

Wydział Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Weronika Jaroszewicz

**Konstrukcja nowego systemu prezentowania
białek/peptydów na powierzchni termofilnego
bakteriofaga TP-84**

**Construction of a novel phage display system
based on a thermophilic bacteriophage TP-84**

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Katedra Biologii Molekularnej

GDAŃSK 2022

Spis treści:

1. Streszczenie.....	5
2. Abstract.....	6
WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	7
3. Wstęp.....	8
4. Cel pracy	37
5. Materiały i metody	38
5.1. Materiały	38
5.1.1. Odczynniki chemiczne.....	38
5.1.2. Szczepy bakteryjne i bakteriofagi.....	39
5.1.3. Plazmidy.....	40
5.1.4. Oligonukleotydy	40
5.1.5. Enzymy i odczynniki stosowane do manipulacji DNA	46
5.1.5.1. Enzymy restrykcyjne	46
5.1.5.2. Inne enzymy i odczynniki używane do manipulacji DNA oraz immunodetekcji znakowanych białek kapsydowych bakteriofaga TP-84	47
5.1.6. Odczynniki do elektroforezy agarozowej	48
5.1.7. Bufory	48
5.1.8. Podłoża i pożywki	49
5.1.9. Antybiotyki	50
5.1.10. Zestawy komercyjne	51
5.1.11. Materiały podstawowe	51
5.1.12. Aparatura, sprzęty i materiały laboratoryjne.....	51
5.1.13. Usługi.....	52
5.1.14. Programy komputerowe i strony internetowe	53
5.2. Metody.....	53
5.2.1. Metody hodowli <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10, bakteriofaga TP-84, oczyszczanie lizatów bakteriofagowych.....	53
5.2.1.1. Namnażanie <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10.....	53
5.2.1.2. Namnażanie bakteriofaga TP-84	54
5.2.1.3. Oczyszczanie i zagęszczanie lizatu bakteriofagowego.....	54
5.2.1.4. Oznaczanie miana lizatu bakteriofagowego metodą płytek dwuwarstwowych.....	55

5.2.2. Transfekcja protoplastów <i>G. stearothermophilus</i> 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84.....	57
5.2.2.1. Przygotowanie protoplastów bakterii <i>G. stearothermophilus</i> 10	57
5.2.2.2. Transfekcja protoplastów DNA bakteriofaga TP-84.....	57
5.2.3. Izolacja DNA.....	58
5.2.3.1. Izolacja genomowego DNA bakteriofaga TP-84	58
5.2.3.2. Izolacja plazmidowego DNA z komórek <i>E. coli</i> DH5 α	59
5.2.3.3. Izolacja plazmidowego DNA z komórek <i>E. coli</i> TransforMax EPI300	59
5.2.3.4. Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego.....	59
5.2.4. Ocena ilościowa i jakościowa DNA	60
5.2.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym	60
5.2.6. Transformacja materiału biologicznego	61
5.2.6.1. Transformacja <i>E. coli</i> DH5 α	61
5.2.6.1.1. Przygotowanie komórek chemokompetentnych <i>E. coli</i> szczepu DH5 α	61
5.2.6.1.2. Transformacja komórek chemokompetentnych <i>E. coli</i> DH5 α	62
5.2.6.2. Transformacja komórek chemokompetentnych <i>E. coli</i> TransforMax EPI300	62
5.2.7. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	63
5.2.8. Klonowanie DNA	63
5.2.8.1. Klonowanie metodą RF	63
5.2.8.1.1. Projektowanie starterów.....	65
5.2.8.1.2. Pierwsza reakcja PCR	66
5.2.8.1.3. Druga reakcja PCR	67
5.2.8.1.4. Trawienie restrykcyjne z użyciem enzymu <i>DpnI</i>	68
5.2.8.2. Klonowanie metodą Gibsona	68
5.2.8.2.1. Trawienie restrykcyjne plazmidu pBAC-lacZ enzymem <i>ZraI</i>	71
5.2.8.2.2. Projektowanie starterów, amplifikacja insertów	71
5.2.8.2.3. Reakcja Gibsona	73
5.2.8.2.4. Reakcja Gibsona stosowana do uzyskania modyfikowanego materiału genetycznego bakteriofaga TP-84.....	75
5.2.8.3. Klonowanie Golden Gate	76
5.2.8.3.1. Trawienie restrykcyjne plazmidu pBAC-lacZ enzymami <i>HindIII</i> i <i>MauBI</i>	78
5.2.8.3.2. Amplifikacja insertów.....	78
5.2.8.3.3. Ligacja fragmentów	79
5.2.9. Analiza transformantów	80

