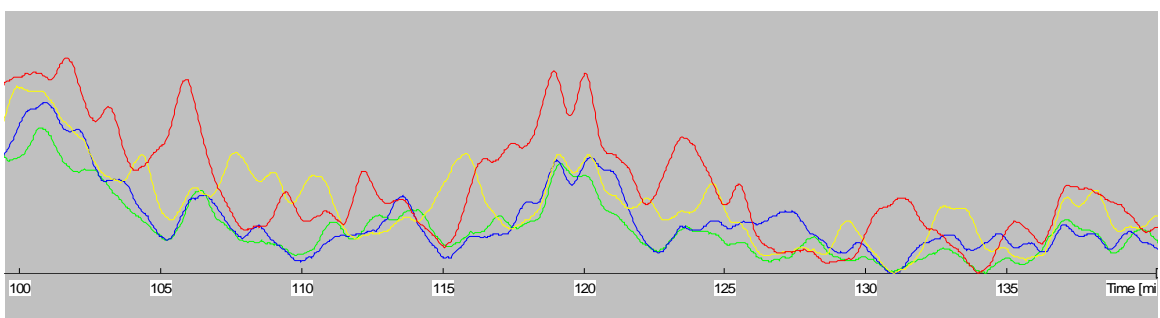
Den alternative hypotesen støttes ved et resultat som er statistisk signifikant på 0,6 prosentnivå.

3.6. Sekvensering med RNA som templat.

Neste trinn i oppgaven var å teste den muterte *Tth*RDFY og den native *Tth*FY polymerasen mot hverandre i sekvensering med totalt RNA som templat for å teste om RD-mutasjonen har noe å si på revers transkriptaseaktiviteten til polymerasen. De samme betingelsene som ved DNA sekvensering ble benyttet.



Figur 3.20: Utdrag av sekvenseringen av RNA med *Tth*RDFY polymerase.



Figur 3.21: Utdrag av sekvenseringen av RNA med *Tth*FY polymerase.

Sekvensering med RNA er ikke enkelt å få til og siden det ikke var så mye tid igjen til dette arbeidet ble det kun brukt til å teste om RD-mutasjonen hadde noe innvikning på revers transkriptaseaktiviteten til polymerasen.

3.7. Cy5-dCTP merking av templat.

For å finne ut hvilke effekt RD-mutasjonen hadde på de forskjellige *Tth* DNA polymerase variantene ble det forsøkt å fluorescensmerke totalt RNA. Fluorescensmerking kan brukes ved direkte merking av nukleinsyrer ved å inkorporere et modifisert nukleotid. I denne oppgaven er det benyttet fluoroforen Cy5 knyttet til dCTP. En fluorofor er en kjemisk gruppe som fluorescerer når det er utsatt for lys med en bestemt bølgelengde. Totalt RNA merkes ved "reverstranskripsjon" med den fluorescerende nukleotiden, som for eksempel Cy5-dCTP.

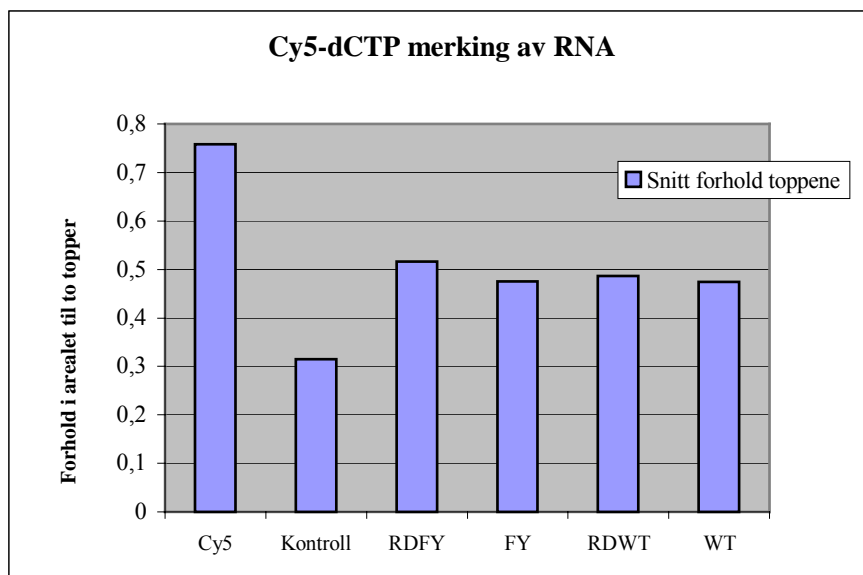
Fluorescensmerkelappene har forskjellige emisjons bølgelengder og inkorporeres i nukleotider eller festes direkte til DNA/RNA molekyl og kan detekteres med en passende film, fluorescens mikroskopi, eller med en fluorescens detektor. Cyanin fluorokromer er klare med høy vannløselighet og liten følsomhet overfor pH. De har minimale overlappinger med andre fluorokromer. To av disse, Cy3 og Cy5, er populære markører for fluorescens

eksperimenter som microarray analyse. Merkingene er tilgjengelig i et emisjonsområde med et smalt emisjonsspekter, noe som gjør de ideelle for flerfarget deteksjon av fluorescens. Cy5 er en av mange kommersielt tilgjengelige farger i nærheten av det infrarøde området og har en maksimal lysabsorbans ved 650 nm og en maks lysemissjons på 680 nm. Cy5 er effektive substrat for DNA polymerase og kan inkorporeres i DNA eller RNA prober ved standard “nick translation”, tilfeldig priming og PCR.

Merking av totalt RNA ved Cy5-dCTP og fjerning av overskudd Cy5-dCTP ble i denne oppgaven gjennomført for å teste inkorporeringen av fluorescensmerket nukleotid og så kjørt på ALF Express systemet og fragmentanalyse. Primeren som ble benyttet i denne reaksjonen var en ”random heksamer” primer. Det ble dessverre ikke satt av nok tid til å optimalisere dette forsøket og resultatene dermed noe usikre, og det kunne ha vært interessant å jobbet videre med dette arbeidet med blant annet måling av mengde inkorporert Cy5-dCTP og teste ut de forskjellige polymerasevariantene på microarrays. I denne oppgaven ble det kjørt flere paralleller av hver prøve på en ALF Express gel med 40 brønner og resultatene deretter overført til programmet Fragment Analysis fra Amersham Biotech. To topper ved siden av hverandre ble valgt ut og forholdet mellom arealet til de to toppene ble regnet ut. Fra dette forholdet ble gjennomsnittet av de 40 prøvene beregnet og finnes i tabell 3.17 og visualisert i figur 3.22.

Tabell 3.17: Forholdet av arealet mellom de to toppene for hver variant av *Tth* polymerase.

Prøver	Snitt av forholdet mellom to topper
Cy5	0.7585
Kontroll	0.3146
RDFY	0.5161
FY	0.4749
RDWT	0.4863
WT	0.4738



Figur 3.22: Forholdene mellom topp 1 og topp 2 visualisert med kurver.

Figur 3.22 viser at både *Tth*RDFY og *Tth*RDWT har fått inkorporert mer Cy5-dCTP enn både *Tth*FY og *Tth*WT.

4.0 DISKUSJON.

4.1 Oppsummering av resultatene

I denne oppgaven ble det utført en mutagenese av DNA polymerase I fra *Thermus thermophilus*. Genet for denne polymerasen var allerede klonet inn i en ekspresjonsvektor; pTrc99A. Det ble utført setestyrte mutagenese for å substituere arginin i posisjon 662 med asparginsyre. Dette ble først forsøkt med U.S.E (Unique Site Elimination) Mutagenesis Kit (Pharmacia Biotech) uten vellykket resultat. Deretter ble det forsøkt med QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) som heller ikke gav resultater. Til slutt ble et annet kit fra Stratagene, QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit brukt, noe som gav resultater på første forsøk. PCR produktet ble kjørt på en 0,8% agarosegel for å se om noe DNA hadde blitt amplifisert opp. Mutasjonen ble påvist ved restriksjonskutting med *BsaHI*. Siden fragmentene etter kutting var små og verken etterfarging med etidiumbromid eller SyberGreen klarte å gi detekterbare bånd på gelen, måtte sølvfarging til. Dette gav overraskende gode resultater og gav godt detekterbare bånd i området med 26 og 34 nukleotider for den muterte polymerasen.

