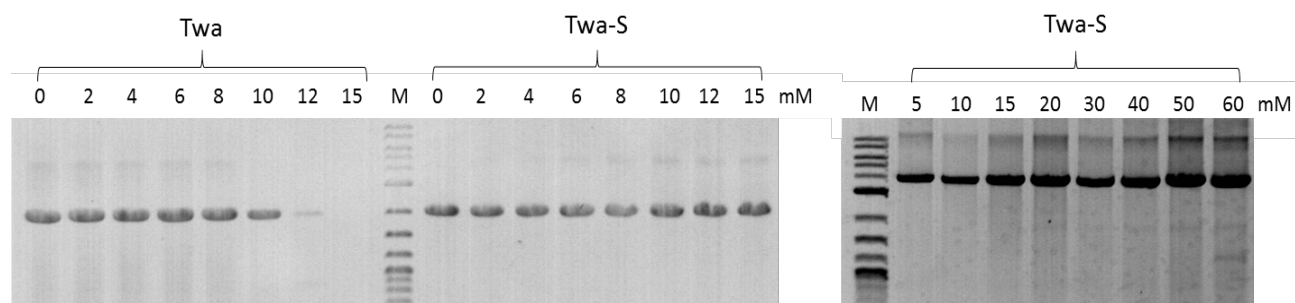
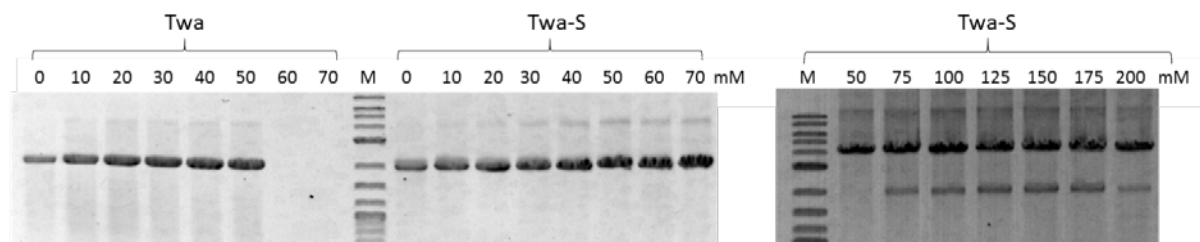


## Hybridní Twa DNA polymeráza se zvýšenou enzymatickou aktivitou

Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. byla připravena “high-fidelity” DNA polymeráza z *Thermococcus waiotapuensis* (Twa), která však vykazovala nižší procesní účinnost v PCR než některé jiné komerčně dostupné “high fidelity” DNA polymerázy. Pro zvýšení užitečných vlastností Twa polymerázy byla v rámci programu TAČR gama připravena hybridní polymeráza (Twa-S) a optimalizovaný reakční pufr ve kterém nový enzym vykazoval vyšší rezistenci k relativně vysokým koncentracím  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (**Obr. 1**) a KCl (**Obr. 2**). Ve srovnání s nemodifikovanou Twa nebo Phusion DNA polymerázou, se Twa-S polymeráza vyznačovala schopností amplifikovat delší fragmenty DNA (**Obr. 3 a 4**). Všechny 3 polymerázy přitom vykazovaly srovnatelnou “proof-reading” aktivitu, která byla přibližně 50 x vyšší než u Taq DNA polymerázy.



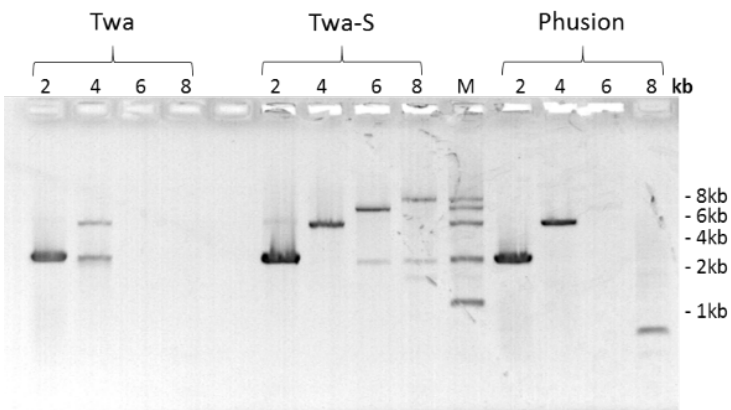
**Obr. 1. Zvýšená odolnost Twa-S polymerázy k relativně vysokým koncentracím  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .** S využitím Twa nebo Twa-S polymeráz byl amplifikován 2 kb úsek  $\lambda$  DNA v přítomnosti různých koncentrací  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . PCR amplikony byly analyzovány v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu. M, DNA marker. Výsledky ukazují, že amplifikace s využitím Twa-S polymerázy probíhá v přítomnosti 60 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , kdežto amplifikace Twa je inhibována již při 12 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



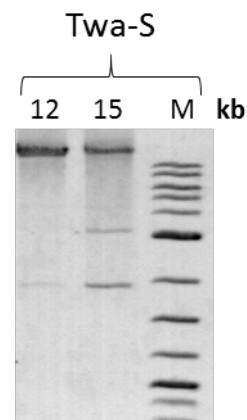
**Obr. 2. Zvýšená odolnost Twa-S polymerázy k relativně vysokým koncentracím KCl.** S využitím Twa nebo Twa-S polymeráz byl amplifikován 2 kb úsek  $\lambda$  DNA v přítomnosti různých koncentrací KCl. PCR amplikony byly analyzovány v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu. M, DNA marker. Výsledky ukazují, že amplifikace s využitím Twa-S polymerázy probíhá v přítomnosti 200 mM KCl, kdežto amplifikace Twa je inhibována již při 60 mM KCl.

**Obr. 3. Zvýšená amplifikační účinnost Twa-S ve srovnání s Twa a Phusion polymerázami.**

Pomocí PCR byly amplifikovány 2 – 8 kb úseky  $\lambda$  DNA pomocí Twa, Twa-S a Phusion polymerázami. Twa-S vykazovala vyšší účinnost při amplifikaci fragmentů 6 a 8 kb. Polymerizace trvala 50 s v každém cyklu. PCR amplikony byly analyzovány jak uvedeno v popisu Obr. 1.



**Obr. 4.** Schopnost Twa-S polymerázy amplifikovat fragmenty DNA až do velikosti 15 kb. Twa-S polymeráza byla využita pro amplifikaci 12 a 15 kb úseků  $\lambda$  DNA v optimalizovaném reakčním pufru a za optimalizovaných reakčních podmínek. Polymerizace trvala 8 min v každém cyklu. PCR amplikony byly analyzovány jak uvedeno v popisu Obr. 1.



**Závěr:** Výsledky ukazují, že Twa-S polymeráza v kombinaci s optimalizovaným reakčním pufrům má nové užitkové vlastnosti, které ji předurčují pro amplifikaci delších DNA fragmentů určených pro klonování.

V případě zájmu o další informace k výsledkům tohoto projektu a případné zakoupení neexklusivní licence na plasmid kódující tuto polymerázu se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologíí**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227 nebo 420-602 892 876).