5.2.9.1. Kolonijna reakcja łańcuchowa polimerazy	80
5.2.9.2. Analiza restrykcyjna plazmidów pBAC-lacZ po klonowaniu	82
5.2.10. Przygotowanie preparatów DNA do sekwencjonowania oraz analiza wyników	83
5.2.11. Immunodetekcja znakowanych białek kapsydowych modyfikowanych bakteriofagów TP-84	84
6. Wyniki i Dyskusja	86
6.1. Hodowla bakteriofaga TP-84	87
6.2. Przygotowanie biblioteki genów bakteriofaga TP-84	88
6.2.1. Klonowanie tandemowe genu 8 bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pUC19	98
6.3. Klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona	105
6.3.1. Klonowanie całego genomu TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona	109
6.3.2. Klonowanie jednego fragmentu genomu bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 pz do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona	111
6.3.3. Klonowanie trzech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ	114
6.3.4. Optymalizacja metody klonowania Gibsona	117
6.4. Klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Golden Gate	124
6.4.1. Optymalizacja metody klonowania Golden Gate	129
6.5. Transfekcja protoplastów <i>G. stearothermophilus</i> 10 rekombinowanym materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84	135
6.6. Transfekcja protoplastów <i>G. stearothermophilus</i> 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84 z dołączonym znacznikiem molekularnym FLAG na C-końcu białka kodowanego przez gen 12	140
7. Podsumowanie	145
8. Bibliografia	148
9. Wykaz rycin i tabel	151
10. Dorobek naukowy	154

1. Streszczenie

Systemy prezentowania białek/peptydów lub innych cząsteczek na powierzchni bakteriofaga bazują na fuzji sekwencji obcych polipeptydów z N- lub C-terminalnym końcem białka strukturalnego bakteriofaga, dzięki czemu docelowe peptydy/białka eksponowane są na zewnątrz wirionu. Technologia ta została opracowana ponad 30 lat temu, a jej twórcy otrzymali Nagrodę Nobla za „prezentację peptydów oraz przeciwciał na powierzchni faga”. W ostatnich latach zaobserwować można intensywny rozwój technik związanych z fagowym prezentowaniem białek/peptydów, jednak wszystkie dotychczas skonstruowane systemy bazują na bakteriofagach infekujących bakterie mezofilne, o optymalnych warunkach wzrostu od 30°C do 39°C. Niesie to za sobą pewne ograniczenia, takie jak problemy z produkcją i prezentacją hydrofobowych peptydów na powierzchni fagów lub tworzenie się agregatów rekombinowanych białek. Termostabilny system prezentowania peptydów/białek, oparty na bakteriofagu termofilnym, mógłby być rozwiązaniem tych problemów.

Głównym celem niniejszej pracy było skonstruowanie systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni bakteriofaga TP-84, infekującego Gram-pozytywną bakterię *Geobacillus stearothermophilus*. Pierwszym etapem badań prowadzących do otrzymania funkcjonalnego systemu było utworzenie trzech zestawów bibliotek genowych faga TP-84. Wybrano sześć genów, które potencjalnie mogły zostać użyte w nowym systemie prezentacji białek/peptydów, z czego trzy geny kodujące białka kapsydowe, jeden gen kodujący białko dystalne ogonka oraz dwa geny kodujące inne białka strukturalne TP-84. Następnie geny te wstawiano do plazmidu pUC19 w formie natywnej lub w formie fuzyjnej, z dołączoną sekwencją kodującą znaczniki molekularne 6xHis lub 3xFLAG, wraz z 9-nukleotydowym linkerem. Początkowo uzyskano trzy wersje bibliotek dla pięciu genów TP-84. Gen 8 bakteriofaga TP-84, kodujący dodatkowe białko kapsydu, udało się wstawić do wektora plazmidowego dopiero po opracowaniu tandemowej metody klonowania.