Det neste som ble gjort var å uttrykke forskjellige varianter av polymerasen, først ved ekspresjoner i liten skala, så en ekspresjon hvor det ble tatt to uttak annen hver time og laget to forskjellige lysat, den ene ved hjelp av varmebehandling og den andre hvor varmebehandlings trinnet ble utelatt. Disse prøvene ble kjørt på en SDS polyakrylamidgel for å se om det var noe forskjell mellom de to fremstillingene. Ved analyse med fluorescensbasert aktivitetsanalyse av det varmebehandlede lysatet av *TthFY* polymerasen viste det seg at det ikke gav noe aktivitet, mens polymerasen av *TthRDFY* viste mest aktivitet 6 timer etter induksjon med IPTG. Det tok mange ekspresjonsforsøk før en aktiv polymerase av *TthFY* ble uttrykt og også denne viste høyest aktivitet 6 timer etter induksjon med IPTG. Ved fluorescensbasert aktivitetsanalyse ble så antall enzymenheter i lysatene beregnet til å være 5,4 U/μl for *TthRDFY* DNA polymerasen fra første ekspresjon og *TthFY* DNA polymerasen til å være 5,2 U/μl. En ny ekspresjon ble så gjennomført av *TthRDFY*, *TthFY*, *TthRDWT* og *TthWT* hvor hele kulturen ble høstet etter 6 timer og det ble laget tidskurver for *TthRDFY*, *TthFY* og *TthWT* med forskjellige fortyninger av rålysatene. Da dette var gjort skulle polymerasene ha blitt rensset, men dette trinnet ble ikke gjennomført på grunn av tidsmessige årsaker og det ble ikke tid til å gjennomføre annet enn felling av DNA med streptomycinsulfat. Det ble så gjort sammenligninger mellom aktiviteten til rålysatene, lysatene etter felling og den resuspenderte pelleten ved 10X fortyning av *TthRDFY*, *TthRDWT*, *TthFY* og *TthWT* polymerasene og antall enzymenheter beregnet derfra. Deretter ble de streptomycinrensede rålysatene for *TthRDFY* og *TthFY* benyttet i sekvensering på ALFExpress™. Det ble da vist at *TthRDFY* og *TthFY* polymerasen fungerer under helt andre betingelser enn *TthWT*. Villtypen, *TthWT*, og den muterte villtypen, *TthRDWT*, trenger veldig høye konsentrasjoner av ddNTP for å fungere, mens den muterte *TthRDFY* og den native *TthFY* ikke har behov for dette. Det ble derfor ikke foretatt noen undersøkelser hvor *TthWT* og *TthRDWT* ble benyttet som sekvenseringsenzym.

Det ble også gjort en statistisk sammenligning mellom *TthRDFY* og *TthFY* polymerasen og leselengden av sekvensene. Det viste seg at *TthRDFY* leser omtrent 100 baser lengre enn *TthFY* polymerasen og ved hjelp av t-test er det vist at det kun er en 0,6% sjans for at de to polymerasene gir like resultat. Dette stemmer med teorien som sier at RD-mutasjonen

inkorporerer de fire nukleotidene A, C, G, og T med ganske lik hastigheter, noe som gir sikrere signal og sikrere sekvensering.

Avslutningsvis ble det kjørt noen få runder med sekvensering hvor totalt RNA ble benyttet som templat. Det ble ikke tid til å optimalisere dette forsøket og det ble kun benyttet som en pekepinne på om RD-mutasjonen hadde noen innvirkning på reverstranskriptaseaktiviteten til polymerasen. Det siste som ble forsøkt var å merke prøver med Cy5-dCTP, men dette ble det heller ikke tid til å optimalisere. Det kunne være interessant å jobbe videre med dette arbeidet, og kanskje teste ut polymerasen på microarrays.

4.2 Mutagenese av *Tth* polymerase I

Etter mye problemer og uteblivende resultater med U.S.E Mutagenesis kitet fra Pharmacia Biotech og QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene, ble det besluttet å forsøke med et annet mutagenesekit fra Stratagene, QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit. Dette gav gode resultater på første forsøk.

Dette kitet er beregnet på store plasmider og vanskelige målsekvenser. I denne metoden blir plasmider som inneholder mutasjon skilt fra parentale plasmider ved kutting med *DpnI*. Dette enzymet er en endonuklease med målsekvens 5'-Gm⁶ATC-3' som fordøyer metylert og hemimetylert DNA.

Ved bruk av dette kitet er det viktig å passe på at plasmid DNA har blitt isolert fra en *dam*⁺ *E.coli* stamme. Det vil si at bakteriene metylerer sitt DNA. De fleste *E.coli* stammer, inkludert *E.coli* DH5 α , har denne egenskapen, men enkelte stammer, som for eksempel JM110 mangler denne egenskapen. Disse stammene kan dermed ikke benyttes i denne metoden. De kompetente cellene som benyttes i denne oppgaven er XL10-Gold® ultrakompetente celler, som tillater vekst av plasmid som bærer en mutasjon. Fordelen med denne metoden er at den krever lite DNA templat og det er ikke nødvendig med et høyt antall sykluser for å oppnå høy mutasjonseffektivitet. Dette sammen med at man benytter en polymerase med høy fidelitet bidrar til at det er mindre sjanser for tilfeldige mutasjoner under reaksjonen.

Da det var noe uklart om hvor store konsentrasjoner av plasmid som ville gi best resultat, ble mutagenesen utført på tre ulike konsentrasjoner av plasmidet, henholdsvis 10, 20 og 30 ng for *pTthFY* og 22 ng for *pTthWT*. Etter mutagenese, etterfølgende kutting med *DpnI* I og transformering inn i XL10-Gold® ultrakompetente celler var det god vekst i alle platene. Det ble dyrket opp 3 paralleller for de 4 *TthRDFY* polymerasene og 3 paralleller av *TthRDWT*. Fra alle disse ble plasmidene *pTthRDFY*, *pTthRDWT*, *pTthFY* og *pTthWT* isolert fra kulturene og kuttet med *BsaHI* for å påvise mutasjonen.

Det ble valgt en primer under mutagenesen som innfører et godt D-kodon, GAC, samtidig som et nærliggende A-kodon ble endret fra GCG til GCC. Dette innfører et *BsaHI*-sete og fjerner et *GdiII*-sete. Kutting med *BsaHI* vil gi et bånd på 60 nukleotider for *pTthWT* og *pTthFY*, mens *pTthRDFY* vil få to bånd på henholdsvis 24 og 36 nukleotider. Ut fra figuren 3.4 kan man se at prøvene 1C, 2C og 3B tydelig to har mindre fragment enn 4A og 5A i tillegg til de umuterte plasmidene. I brønn 4 på figuren, som også inneholder plasmid fra prøve 2C, har heller ikke blitt kutting i fragmentet på 60 nukleotider, men i dette tilfellet ble

det benyttet kun 0,3 µl med *Bsa*HI og kuttingen har trolig ikke vært fullstendig. Det ble fastslått at prøvene 1C, 2C og 3B i alle fall fått innført RD mutasjonen.

4.3 Ekspresjon og isolering av rekombinante proteiner

4.3.1 Ekspresjon av *Tth* polymerase I varianter.

Etter endelig en vellykket mutagenese var det neste trinnet å uttrykke de muterte *Tth*RDFY og *Tth*RDWT, den native *Tth*FY og villtype *Tth*WT variantene av DNA polymerase I. Genet for polymerasen var allerede klonet inn i ekspresjonsvektoren p*Trc*99A av en tidligere hovedfagstudent (Rønneberg, J.A., 1999). En ekspresjonsvektor er konstruert slik at de inneholder en regulerbar promoter som kan induseres slik at den uttrykker det klonede genet i respons til små endringer i omgivelsene. Ekspresjonsvektoren p*Trc*99A inneholder en sterk hybrid *trp*/*lac* promoter, translasjons-start sekvensen (ATG), *lacZ* ribosom bindingssete, multiple kloningssete fra pUC18 og *rrnB* transkripsjons-terminatorene. Denne vektoren kan induseres ved å tilsette IPTG, en galaktoseanalog, i vekstmediet.

Som vertscelle ble det brukt XL10-Gold[®] ultrakompetente celler for de muterte *Tth*RDFY og *Tth*RDWT variantene av DNA polymerase og *E.coli* DH5α for den native *Tth*FY og villtype *Tth*WT DNA polymerase. *E.coli* DH5α bakteriestammen har tidligere blitt brukt ved ekspresjon av DNA polymerase i *Thermus thermophilus* (Rønneberg, J.A., 1999), *Bacillus cerus*, (Tveit, H., 2000) og *Thermotoga maritima* (Flåtten, I., 2002) med gode resultater.