Drugim etapem badań było klonowanie całego genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ z indukowalnym systemem kontroli liczby kopii. Zastosowano dwie różne techniki do wstawienia genomu faga TP-84 podzielonego na osiem części o wielkości między 4200 a 6700 par zasad, klonowanie metodą Gibsona oraz Golden Gate. W wyniku zastosowania techniki klonowania Gibsona, otrzymano klon pBAC-lacZ z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 par zasad z 15-nukleotydową insercją w obrębie genomu TP-84. Nie udało się natomiast otrzymać klona z całym genomem TP-84 używając zarówno techniki klonowania Gibsona, jak i Golden Gate. Może to wskazywać na toksyczność produktów niektórych genów faga TP-84 na komórki *E. coli*.

Podczas ostatniego etapu badań skupiono się na opracowaniu metody umożliwiającej umieszczenie zrekombinowanego genomu TP-84 w komórce gospodarza. Za pomocą transfekcji z użyciem PEG8000 skutecznie transfekowano protoplasty gospodarza *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84, zarówno w formie natywnej, jak i rekombinowanej. Technika immunodetekcji potwierdziła otrzymanie aktywnych cząstek fagowych zawierających fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu połączony ze znacznikiem molekularnym eksponowanym na zewnątrz cząstki wirusa.

Podsumowując, w niniejszej pracy opracowano funkcjonalny system prezentacji białek/peptydów na powierzchni termofilnego faga TP-84. Niemniej jednak, system ten należy w dalszym ciągu optymalizować, przy czym niezbędne mogą okazać się bardziej szczegółowe badania struktury i biologii bakteriofaga TP-84 oraz jego gospodarza.

2. Abstract

Peptide/protein or other molecule phage display systems are based on a fusion of a foreign polypeptide sequence with the N- or C-terminal end of the bacteriophage structural protein, thus exposing the target peptides/proteins or other molecules on the surface of the virion. Phage display technology was developed more than 30 years ago and was awarded the Nobel Prize „for the phage display of peptides and antibodies”. In recent years, there has been an intense development in protein/peptide phage display techniques. However, all previously constructed systems are based on bacteriophages that infect mesophilic bacteria with optimum growth conditions from 30°C to 39°C. There are some limitations to these organisms, such as problems with the production and presentation of hydrophobic peptides on the phage surface or the recombinant protein aggregate formation. The solution to these limitations can be a thermostable phage display system based on a thermophilic bacteriophage.

The main purpose of this work was to construct a system to present protein/peptide molecules on the surface of TP-84 bacteriophage, which infects the Gram-positive bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. The first stage of the study involved creating three sets of the TP-84 phage gene libraries. Six genes were selected for potential usage in the new phage display system, three of them encoding capsid proteins, one gene encoding the distal tail protein and two encoding other TP-84 structural proteins. Selected genes were inserted into the pUC19 plasmid in the native or fusion form, with added sequence encoding the 6xHis or 3xFLAG molecular markers, together with a 9-nucleotide linker. Initially, three versions of the libraries were obtained for five out of six TP-84 genes. The gene 8 of the TP-84 phage, encoding a minor capsid protein, was inserted into the plasmid vector only after the development of a tandem cloning method.

The second stage of the study involved whole TP-84 phage genome cloning into the copy-control vector pBAC-lacZ. Two different techniques were used to insert the TP-84 genome, divided into eight parts (in the sizes from 4,200 bp to 7,200 bp), Gibson assembly and Golden Gate cloning. As a result of the Gibson assembly technique, a clone of pBAC-lacZ with the fragment of 6,600 bp of the TP-84 genome was obtained, with 15-nucleotide insertion. However, all attempts to obtain a clone with the whole TP-84 phage genome inserted into the pBAC-lacZ vector using both Gibson and Golden Gate cloning methods have failed. This may indicate the possible toxicity of certain TP-84 genes to *E. coli*.

During the last phase of the study, the focus was on developing a method allowing the recombinant TP-84 genome to be placed into the host cells. The PEG8000-mediated transfection was carried out with a positive result of inserting the bacteriophage TP-84 genetic material, both in native and recombinant form, into the host *G. stearothermophilus* 10. Active phage particles containing a fusion gene 12 encoding the major capsid protein linked to a molecular tag exposed to the outside of the virion were confirmed by the immunodetection assay.

In summary, in this work a functional thermophilic peptide/protein TP-84 phage display system was developed. Nevertheless, there is a requirement to continually optimize this phage display system and a more detailed research on the structure and biology of the TP-84 phage and its host may be necessary.

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

aa – aminokwasy, ang. amino acids

BAC – sztuczny chromosom bakteryjny, ang. bacterial artificial chromosome

BSA – surowicza albumina bydłęca, ang. bovine serum albumin

dsDNA – dwuniciowy DNA, ang. double-stranded DNA

G. stearothermophilus 10 - *Geobacillus stearothermophilus* szczep 10

GRM - mieszanina reakcyjna do klonowania metodą Gibsona, ang. Gibson reaction mix

ISO buffer – bufor do reakcji izotermalnej

Kbp – tysiąc par zasad, ang. Kilo base pair

LIC – klonowanie niezależne od ligacji, ang. Ligation Independent Cloning

Mbp – milion par zasad, ang. Mega base pair

MCS – miejsce wielokrotnego klonowania, ang. multiple cloning site

MDa – mega Dalton

MOI – wielokrotność zakażenia, ang. multiplicity of infection

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji, ang. Next-Generation sSequencing

obr./min – liczba obrotów na minutę, ang. revolutions per minute

OD – gęstość optyczna, ang. optical density

ORF – otwarta ramka odczytu, ang. open reading frame

PAM – motyw sąsiadujący ze zmienną sekwencją “protospacer”, ang. protospacer adjacent motif

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. polymerase chain reaction

PFU/ml - jednostki tworzące łyśinki/ml, ang. plaque forming unit/ml

pmol - pikomol

pz – par zasad

RF – termin odnoszący się do klonowania bez użycia enzymów restrykcyjnych, ang. restriction-free

3. Wstęp



FEMS Microbiology Reviews, fuab052, 1–25

<https://doi.org/10.1093/femsre/fuab052>

Advance Access Publication Date: 21 October 2021

Review Article

REVIEW ARTICLE

Phage display and other peptide display technologies

Weronika Jaroszewicz[†], Joanna Morcinek-Orłowska, Karolina Pierzynowska, Lidia Gaffke and Grzegorz Węgrzyn^{*‡}

Department of Molecular Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland

^{*}Corresponding author: Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland. Tel: +48-58-523-6024; Fax: +48-58-523-5501; E-mail: grzegorz.wegrzyn@biol.ug.edu.pl

One sentence summary: Phage display and other peptide display technologies, which allow to expose peptides on various surfaces, have been successfully employed in numerous fields, from material sciences through diagnostics to the development of novel therapeutic approaches, while novel platforms are still being developed.

Editor: Bart Thomma

[†]Weronika Jaroszewicz, <https://orcid.org/0000-0003-0294-8682>

[‡]Grzegorz Węgrzyn, <https://orcid.org/0000-0003-4042-7466>

ABSTRACT

Phage display technology, which is based on the presentation of peptide sequences on the surface of bacteriophage virions, was developed over 30 years ago. Improvements in phage display systems have allowed us to employ this method in numerous fields of biotechnology, as diverse as immunological and biomedical applications, the formation of novel materials and many others. The importance of phage display platforms was recognized by awarding the Nobel Prize in 2018 'for the phage display of peptides and antibodies'. In contrast to many review articles concerning specific applications of phage display systems published in recent years, we present an overview of this technology, including a comparison of various display systems, their advantages and disadvantages, and examples of applications in various fields of science, medicine and the broad sense of biotechnology. Other peptide display technologies, which employ bacterial, yeast and mammalian cells, as well as eukaryotic viruses and cell-free systems, are also discussed. These powerful methods are still being developed and improved; thus, novel sophisticated tools based on phage display and other peptide display systems are constantly emerging, and new opportunities to solve various scientific, medical and technological problems can be expected to become available in the near future.