I følge Pluthero, F.G., (1993) er det viktig å finne ut optimal induksjonstid for å oppnå best mulig utbytte. Ved for lang induksjonstid kan det oppstå proteolytisk degradering av de produserte enzymene, mens mengden enzym produsert vil avta dersom induksjonstiden er for kort. For å optimalisere ekspresjonen ble det derfor gjort to uttak annenhver time og laget to forskjellige lysat, hvor det ene lysatet ble varmebehandlet og i det andre lysatet ble dette varmebehandlingstrinnet utelatt.

De første ekspresjonene viste tidsuttakene høyest aktivitet etter 4 timer for den muterte *Tth*RDFY polymerasen og 2 timer for den native *Tth*FY polymerasen, men da det ble gjennomført et tidsassay viste det svært lite eller ingen økning i aktiviteten med tiden. Det ble da kjørt mange runder med ekspresjon før det ble bestemt å starte helt fra begynnelsen igjen. Nye tidsuttak ble tatt og nytt polymeraseassay for tidsuttakene ble gjennomført. Det viste seg da at den optimale induksjonstiden for den native *Tth*FY polymerasen var på 6 og ikke 2 timer, som var bestemt ved første ekspresjonen. Dette kommer nok av at det eneste rålysatet som hadde noe som helst aktivitet var uttaket 2 timer etter induksjon med IPTG. Det ble så kjørt en ny ekspresjon hvor hele cellekulturen ble høstet etter 6 timer. Det ble da endelig oppnådd en vellykket ekspresjon av den native *Tth*FY polymerasen. Ekspresjon av den muterte den muterte *Tth*RDFY polymerasen ville ikke gi aktivitet og til slutt ble plasmidet p*Tth*RDFY ble testet på en 0,8% agarosegel ble det oppdaget at innskuddet med genet for DNA polymerase var borte fra vektoren. Da dette ble oppdaget ble det startet helt fra begynnelsen med mutagenese, påvising av mutasjon og en miniekspresjon med tidsuttak. Ut i fra denne miniekspresjonen viste det seg at også for den muterte *Tth*RDFY polymerasen var den optimale induksjonstiden på 6 timer. Ny ekspresjon ble så kjørt hvor hele cellekulturen ble høstet etter 6 timer.

4.3.2 Tillaging av rålysat

For å isolere de rekombinante proteinene er det nødvendig å lysere cellene. Dette blir gjort ved hjelp av lysozym og detergenter. Når bakteriecellene lyses vil det også frigjøres proteolytiske enzymer og det vil bli dannet et surere miljø. For å redusere eventuell skade dette kan påføre proteinet blir det før lyseringen tilført en buffer med en passende pH (pH 8) som også inneholder EDTA som vil hemme katalytisk oksidering av proteinene. Denne resuspensjonsbufferen inneholdt også D-glukose, noe som skal føre til stabilisering av lysosomale membraner og dermed senke frigjørelsen av proteaser.

I lysisbufferen som blant annet inneholder detergenter og som tilsettes før varmebehandlingen av lysatet er det i tillegg til EDTA, tilsatt proteasehemmeren PMSF og den reduserende agenten DTT.

Varmebehandlingen fjerner store mengder uønskede proteiner, blant annet de endogene polymerasene fra vertsbakterien. Denne behandlingen egner seg veldig godt til isolering av varmestabile enzymer, som tåler dette trinnet uten å miste aktiviteten.

Etter tillaging av rålysatene ble tidsuttakene av det varmebehandlede og det ikke varmebehandlede lysatene analysert ved hjelp av SDS-PAGE. På gelen kunne man se bånd som tilsvarte polymerasen, men det var vanskelig å se hvilket bånd som var sterkest. Det ble derfor benyttet aktivitetsanalyse for å bestemme hvilket uttak som inneholdt mest enzym.

Aktivitetsanalysen er diskutert i punkt 4.5

4.4. Rensing av proteiner.

I de senere årene har det vært en sterk økning i bruken av rekombinante proteiner. Mengden teknikker og produkter tilgjengelig for å amplifisere og rense slike produkter har økt tilsvarende. Et nytt produkt er fusjonsvektorer og fusjonsproteiner. Rekombinante proteiner som uttrykkes som fusjonsproteiner kan lette rensingen av proteiner. Glutathione S-transferase (GST) og 6 (eller 11) histidiner er eksempler på hva som kan fusjonere med rekombinante proteiner under ekspresjon. Når disse rekombinante proteinene skal renses, skjer det i ett trinn der fusjonsproteinets særegne affinitet utnyttes, og en renhet på opp til 97% kan oppnås (The Recombinant Protein Handbook Amersham Pharmacia Biotech 2000).

Hvis det uttrykte proteinet derimot ikke er et fusjonsprotein, må flere rensetrinn til for å oppnå høy renhet. Ved rensing av disse proteinene utnyttes de ulike fysiokjemiske egenskapene til proteinene i tur og orden for å separere de fra hverandre. De forskjellige formene for kromatografiske teknikker som kan benyttes ved tradisjonell rensing av rekombinante proteiner er beskrevet i tabell 4.1

Tabell 4.1: Sammenhengen mellom teknikker og separasjonsmetoder til bruk ved tradisjonell rensing av rekombinante proteiner (Voet, D. *et al.* 2004).

Karakteristikk	Kromatografiske teknikker
Ladning	Ionebytterkromatografi Elektroforese Isoelektrisk fokusering
Størrelse	Dialyse og ultrafiltrering Gelelektroforese Gelfiltrerings kromatografi Ultrasentrifugering
Polaritet	Adsorpsjonskromatografi Omvendt fasekromatografi Hydrofob interaksjonskromatografi
Spesifisitet	Affinitetskromatografi

I denne oppgaven ble dessverre ikke nok tid til å rense proteinene og det eneste rensetrinnet som ble gjennomført var fjerning av DNA ved hjelp av streptomycinsulfat.

4.4.1 Fjerning av DNA

For å fjerne DNA i lysatet ble det benyttet 5% streptomycinsulfat. En slik behandling kan føre til at noen proteiner felles ut. Det ble derfor sjekket aktivitet før og etter felling med streptomycinsulfat. Det viste seg at aktiviteten ble redusert ganske mye etter fellingen. Samtidig ble det observert på SDS PAGE gelen (figur 3.12) at proteinmengden i lysatet sank betraktelig, noe som bidrar i renseprosessen.

4.5 Aktivitetsassay

Aktivitetsassayet som ble benyttet i denne hovedoppgaven, var et fluorescensbasert assay hvor mengde DNA syntetisert ble målt ved å tilsette et fargestoff, PicoGreen®, som fluoriserer ved binding til dsDNA. Det har tidligere blitt vist at dette aktivitetsassayet er minst like nøyaktig som radioaktivitetsbasert aktivitetsassay, og at det ved beregning av enzymenheter er mer nøyaktig enn det radioaktivitetsbaserte. (Tveit, H., 2000).

Aktivitetsassayet ble benyttet ved analyse av rålysat. De første analysene som ble gjort ved denne metoden var for å finne ut hvilket lysat som inneholdt mest protein, da dette var vanskelig å se ut i fra proteingelene.

Det ble da tilsatt like mye enzym fra hvert lysat til reaksjonsblandingen, som inneholdt 10x polymerasebuffer, primet M13 og dNTP-mix. Enzymløsningen ble da fortynnet og 10 µl, ikke 1 µl ble tilsatt. Dette ble gjort fordi det da vil føre til at feilen ikke blir så stor hvis pipetteringen er litt unøyaktig eller hvis noe enzymløsning blir hengende igjen på pipettespissen. Det er tidligere vist at *Tth* DNA polymerase har et temperaturoptimum på 80°C (Rønneberg, J.A., 1999). Reaksjonen på polymeraseassayet ble kjørt ved 75°C i 3 minutter før reaksjonen ble stoppet med EDTA og satt på is. Det ble her antatt at 3 minutter lå

i det lineære området til polymerasen, og siden analysene kun skulle brukes til å finne optimal induksjonstid, var det viktigst at alle prøvene hadde like betingelser.

Når det var bestemt ved hvilke induksjonstider man fikk høyest ekspresjon, ble en ny ekspresjon kjørt og cellekulturene høstet 6 timer etter induksjon med IPTG. Disse lysatene ble benyttet til videre analyser.