Keywords: phage display; peptide display; bacteriophages; diagnostic methods; drug development; novel materials; display technologies

PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY—HISTORY AND EVOLUTION

Since the discovery of bacteriophages over 100 years ago, they have been intensively exploited in basic and applied life sciences (Sulakvelidze, Alavidze and Morris 2001). Shortly after this discovery, a new trial was launched administering phages to patients with bacterial infections, but due to variable success rates and lack of knowledge about phage biology, this method has aroused much controversy (Hess and Jewell 2020). Furthermore, due to the spread of antibiotic therapy, most researchers

lost their interest in studying bacteriophages in the context of the phage therapy. With the arrival of genetic engineering during the late 1970s, phage-based vectors were among the early cloning vehicles (Maniatis *et al.* 1978; Hines and Ray 1980; Zacher *et al.* 1980).

In the late 1980s, George P. Smith, a biologist at the University of Missouri, presented a peptide junction to the outer protein of the phage coat, which enabled surface display. In 1985, he and his coworkers introduced the term 'phage display', which denotes the display/presentation of foreign molecules, usually peptides, on the surface of filamentous phages. The

Received: 14 April 2021; Accepted: 19 October 2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

original article (Smith 1985) described insertion of the DNA sequence encoding a 57-mer peptide into the filamentous phage gene III to develop a fusion protein with the external peptide sequence within coat protein III (pIII). The chimeric protein was presented 'in an immunologically accessible form' on the phage surface, which allowed preservation of the infectivity of this virus. In 1988, Parmley and Smith attained a noticeable enhancement of phage display technology by relocating the cloning site of external DNA sequences into another part of the gene coding for the pIII protein, which made it possible to obtain an entirely functional coat protein III (Parmley and Smith 1988). This upgrade was necessary for phage multiplication through 'the affinity purification of target phages' (termed 'biopanning') from a library of billions of clones, which significantly decreased the antibody demands in comparison to the primary procedure (Barderas and Benito-Peña 2019). In the same year, whole phage particles were used for the first time to induce an immune response against displayed external peptides (De La Cruz, Lal and McCutchan 1988). In the 1990s, Winter and coworkers achieved the display of human antibody fragments, such as single-chain variable fragments (scFv), on filamentous phages (McCafferty et al. 1990). Since then, phage display has become a molecular powerful tool for selection of peptide/antibody fragments with specific binding properties from a huge number of variants (libraries) by presenting such fragments on the phage surface, and therefore generating molecular probes against specific targets (Willats 2002). In acknowledgment of these advances, George P. Smith shared Nobel Prize with Sir Gregory P. Winter 'for the phage display of peptides and antibodies'. In fact, they revolutionized chemistry as well as biopharmaceutical development, and created the foundations for new antibody discoveries, epitope mapping and affinity selection (Barderas and Benito-Peña 2019; Hess and Jewell 2020). Since the establishment of phage display libraries, significantly more applications have been available and such libraries can include sequences encoding antibodies (Parhami-Seren, Viswanathan and Margolies 2002), containing cDNA (complementary DNA) (Cramer and Suter 1993), random oligonucleotides (Noren and Noren 2001) or even enzyme-coding DNA fragments (Brunet et al. 2002). Examples of proteins/peptides functionally displayed by filamentous phages include alkaline phosphatase (60 kDa), mustard trypsin inhibitor (7 kDa), Src homolog 3 (6.5 kDa) and cytochrome b562 (11 kDa) (McCafferty et al. 1990; Ku and Schultz 1995; Hiipakka, Poikonen and Saksela 1999; Volpicella et al. 2001). Functional display of cDNA libraries was achieved by C-terminal fusion to the proteins pIII, pVI or to the Fos leucine zipper (described later) (Cramer and Suter 1993; Sidhu 2001; Brunet et al. 2002; Fernandez-Gacio, Uguen and Fastrez 2003; Amery et al. 2012). In 2012, the initial phage-display-selected molecule adalimumab (tumor necrosis factor binder) was approved by the Food and Drug Administration for the treatment of human disease (Deutscher 2019). Phage display technology made it possible to produce the first six commercialized medicines derived from antibodies, and several others, based on human antibodies and antibody fragments, are under development (Barderas and Benito-Peña 2019).

PRINCIPLE OF PHAGE DISPLAY

A successful use of any method requires good understanding of its principles, benefits and drawbacks. Thus, we aimed to start the description of the phage display technology from the presentation of its principles. Then, we will discuss various systems in more detail, presenting their advantages and disadvantages.

Phage display is a molecular technique based on a genetic modification of phage DNA in order to enable the expression of a peptide/protein/antibody fragment on the phage surface by combining them with one of the phage coat proteins (Sioud 2019). Exogenous DNA sequences of interest are introduced into a specific location in the phage genome nucleotide sequence, which encodes one of the phage coat proteins (Fig. 1). When phage infection occurs, phage gene expression begins inside the bacterial host, and the inserted peptide/antibody fragment is subsequently displayed on the surface of the phage as a combination product of the relevant genes encoding the coat protein and the cloned sequence (Arap 2005; Aghebat-Maleki et al. 2016). Therefore, if the cloned sequence is randomized, phage display libraries, providing $>10^{10}$ variants, can be constructed at the same time and stored for long term as DNA clones, rather than requiring the individual construction of various peptides or antibody fragments and the subsequent expression, purification and analysis of each particular construct (Arap 2005; Marintcheva 2017). The power of phage display technology also arises from its capability to form a physical connection between the displayed molecule (phenotype) and a DNA sequence that encodes the displayed molecule (genotype) (Aghebat-Maleki et al. 2016). Such phenotype-genotype linkage supports the selection of specific clones and allows the instant determination of the amino acid sequence of particular binders (peptides or proteins) by DNA sequencing of certain inserts in the phage genome (Azzazy and Highsmith 2002).

There are several key steps in phage display experiment, and the first one is library design, which can include several million or more DNA clones carrying target sequences that encode peptide/antibody fragments that can subsequently be replicated, transcribed, translated and displayed on the phage surface (Marintcheva 2017). Next, the library is cloned into the phage genome (either a classic vector or a phagemid system) and validated that it is functionally expressed, displaying peptides on the produced phage particles. The selection procedure, called biopanning, enables fairly easy identification of a concrete phage particle (Bábíčková et al. 2013; Marintcheva 2017). When the expression of a functional peptide/protein is proven, a library of different variants can be developed using mutagenesis methods (Marintcheva 2017). The capability to identify interactive regions of peptides, proteins or antibody fragments without prior knowledge about the type and nature of interaction is a great advantage of the phage display technology, as is the possibility of selecting from a vast number of phage particles in a small sample volume (the titer of phage lysate can be as high as 10^{14} virions per ml) due to the small size of phage virions (Arap 2005; Bábíčková et al. 2013).

BIOLOGY OF FILAMENTOUS PHAGES

Development of the phage display technology was possible only after detailed understanding of the biology of bacteriophages, and especially filamentous phages. Viruses infecting bacterial cells were used for years as models in microbiology and molecular biology, though their practical use remained rather illusory for a long time. Nevertheless, accumulating knowledge on the structure and functions of bacteriophages made it possible to employ them in developing sophisticated tools in genetic engineering and biological systems allowing for screening of huge numbers of molecules to select those of specific and desired purposes. In fact, creation of the phage display method is an excellent example for indispensability of advanced basic studies in