Det neste som ble gjort var å lage en tidskurve for å finne det lineære området for polymerasene. Det ble gjort målinger på tre forskjellige konsentrasjoner av rålysat mellom 1 og 30 minutter, og resultatene plottet i et diagram. Det ble observert at det lineære området gikk opp til 5 minutter for både den muterte *Tth*RDFY polymerasen og den native *Tth*FY. Villtypen *Tth*WT er lineær opp til 20 minutter. Det ble benyttet en reaksjonstid på 3 minutter i videre analyser, da dette er et tidsintervall som ligger godt innenfor det lineære området.

Problemet med dette assayet var noe ujevne resultater. Dette kan komme av unøyaktigheter i pipetteringen, da veldig små konsentrasjonsforskjeller kan føre til relativt store forskjeller i resultatene. Det ble gjort forsøk på å minimalisere pipetteringsfeil ved at polymerasen ble fortynnet før tilsetning, slik at man tilsatte 10 µl isteden for 1 µl. I tillegg ble det laget en stor "batch" med reaksjonsblanding, som så ble fordelt i eppendorfrør. Selv om man tar slike forbehold, er det vanskelig å få nøyaktig samme konsentrasjon i alle prøvene, og resultatene vil derfor bli noe ujevne. Det ble derfor alltid målt minst tre paralleller av hver prøve, slik at middelverdien kunne benyttes i videre beregninger.

Det ble også benyttet en 0-prøve som inneholdt alle løsningene, men som ikke ble innkubert ved 75°C. Grunnen til dette er at store mengde ssDNA kan gi en høy bakgrunn, mens men med en slik kontroll kan trekke fra bakgrunnen på dsDNA målingene.

4.6 Sekvensering med mutert og nativ *Tth* polymerase

Etter at mutasjonen hadde blitt innført og de forskjellige polymerasene uttrykt og isolert i rålysat, var neste trinn å teste disse variantene av polymerase i syklisk sekvensering. Det er i denne metoden en stor fordel med en varmestabil polymerase, fordi man da ikke trenger å tilsette en ny polymerase etter hvert denatureringstrinn. Problemet med en del av de varmestabile polymerasene har vært at de diskriminerer mot inkorporering av ddNTP. Man må derfor i termineringsløsningen ha en høy konsentrasjon av ddNTP i forhold til dNTP, for at polymerasen skal inkorporere disse. Problemet med en slik diskriminering er at sekvensmønstrene ved bruk av disse enzymene er ujevne. Det vil si at toppene i signalkurvene varierer mye i størrelse, slik at automatisert sekvensbestemmelse blir vanskelig. Dette var problemet med *Taq* polymerase, men ble løst ved substitusjon av fenylalanin til tyrosin i posisjon 667 og for å utjevne hastigheten av inkorporeringen av ddGTP i forhold til de tre andre ddNTPene ble arginin i posisjon 660 byttet ut med asparginesyre (Li, Y. *et al.* 1999).

Målet med denne oppgaven var å se om disse to mutasjonene hadde samme gunstige effekt i *Tth* DNA polymerase, som også viser diskriminering mot ddNTP og har store likheter med *Taq* DNA polymerasen.

4.6.1. Sekvensering med DNA som templat.

Det enzymet som vanligvis benyttes for sekvensering i dag er FY mutert *Tth* DNA polymerase, men dette enzymet gir ujevne båndintensiteter, hvor ddGTP har sterkest intensiteter. Dette medfører at ddGTP overskuddet tømmes raskere enn de tre andre ddNTPene. Dette problemet kan løses ved å innføre en mutasjon i posisjon 662 (R662D) i tillegg til *TthFY*. Mange bånd som blir svake med *TthFY*, blir tydelige når *TthRDFY* benyttes. Et eksempel på dette er markert i figurene 3.17 og 3.18. Polymerase med mutasjon i posisjon 662 vil med andre ord hjelpe til med å begrense feiltolkninger, og redusere kravene for overskudd. Med hensyn til sekvenslesingen vil det ikke ha så stor betydning om det er RDFY eller FY varianten som benyttes. Begge leser godt sekvensen, men dersom lengden på sekvensen derimot er viktig, er *TthRDFY* best. Ved hjelp av enhalet parvis t-test er det funnet en t-verdi på 4,44 og dette tilsvarer en p-verdi på 0,6 %. Med en p-verdi lavere enn både 5 prosent og 1 prosent, kunne nullhypotesen om ingen differanse mellom *TthRDFY* og *TthFY* forkastes både på et 95 % og 99 % sikkerhetsnivå. Den alternative hypotesen som sier at *TthRDFY* leser flere baser enn *TthFY* støttes ved et resultat som er statistisk signifikant på 0,6 prosents nivå. *TthRDFY* sekvenserer omtrent 100 baser lengre enn *TthFY*.

4.6.2. Sekvensering med RNA som templat.

Sekvensering med RNA som templat ble kun kjørt noen få ganger. Betingelsene som ble benyttet av de samme som for sekvensering av DNA. RNA sekvensering er vanskelig å få til og i denne oppgaven ble det kun benyttet som en indikasjon på om RD-mutasjonen hadde noe som helst innvirkning på revers transkriptaseaktiviteten til polymerasen. Som figurene 3.20 og 3.21 viser, så oppfører *TthRDFY* og *TthFY* seg stort sett likt. Det er vanskelig å lese noen sekvens, men en kan trygt si at det ikke har forandret noe på revers transkriptaseaktiviteten. *TthRDFY* har ikke mistet noe revers transkriptaseaktivitet i forhold til *TthFY*, den er like bra.

4.7. Cy5-dCTP merking av templat.

For å teste ut hvilke effekt mutasjonen hadde på de forskjellige *Tth* DNA polymerase variantene ble det forsøkt å merke totalt RNA med Cy5-dCTP. Det ble dessverre ikke tid til å optimalisere dette forsøket, og det kunne ha vært interessant å jobbet videre med dette arbeidet med blant annet måling av mengde inkorporert Cy5-dCTP og teste ut de forskjellige polymerasevariantene på microarrays. I denne oppgaven ble det kjørt 40 prøver på ALF Express gelen og deretter overført resultatene til Fragment Analyser fra Amersham Biotech. To topper ved siden av hverandre ble valgt ut og forholdet mellom arealet til de to toppene ble regnet ut. Fra dette forholdet ble gjennomsnittet av de 40 prøvene beregnet og finnes i tabell 3.17 og visualisert i figur 3.22.

Ut i fra figuren 3.22 kan det ses at både *TthRDFY* og *TthRDWT* har fått inkorporert mer Cy5-dCTP enn *TthFY* og *TthWT*. Kontrollen inneholder de samme ingredienser som de andre prøvene, men polymerase er ikke tilsatt her, så denne skal i teorien ikke inkorporere noe særlig Cy5-dCTP. Ut fra figuren kan en se at dette stemmer. Det ble også applisert på 100X fortynnet Cy5-dCTP for å ha noe å sammenligne med. Som det kan ses av figuren har alle prøvene med *Tth* polymerase klart å inkorporere noe Cy5-dCTP, men polymerasene som inneholder RD mutasjonene har inkorporert mest. Dette stemmer godt med teorien som sier at RD mutasjonen skal gi redusert diskriminering av fluorescensmerkede nukleotider.

4.8. Videre arbeid.

Det kunne vært spennende å rense de forskjellige polymerasene og teste de på nytt med både sekvensering både på ALF Express og Cy5-dCTP merking for å sjekke resultatene litt bedre. Det ville også vært naturlig og teste polymerasene ved sekvensering på MegaBACE systemet. Deretter kunne det også ha vært interessant å ha testet ut de forskjellige *Tth* polymerasene på microarray. Målet med RD mutasjonen er å lage en DNA polymerase med redusert diskriminering mot fluorescensmerkede nukleotider, noe som kan føre til at behovet for templat og prøve kan reduseres, noe som igjen kan redusere arbeid og kostnader ved analyse.

5. MATERIALER:

Denne delen av oppgaven beskriver alle de materialer og apparater som har blitt benyttet i oppgaven. For oversiktens skyld er nummereringen i samsvar med kapitlene i metodedelen.

5.1 Arbeid med mikroorganismer

Vekstmediene ble sterilisert ved autoklaving og oppbevart ved 4°C. I de tilfellene vekstmediene ble tilsatt antibiotika ble dette gjort etter autoklavingen, og først når løsningen hadde kommet ned i en temperatur på under 50°C. Hvis temperaturen er høyere enn 50°C kan antibiotikaen bli ødelagt.

LB-medium: 10 g Trypton,
5 g gjærekstrakt,
10 g NaCl og
950 ml MQ-vann.
PH justeres til 7.0 med 5 M NaOH.
Volumet justeres til 1 L med MilliQ-vann.
Autoklaveres.

LB-medium til skål:
LB-medium tilsettes 1.5 % Bacto-agar.
Autoklaveres.

NZY⁺-medium: 500 ml dH₂O,
5 g NZ-amine,
2.5 g gjærekstrakt,
2.5 g NaCl.
pH justeres til 7.5 og
Autoklaveres

5.2 Arbeid med DNA

5.2.1 isolering av plasmid

5.2.1.1 Kvikk-sjekk metoden

Fenol:kloroform (1:1): Fenol og kloroform blandes i forhold 1:1.
Blandingen ekstraheres flere ganger med
0.1 M Tris-HCl, pH 7.6.
Oppbevares under likt volum av
0.01 M Tris-HCl, pH 7.6 i mørke flasker ved 4°C.

5.2.1.2 Plasmidisolering med GFX™ Micro Plasmid Prep Kit:

Oppskriftene på bufferne er hentet fra manualen som fulgte med kittet. Alle løsningen fulgte med kittet.

- Løsning I:** 100 mM Tris-HCl, pH 7.5,
10 mM EDTA,
400µg/ml RNaseA A
- Løsning II:** 1 M NaOH,
5.3% SDS.
Fortynnes med 26 ml destillert vann før bruk.
- Løsning III:** Bufferløsning med acetat og chaotrope
- Vaskebuffer:** Tris-EDTA-buffer.
Tilsettes absolutt etanol til 80 % før bruk

5.2.2 Agarosegelelektroforese av DNA

- 50 x TAE-buffer:** 242g Tris-base,
57.1ml iseddik,
100ml 0.5M EDTA pH 8.0,
MilliQ-vann til en liter
Autoklaveres

Etidiumbromid (10mg/ml):
Leveret fra Quantum Appligene, Prod. nr. ETBC1001

6 x agarosegel prøvebuffer:
Leveret fra Fermentas, Prod. nr. #R0611

λ-DNA markør: λ-DNA som er kuttet med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *HindIII*.
Leveret fra Fermentas, Prod. nr. #SMO191.

5.2.3 Sølvfarging av DNA på ikke-denaturerende polyakrylamidgel.

Fremkallingsløsning:
22,9 g Natriumkarbonat,
MilliQ-vann til en liter
Lagres i mørk flaske borte fra direkte lys.

0,2 % AgNO₃: 0,2 g Sølvnitrat
løses i 100 ml MilliQ-vann.

5.3 Analyse av DNA-sekvens

5.3.1 Løsninger til bruk for nukleotidsekvensering på ALFExpress™

Oppskriftene på løsningene er hentet fra ALFExpress DNA Sequencer User Manual, Pharmacia Biotech, 56-1173-21, utgave AA og AC.

6% Long Ranger gelløsning:

105 g Urea
30 ml Long Ranger gelløsning (50% stock-løsning)
30 ml 10X TBE
MilliQ-vann til 250 ml
Filtreres og oppbevares på mørk flaske i kjøleskapet.

10 % APS:

1 g Ammoniumpersulfat (APS)
løses i MilliQ-vann til 10 ml.
Lagres i 0.5 ml alikvoter ved -20°C.

10x TBE-buffer:

108 g Tris-base,
55 g Borsyre,
4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
tilsett MilliQ-vann til 1 liter.
Løsningen filtreres gjennom et 0.45 µm vakuumsfilter.

Bind-Silane brukerløsning:

7.5 ml Bind-Silane (stock-løsn.),
2.0 ml etanol,
0.5 ml 10 % (v/v) eddiksyre.

Stoppløsning:

Deionisert formamid
tilsatt 5 mg/ml Blue Dextran 2000.

10x FS-buffer:

125mM Tris-HCl (pH 9,5)
50mM (NH₄)₂SO₄
150mM MgCl₂

5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset *Taq* DNA polymerase FS

Termineringsløsningene er tatt fra sekvenseringsprotokoll tilpasset for sekvensering med *Taq* DNA polymerase FS (T. Kristensen 1997 i samarbeid med Hartmut Voss).

A-term :

10 mM Tris-HCl pH 9.5,
1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
5 µM ddATP

C-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
5 μ M ddCTP.

G-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
5 μ M ddGTP.

T-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
5 μ M ddTTP.

5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset *Taq* og *Tth* DNA polymerase.

Termineringsløsningene er tatt fra sekvenseringsprotokoll tillaget for sekvensering med *Taq* DNA polymerase FS (T. Kristensen 1997 i samarbeid med Hartmut Voss).

A-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
20 μ M av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
350 μ M ddATP

C-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
20 μ M av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
200 μ M ddCTP.

G-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
20 μ M av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
30 μ M ddGTP.

T-term : 10 mM Tris-HCl pH 9.5,
20 μ M av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og
600 μ M ddTTP.

5.3.3. Lav dCTP/dNTP termineringsløsning.

Termineringsløsningene er tatt fra sekvenseringsprotokoll tillaget for Cy3 (Cy5) merking (T. Kristensen 2004 i samarbeid med Arkady Khodursky).

Lav dCTP/dNTP miks :
10 mM dCTP,
25 mM av dATP, dTTP og dGTP

5.4 Ekspresjon av rekombinante proteiner

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside.
Levert fra Fermentas, produktnr. #R0392.
Løses i MQ-vann til ønsket konsentrasjon.

5.4.1 Løsninger for produksjon av grovlysat:

Buffer A 50mM Tris-HCl pH 8.0,
(resuspensjonsbuffer): 50mM D-Glukose,
1mM EDTA.
Autoklaveres
50mM D-Glukose,
1mM EDTA.
Autoklaveres.

Buffer B Buffer A tilsatt lysozym til 4 mg/ml
(pre-lysisbuffer):

Buffer C 10 mM Tris-HCl pH 8.0,
(lysisbuffer): 50mM KCl,
1mM EDTA,
Autoklaveres
0.5mM PMSF,
0.5 % Tween-20, 0.5 %
Nonidet P-40.

Buffer D 50mM Tris-HCl pH 8.0,
(lagringsbuffer): 50mM KCl,
50 % Glyserol
Autoklaveres
0.1mM DTT,
0.5mM PMSF

5.5 Rensing og oppkonsentrering av proteiner

5.5.1 Fjerning av DNA:

5% streptomycinsulfat:

Løs 5 g streptomycinsulfat i 100 ml MilliQ-vann.
Oppbevares ved 4°C i lysbeskyttet flaske.

TN-buffer: 0.1M Tris-HCl pH 7.5
0.15M NaCl

5.6 Lowry-metoden

Oppskriften på løsningene er hentet fra hovedoppgaven til Bjørn Evert Kristiansen, 2000

0.8 M NaOH: 32 g NaOH
løses i MilliQ-vann til 1 liter

1% DOC: 0.1 g DOC løses i
0.1 M NaOH til 10 ml

50% TCA: 50 g TCA
løses i MilliQ-vann til 100 ml

Lowry A: 0.1% CuSO₄ x 5H₂O,
0.2% Natrium-tartat,
10% Na₂CO₃ x H₂O

Lowry B: 1 volum Lowry A,
2 volumer 5 % SDS,
1 volum 0.8 M NaOH.
Løsningen er holdbar i 2-3 uker.

Lowry C: 1 volum Folin-Ciocalteu reagens,
5 volumer MilliQ-vann

BSA-standard: Bovint serum albumin
løses til ønsket konsentrasjon i sterilt MilliQ-vann

5.7 SDS-PAGE

5.7.1 tillaging av geler til SDS-PAGE

**40% akryl/bisakrylamid
gelløsning(19:1):** Ferdig blanding fra Quantum

5% separerende gel:
3.125ml 40 % akryl/bisakrylamidblanding,
15.12ml MilliQ-vann,
6.25ml Tris-HCl pH 8.8,
0.25ml 10% SDS,
0.25ml 10% ammonium persulfat (APS) og
20µl TEMED.
Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

10% separerende gel:

6.2ml 40%akryl/bisakrylamidblanding,
12ml MilliQ-vann,
6.3ml Tris-HCl pH 8.8,
0.25ml 10 % SDS,
0.25ml 10 % ammonium persulfat (APS) og
10µl TEMED.
Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

5% stacking-gel:

1.14ml 40 % akryl/bisakrylamidblanding,
5.36ml MilliQ-vann,
0.95ml Tris-HCl pH 6.8,
0.75ml 10 % SDS,
0.75ml 10 % ammonium persulfat (APS)
7.5µl TEMED.
Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

Ferdiglagede geler:

4-20 % gradientgel i Tris-HCl fra BioRad. Art. nr.