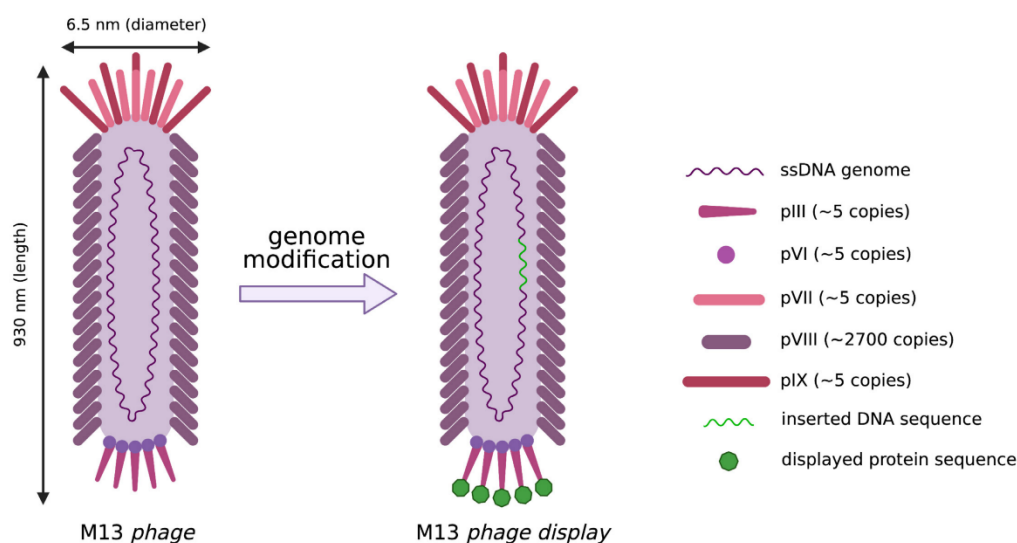


Figure 1. M13 bacteriophage virion architecture and principle of the phage display technology. M13 bacteriophage belongs to the family of filamentous phages. It has a single-stranded DNA genome, and its capsid is built of five different proteins. ‘Classical’ phage display is based on phage genome modification that consists of an in-frame insertion of a foreign sequence into one of the genes encoding capsid proteins. As a result, the phage virion particle presents heterogeneous peptide/protein on its surface (Bratkovič 2010; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013; Aghebati-Maleki et al. 2016; Gagic et al. 2016).

further development of useful practical tools that can revolutionize various fields of (bio)technology and medicine.

Ff phages (constituting a part of the filamentous phage family) are a group of elongated viruses that are capable of infecting Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, bearing F plasmid. They belong to the *Inoviridae* family and the *Inovirus* genus. In terms of phage display, the Ff group, which includes phages M13, fd and f1, is the most important of the whole filamentous phage family (Aghebati-Maleki et al. 2016). These rod-shaped bacteriophages feature the simplest capsids in terms of the number of certain protein types (Aghebati-Maleki et al. 2016). The most popular filamentous phage used in phage display technology is bacteriophage M13, mainly due to its ability to adapt long fragments of foreign DNA into its genome (Falciani et al. 2005; Pande, Szewczyk and Grover 2010; Castel et al. 2011).

The Ff group has a single-stranded (ss) DNA genome with 98% similarity across different strains, and thus, it is perfect for genetic engineering purposes (Aghebati-Maleki et al. 2016). The M13 circular 6.4 kb ssDNA genome (Fig. 2) is sealed in a protein cylinder, which measures 6.5 nm in diameter and 930 nm in length (Fig. 1) (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013; Hess and Jewell 2020). Interestingly, insertions of up to 12 kb of exogenous DNA (nearly twice the genome length of the wild-type phage) do not affect Ff phage functionality (Marintcheva 2017). The genome of an Ff phage is composed of 11 genes divided into groups based on the following functions of proteins encoded by corresponding genes: (i) capsid proteins including pIII, pVI, pVII, pVIII and pIX, (ii) DNA replication proteins called pII, pV and pX, and (iii) the assembly proteins including pI, pIV and pXI (Arap 2005; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013) (Fig. 2). Two minor coat proteins, pIII and pVI, are situated at one end of the elongated phage virion, and at the other end, and there are two additional minor coat proteins, pVII and pIX (Webster 2001; Hess and Jewell 2020). The phage capsid is composed of the major capsid protein pVIII, which polymerizes from many thousands of copies around the genome (Marintcheva 2017) (Fig. 1).

Filamentous phage infection evokes a specific kind of lyso-genic state in which the infected bacteria assemble and secrete phages into the growth medium (when cultured under laboratory conditions) (Arap 2005). At the initial stage of phage development, infection is triggered by the attachment of the phage protein pIII to the F pilus of a male *E. coli* cell (Arap 2005). During this phase, the circular ssDNA passes to the bacterial cell, where it is reshaped into a double-stranded plasmid replicative form by the replication machinery of the host cell (Arap 2005). In the course of rolling-circle replication, the replicative form produces single-stranded DNA and creates patterns for the expression of phage proteins (Arap 2005). When an appropriate concentration of phage pV protein is achieved, it attaches to the genome packaging sequence and triggers the assembly of the virion. The ssDNA is packaged into a capsid and excreted through the bacterial membrane (Russel 1991).