5.7.2 Tillaging av prøver til SDS-PAGE**3 x SDS prøvebuffer:**

Ferdig blandet fra New England Biolabs, #7703S

SDS-PAGE runningbuffer:**5 x Tris-Glysinbuffer:**

15g Tris-base,
72g Glysin,
50ml 10 % SDS
MilliQ-vann tilsettes til en liter.

5.7.3 Comassie-farging av geler etter SDS-PAGE:**Comassie farge-løsning:**

1g Comassie Brilliant Blue R-250
400 ml MilliQ-vann
500 ml metanol
100 ml konsentrert eddiksyre
Rør løsningen i 4 timer, eventuelt over natt
Løsningen filtreres

Avfargingsløsning:

300 ml metanol
100 ml eddiksyre
MilliQ-vann til 1 liter

5.7.4 Sølvfarging av proteingeler etter SDS-PAGE:

Reagens A: 300ml etanol,
100 ml eddiksyre
600 ml destillert vann.

Reagens B: 3g kalium tetrionat
49g kalium acetat i 300 ml etanol
700 ml destillert vann.

Reagens C: Løs 1g sølvnitrat i 500 ml destillert vann.
(0,2% AgNO₃)

Reagens D: Bland 30g kalium karbonat,
300µl formaldehyd og
125µl 10% natrium tiosulfat pentahydrat
Juster volum til 1000 ml destillert vann.

Reagens E: Bland 40g Tris
(stopp løsning) 20 ml eddiksyre.
Juster volum til 1000 ml med destillert vann

5.7.5 Tørrking av polyakrylamidgeler:

Geltørkerløsning: Tilsett 25 ml glyserol til
500 ml metanol
475 ml MilliQ-vann.

5.8 Polymeraseaktivitetsassay

10 x polA buffer: 500 µl Tris-HCl pH 8.5,
50 µl MgCl₂
450 µl MilliQ-vann

5.9. Generelle løsninger og buffere.

MilliQ-vann:	Ultrarent vann som er rensert på MilliPore MQ-systemet. Vannet blir i tillegg autoklavert før bruk.
1M Tris-HCl, pH X:	121,1 g Tris-base MilliQ-vann til 800 ml Juster pH med konsentrert HCl til ønsket pH-verdi Tilsett MilliQ-vann til 1 liter Autoklaver.
TE-buffer pH 8,0:	10mM Tris-HCl pH 8,0 1mM EDTA Autoklaver.
3M MgCl₂:	60,99 g MgCl ₂ MilliQ-vann til 100 ml Autoklaver.
1M CaCl₂:	27 g CaCl ₂ MilliQ-vann til 100 ml Steriliser ved å filtrere løsningen gjennom et 0,22 eller 0,45µm vakum-filter.
1M KCl:	7,45 g KCl MilliQ-vann til 100 ml Autoklaver.
1M NaCl:	5,8 g NaCl MilliQ-vann til 100 ml Autoklaver.
0,5M EDTA pH 8,0:	18,6 g EDTA-Na ₂ løses i 90 ml MilliQ-vann Juster pH til 8,0 (EDTA vil ikke løses opp før pH 8,0) Tilsett MilliQ-vann til 100 ml Autoklaver.
70 % etanol:	70 ml 98 % etanol MilliQ-vann til 100 ml
100mM PMSF:	174 mg fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) MilliQ-vann til 10 ml
1mM DTT:	3,09 g ditiotreititol (DTT) 0,01M Natriumacetat med pH 5,2 til 20 ml.

5.10. Formel benyttet under beregning av t-test.

Formel benyttet under beregning av standardavvik (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum ((D - \bar{D}) ^ 2)}{n-1}}$$

D	= differanse mellom <i>TthRDFY</i> og <i>TthFY</i>
n-1	= antall frihetsgrader

Formel benyttet ved beregning av t-verdien ved enhalet, parett t-test:

$$t = \frac{\bar{D} - \Delta}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

\bar{D}	= gjennomsnittet av differansene mellom muterte (<i>TthRDFY</i>) og umuterte (<i>TthFY</i>) data
Δ	= nullhypotesen (H_0), som i denne oppgaven er differansene mellom <i>TthRDFY</i> og <i>TthFY</i>
s	= standardavviket for utvalget, som i denne oppgaven er differansene mellom <i>TthRDFY</i> og <i>TthFY</i>
n	= antall målinger

5.11. Kjemikalier og reagenser

Agarose.....	Duchefa,	Prod. nr. DU0463
Ammoniumpersulfat (APS).....	Sigma,	Prod. nr. A-3678
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck,	Prod. nr. 1.01217
Ampicillin (Doktacillin®).....	Astra,	Prod. nr. 187591
Baktoagar.....	Difco,	Prod. nr. 0140-01
Bind-Silane.....	Pharmacia,	Prod. nr. 17-1330
Blue Dextran 2000.....	Pharmacia,	Prod. nr. 17-0360
Bovint Serum Albumin (BSA)	Sigma,	Prod. nr. A-4503
Bromfenolblått.....	Sigma,	Prod. nr. B7021
2-Butanol.....	Merck,	Prod. nr. 1.09630
Coomassie Brilliant Blue G 250.....	Bio-Rad,	Prod. nr. 161-0406
Deoksyholat (DOC)	Sigma,	Prod. nr. D-4297
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Fluka,	Prod. nr. 41641
Dinatriumetylendiamintetraacetat (EDTA-Na ₂)....	Sigma,	Prod. nr. E-5134
Dithiotreitol (DTT)	Saveen,	Prod. nr. S2150
Eddiksyre (iseddik) (AcOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.00063
Etanol (Rektifisert- og Absolutt-alkohol).....	Arcus,	
Etidumbromid (EtBr)	QBIOgene,	Prod. nr. EtBC1001
Fenol.....	QBIOgene,	Prod. nr. 130181
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF).....	Sigma,	Prod. nr. P-7626
Folin-Ciocalteureagenset	Sigma,	Prod. nr. F-9252
Formaldehyd (HCOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.04003
Formamid (deionisert).....	Merck,	Prod. nr. 1.09684
Gjærekstrakt	Difco,	Prod. nr. 0127-179
D-Glukose (Druesukker).....	Norsk Medisinaldep.,	Prod. nr. 309252

Glutaraldehyd.....	J.T Baker	Prod. nr. 7415
Glyserol	Norsk Medisinaldep.,	Prod. nr. 210500
Glysin (Gly)	Sigma,	Prod. nr. G-7126
Isopropanol (2-propanol).....	PROLABO,	Prod. nr. 20842.298
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Saveen,	Prod. nr. S2140
Kaliumacetat (KAc).....	Sigma,	Prod. nr. P-5708
Kaliumkarbonat (K ₂ CO ₃)	Merck,	Prod. nr. 1.04928
Kaliumklorid (KCl).....	Merck,	Prod. nr. 1.4936
Kaliumhydroksid (KOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.05033
Kalsiumklorid (CaCl ₂).....	Merck,	Prod. nr. 1.2382
Kloroform	Merck,	Prod. nr. 1.2445
Kobbersulfat (CuSO ₄ x5H ₂ O).....	Merck,	Prod. nr. 1.02790
Long Ranger gelløsningøsning	FMC BioProducts,	Prod. nr. 50615
Magnesiumklorid (MgCl ₂).....	Merck	Prod. nr. 1.5927
Metanol (MeOH)	PROLABO	Prod. nr. 20847.295
Natriumacetat (NaOAc)	Merck,	Prod. nr. 1.6268
Natriumdodesylsulfat (SDS).....	Saveen,	Prod. nr. S198223
Natriumhydroksid (NaOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.3301
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃ xH ₂ O).....	Merck,	Prod. nr. 1.6392
Natriumklorid (NaCl)	PROLABO,	Prod. nr. 27810.295
Natriumtartat (C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂).....	Sigma,	Prod. nr. S-8640
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma,	Prod. nr. P-1648
Nonidet P-40	Sigma,	Prod. nr. N-6507
PicoGreen [®] dsDNA quantitation reagent.....	Molecular Probes,	Prod nr P-7581
1,4-Piperazindietansulfonsyre (PIPES).....	Merck,	Prod. nr. 1.2030
Saltsyre (HCl)	PROLABO,	Prod. nr. 20252.29
Streptomycinsulfat.....	Sigma,	Prod. nr S-6501
Sølvnitrat (AgNO ₃)	KEBOLab,	Prod. nr. 5.2384.25
Tetrametyletylendiamin (TEMED).....	BioRad,	Prod. nr. 161-0800
Tris-base (TRIZMA [®] -base).....	Sigma,	Prod. nr. T-1503.
Trypton	Difco,	Prod. nr. 0123-173
Tween-20.....	Saveen,	Prod. nr. S1362001
Urea.....	GIBCOBRL,	Prod. nr. 15505027

5.12. Nukleinsyrer, plasmider og kit benyttet i oppgaven.

5.12.1. Nukleinsyrer og nukleotider.

dNTP-mix (10 mM):.....	Fermentas,	Prod. nr R0192
dNTP-mix (2 mM):.....	Fermentas,	Prod. nr R0241
dNTP-set:	Amersham,	Prod. nr 27-2035-01
ddNTP-set:.....	Amersham,	Prod. nr 27-2045-01
Cy TM 5-Deoksycytidintrifosfat (Cy TM 5-dCTP)....	Amersham Pharmacia,	Prod nr 27-2692

5.12.2. Plasmider.

pGEM [®] -T Easy vektor.....	Promega	Prod. nr A3600
pTrc99A ekspresjonsvektor.....	Pharmacia	Prod. nr 27-5007-01

5.12.3. Ulike kit benyttet i oppgaven.

Plasmidisolering;

GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit.....	Amersham Pharmacia	Prod. nr 27-9601-02
Plasmid Mini Kit.....	QIAGEN	Prod. nr 12123

Mutagenese:

U.S.E. Mutagenesis Kit.....	Pharmacia Biotech	Pod. nr 27-1699-01
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.....	Stratagene	Prod. nr 200214
QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit...	Stratagene	Prod. nr 200216

5.12.3. Ulike markører benyttet i oppgaven.

DNA markører:

λ DNA/HindIII+EcoRI.....	Fermentas	Prod. nr SM0191
λ DNA/EcoRI.....	Fermentas	Prod. nr SM0281
pUC19/MspI (HpaII).....	Fermentas	Prod. nr SM0223
O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.....	Fermentas	Prod. nr SM1163
φX 174 DNA/HinfI.....	Fermentas	Prod. nr SM0261

Protein markør:

Precision Plus Protein™ Standards.....	BioRad	Prod. nr 161-0363
Protein Marker Broad Range, 6-175 kDa.....	New England Biolabs,	Prod. nr P7702S

5.12. Apparater og utstyr benyttet i oppgaven

Apparater og utstyr benyttet i oppgaven er ført opp i listen nedenfor. Type og produsent er ført opp.

Agarosegelelektroforese.....	Biomax QS 710/MP1015, Kodak.
Dialysepose.....	Pierce SnakeSkin.
DNA-sekvensering.....	ALFExpress. DNA sequencer, Amersham Biosciences
Dyrkningsinkubatorer.....	Model T-51, New Brunswick. Scientific Co. Inc. Model G-25, New Brunswick. Scientific Co. Inc.
Fotoutstyr.....	Avanti. J-25, Beckman, Polaroid MP-4, svart/hvitt.
Gel-tørker.....	Savant med Edwards nr. 5 vakumpumpe.
Kuvetter.....	1938 PS Mikrokuvetter, dispolab Kartell. Kvartskuvetter, Starna Ltd. Plastkuvetter, Saarstedt
Luminescens spektrometer.....	Model LS50B, Perkin Elmer.
Magnetrorer.....	Combimag RCO, IKA.
PCR-blokk.....	PTC-100, MJ Research Inc. PTC-200, MJ Research Inc.
pH-meter.....	pH meter 28, Radiometer Copenhagen.
Pipetter.....	Jencons, Sealpette
Pipettespisser.....	Saarstedt.

Plast-rør.....	15 og 50 ml rør, Saarestedt. 1,5 ml eppendorf-rør, Saarestedt. 0,5 ml PCR- og sekvenserings-rør, Saarestedt.
SDS-PAGE.....	Vertikal Mini-Slab Gel-system, Hoefer. BioRad Criterion. Cell
Sentrifuger.....	Microfuge, Qualitron Inc. Biofuge pico, Heraeus instruments.
Spektrofotometer.....	UV-1601, Shimadzu.
UV-illuminator.....	Ultraviolet Products Inc. U.S.A.
Vakuumfilter.....	0,45 μ m, Saarestedt.
Vannbad.....	Tempette junior TE-8J, Techne.
Varmeblokk.....	DB-2D, Techne.
Vippebord.....	Duomax 1030, Heidolph
Vortexer.....	MS1 Minishaker, IKA

REFERANSER:

Referanselisten er satt opp I alfabetisk rekkefølge ut i fra etternavn på første forfatter. Referansene inneholder videre medforfattere, utgivelsesår, tittel på referansen, navn og utgave (nummer) av tidsskrift eventuelt bok.

Amblar, M., de Lacoba, M.G., Corrales, M.A. & Lopez, P. (2001) Biochemical analysis of point mutations in the 5'-3' exonuclease of DNA polymerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 19172-19181

Ansorge, W., Kristensen, T., Sproat, B. & Voss, H. (1992) DNA Sequencing: advanced approaches, automated methods and analysis. *EMBO practical course*: 53-54.

Astatke, M., Grindley, N.D. og Joyce, C.M. (1995) Deoxynukleoside triphosphate and pyrophosphate binding in the catalytically competent ternary complex for the polymerase reaction catalyzed by DNA polymerase I (Klenow fragment). *J. Biol. Chem.*: **270**(4), 1945-1954.

Astatke, M., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. (1998) How *E.coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) distinguishes between deoxy- and dideoxynucleotides. *J. Mol. Biol.* **203**: 147-165.

Beese, L.S., Derbyshire, V. & Steitz, T.A. (1993) Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* **260**: 352-355.

Beese, L.S., & Steitz, T.A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* **10**: 25-33.

Bones, A., (2003) *Kapittel 8. Recombinant DNA and genetic engineering*. [online] Forelesningsnotater i BI211 Vår 2003. Lastet ned 15. november 2004, fra <http://boneslab.bio.ntnu.no/BI211/Bi211Kap8-03.html>

Braithwaite, D.K. & Ito, J. (1993) Compilation, alignment and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **21**: 787-802.

Brandis, J., Bloom, C. & Richards, J. (1998) DNA polymerases having improved labelled nucleotide incorporation properties. Pat.nr. **WO 9840496**.

Brock, T.D & Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen.n and sp.n., nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, **98**(1), 289-297.

Brown, T.A (2002) Genomes, 2nd edition, *BIOS Scientific Publishers*.

Cabelleira, N., Nazabal, M., Brito, J. & Garcia, O. (1990) Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB-8, useful in polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**(3): 276-281.

Carroll, S.S., Cowart, M. & Benkovic, S.J. (1991) A mutant polymerase I (Klenow fragment) with reduced fidelity. *Biochemistry* **30**: 804-813.

- Carver, T.E., Hochstrasser, R.A. & Millar, D.P. (1994) Proofreading DNA: Recognition of aberrant DNA termini by the Klenow fragment of DNA polymerase I. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10670-10674.
- Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, **127**(3), 1550-1557.
- Cline, J., Braman, J.C. & Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acid Res.* **24**: 3546-3551.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. & Argos, P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases *Protein Eng.* **3**: 461-467.
- Derbyshire, V., Grindley, N.G.F. & Joyce, C.M. (1991) The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J.* **10**:17-24.
- Edvardsen, H. (2000) Kloning, ekspresjon, karakterisering og rensing av de rekombinante polymerasene KlenTthWT og KlenTthFS. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt, UiO.*
- Eisentahl, R., og Danson, M.J. (1992) Enzyme assays, a practical approach. *Oxford University Press.*
- Engelke, D.R., Krikos, A., Bruck, M.E. & Ginsburg, D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **191**, 396-400.
- Eom, S.H., Wang, J. & Steitz, T.A. (1996) Structure of *Taq* polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* **382**:278-281.
- Filée, J., Forterre, P., Sen-Lin, T. & Laurent, J. (2002) Evolution of DNA polymerase families: Evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J. Mol. Evol.* **54**: 763-773.
- Flåtten, I. (2003) Mutagenese, ekspresjon og karakterisering av DNA polymerase I fra den varmestabile bakterien *Thermotoga Maririma*. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt, UiO.*
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R. & Steitz, T.A. (1988) Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8924-8928.
- Friedberg, E.C. (2001) Why do cells have multiple error-prone DNA polymerases? *Environ. Mol. Mutagen* **38**: 105-110.
- Gerlach, V.L., Aravin, L., Gotway, G., Schultz, R.A., Koonin, E.V. & Friedberg, E.C. (1999) Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11922-11927.

- Goodman, M.F. & Tiffin B. (2000) The expanding polymerase universe. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **Nov**;1(2):101-109.
- Hamilton, S.C., Farchaus, J.W. & Davis, M.C. (2001) DNA polymerases as engines for biotechnology. *Biotechniques* **31**: 370-383.
- Herbert, R.A. (1992) A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *TRENDS Biotechnol.* **10**: 395-402.
- Johnson, R.E., Washington, M.T., Prakash, S. & Prakash, L. (1999) Bridging the gap: A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12224-12226.
- Joyce, C.M., & Steinz, T.A. (1994) Function and structural relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 777-882.
- Joyce, C.M., & Steinz, T.A. (1995) Polymerase structures and function: Variations on a theme? *J. Bacteriol.* **177**(22): 6321-6329.
- Karshikoff, A. & Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *TRENDS Biochem. Sci.* **26**: 550-556.
- Kelmn, Z., Hurwitz, J. & O'Donnell, M. (1998) Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure* **6**: 121-125.
- Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. & Beese, L.S. (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* **391**: 304-307.
- Klenow, H. & Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **65**: 168-175.
- Kornberg, A. & Baker, T. (1992) DNA replication, 2nd edition. W. H. Freeman & Company, New York, USA.
- Kornberg, A., Lehmann, I.R., Bessman, M.J. & Simms, E.S. (1989) The early history of DNA polymerase: a commentary by Arthur Kornberg. *Biochim. Biophys. Acta* **1000**: 53-56.
- Kornberg, T. & Gefter, M.L. (1971) Purification and DNA synthesis in cell-free extracts: Properties of DNA polymerase II. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 761-764.
- Kornberg, T. & Gefter, M.L. (1970) DNA synthesis in cell-free extracts of a DNA polymerase-defective mutant. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **6**: 1348-1355.
- Kristiansen, B.E. (2000) Kloning, ekspresjon og karakterisering av DNA polymerase I fra eubakterien *Chloroflexus auranticus*. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt, UiO*.
- Kristensen, T., Voss, H., og Ansorge, W. (1987) A simple and rapid preparation of M13 sequencing templates for manual and automated dideoxy sequencing. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5507-5516.

- Kristjansson, J.K. (1992) Thermophilic bacteria. *Boca Raton, Fla. : CRC Press.*
- Kumar, S. & Nussinov, R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1216-1233.
- Kunkel, T.A & Bebenk, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 497-529.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K. Chang, S.Y., Landre, P.A., Abramson, R.D. & Gelfand, D.H. (1993) High level of expression, purification, and enzymatic characterization of full length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res.* **2**(4):275-287.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummon, R., Gelfand, D.H. (1989) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*: **264**(11), 6427-6437.
- Li, Y., Korolev, S. & Waksman, G. (1998) Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J.* **17**: 7514-7525.
- Li, Y., Mitaxov, V. & Waksman, G. (1998) Structure-based design of *Taq* DNA polymerases with improved properties of dideoxynucleotide incorporation. *Biochemistry* **96**: 9491-9496.
- Minnick, D.T., Astatke, M., Joyce, C.M., og Kunkel, T.A. (1996) A thumb subdomain mutant of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity. *J. Biol. Chem.*: **271** (40): 24954-24961.
- Murray, V. (1989) Improved double-stranded DNA-sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*: **17**(21): 8889.
- Myers, T.W. & Gelfand, D.H. (1991) Revers transcription and amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**(31):7661-7666.
- Pluthero, F.G. (1993) Rapid purification of high activity *Taq* polymerase. *Nucleic Acids Res.* **21**(20): 4850-4851.
- Patel, P. H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A. & Loeb, L. A. (2001) Prokaryotic DNA polymerase I: Evolution, structure and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J. Mol. Biol.* **308**: 823-837.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. & Kraut, J. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerases β , a DNA template-primer and ddGTP. *Science* **264**: 1891-1902.
- Polesky, A.H., Steitz, T.A., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. (1990) Identification of residues critical for the polymerase activity of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 14579-14591.

- Prober, J.M. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**: 336-341.
- Ruttinmann, C., Cotoras, M., Zaldivar, J. & Vicuna, R. (1985) DNA polymerase from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur. J. Biochem.* **149**(1): 41-46.
- Rønneberg, J.A. (1999) F669Y *Thermus thermophilus* DNA polymerase I. A new thermostable enzyme for dideoxy cycle sequencing. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt, UiO*.
- Røsok, Ø., Odeberg, J., Rode, M., Stokke, T., Funderud, S., Smeland, E. & Lundeberg, J. (1996) Solid-phase method for differential display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *Biotechniques* **21**: 114-121.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) Molecular cloning; A laboratory manual 3rd edition. Cold Spring Harbour, New York *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5436-5467.
- Shen Y, Tang XF, Matsui I. (2003) Subunit interaction and regulation of activity through terminal domains of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem.* **278**(23):21247-57.
- Shinkai, A., Patel, P.H. & Loeb, L.A. (2001) The conserved active site motif A of *Escherichia coli* DNA polymerase I is highly mutable. *J. Biol. Chem.* **276**: 18836-18842.
- Simpson, R.J. (2003) Proteins and proteomics; A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sloane, D.L., Goodman, M.F. & Echols, H. (1988) The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6465-6475.
- Smith, L.M. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-678.
- Sousa, R. (1996) Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *TRENDS Biochem. Sci*: 186-190.
- Steitz, T.A. (1998) A mechanism for all polymerases *Nature* **391**: 231-232.

- Steitz, T.A., (1999) DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.*: **274**(25), 17395-17398.
- Sutton, M.D. & Walker, G.C. (2001) Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair and DNA recombination. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8342-8349.
- Suzuki, M., Baskin, D., Hood, L. & Loeb, L.A. (1996) Random mutagenesis of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: Concordance of immutable sites *in vivo* with the crystal structure. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9670-9675.
- Szasz, J., Hu, G., Hujer, K.M., Domke, S.T., Brummet, S.R., Moffett, R.B. & Fuller, C.W. (1997) *ThermoSequenase*. DNA polymerase and *T. Acidophilum* pyrophosphatase: New thermostable enzymes for DNA sequencing. *Biotechniques* **22**: 758-762.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6339-6343.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1989) Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264**: 6447-6458.
- Thompson, E.H.Z., Bailey, M.F., van der Schans, E.J.C., Joyce, C.M. & Millar, D.P. (2002) Determinants of DNA mismatch recognition within the polymerase domain of the Klenow fragment. *Biochemistry* **41**: 713-722.
- Tveit, H. & Kristensen, T. (2001) Fluorescence-based DNA polymerase assay. *Anal. Biochem.* **289**: 96-98.
- Tveit, H. (2000) Kloning, ekspresjon og rensing av DNA polymerase I fra *Bacillus cereus*, og utvikling av en fluorescensbasert polymeraseaktivitetsanalyse. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt, UiO.*
- Urvi J. Desai and Patrick K. Pfaffle (1995) Single-Step Purification of a Thermostable DNA Polymerase Expressed in *Escherichia coli*. *Biotechniques*: **19**(5): 780-784.
- van der Horn, P.B., Davis, M.C., Cunniff, J.J., Ruan, C., McArdle B.F., Samols, S.B., Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **30**: 964-967.
- Voet, D. & Voet, J.G. (2004) Biochemistry, 3rd edition. *John Wiley & Sons, INC.*
- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(11): 5088-90.
- Wonnacott, T.H. og Wonnacott, R.J. (1990) Introductory statistics for business and economics, Fourth edition, *John Wiley & Sons.*
- Yu, H., Chao, J., Patek, D., Mujumdar, R., Mujumdar, S., and Waggoner, A.S. (1994) Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes, *Nucleic Acids Res.* **22**(15) 3226-3232.

Xu, Y., Derbyshire, V., Ng, K., Sun, X.C., Grindley, N.D.F & Joyce, C.M. (1997) Biochemical and mutational studies of the 5'-3' exonuclease of the DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **268**: 284-302.

Xu, Y., Potapova, O., Leschziner, A.E., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. (2001) Contacts between the 5' nuclease of DNA polymerase I and its DNA substrate *J. Biol. Chem.* **276**: 30167-30177.