PRINCIPLES OF FILAMENTOUS PHAGE DISPLAY

As mentioned earlier, the first phage display system has been developed using filamentous phages (Smith 1985). Although many other display systems (based on different phages, various bacterial, yeast and mammalian cells, as well as cell-free ones) have been constructed subsequently, those based on Ff phages are still the most numerous and most used. This is due to the simplicity of the phage structure, ease of genetic manipulations with phage DNA and high efficiency of propagation of phages in bacterial cells giving a possibility to obtain huge number of virions in a short time.

The working principle of filamentous phage display relies on cloning DNA fragments that encode billions of versions of certain ligands into the phage genome, linked to the gene encoding one of the phage coat proteins (Benhar 2001). The key coat proteins for the display of foreign molecules on the phage

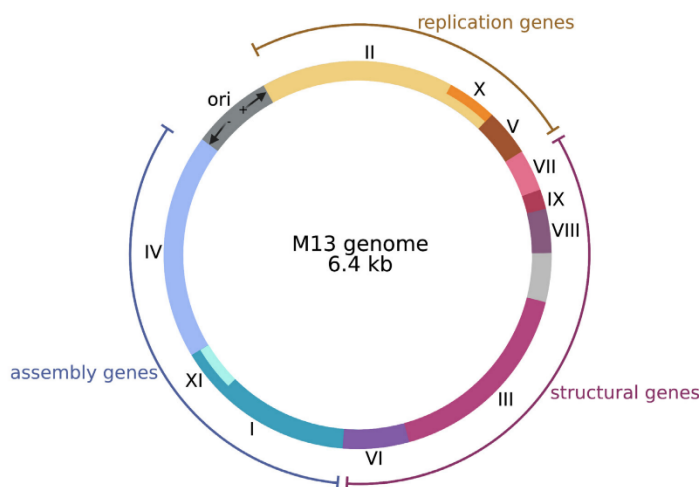


Figure 2. M13 genome organization. The genome of M13 bacteriophage contains 11 genes that can be classified into three distinct groups depending on encoded protein function: capsid structure (genes III, VI, VII, VIII, IX), DNA replication (genes II, V, X) and phage assembly (genes I, IV, XI) (Arap 2005; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

surface are pIII (406 amino acid residues) and pVIII (50 amino acid residues) (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

The pIII protein occurs at the tip of the phage in 3 to 5 copies and it is composed of three distinct domains (Omidfar and Daneshpour 2015) (Fig. 3). The N1 domain accounts for the start of the translocation of viral DNA into *E. coli* during infection, while the N2 domain provides host cell recognition by attaching the phage protein pIII to the F pilus of male *E. coli* (Omidfar and Daneshpour 2015). Presentation of the displayed protein or peptide occurs at the N-terminus of pIII, but the displayed molecules are isolated by a spacer (linker peptide) from pIII's N-terminal residue (Fernandez-Gacio, Uguen and Fastrez 2003; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). The C-terminal domain accounts for pIII integration into the phage coat and is an integral part of the capsid structure (Arap 2005; Omidfar and Daneshpour 2015). The display of the pIII protein results in a library of 3–5 copies of each particular peptide at the phage tip (Smith and Scott 1993). Relatively large molecules, up to 38 amino acids, may be incorporated into the N-terminus of the pIII protein without losing any phage infectivity (Arap 2005). In fact, among all filamentous phage coat proteins, only pIII is large enough to present several epitopes to B and T cells (Irving, Pan and Scott 2001; Aghebati-Maleki et al. 2016).

Approximately 2700 copies of the pVIII protein are tightly arranged on the phage coat, which means that by inserting the peptide coding sequence into the phage copy of the pVIII gene, up to 2700 copies of peptides with a maximum length of six amino acids can be presented along the phage capsid (Greenwood, Willis and Perham 1991; Webster 2001; Arap 2005). It is worth noting that higher copy number does not always translate into more efficient display, as factors like avidity and steric hindrance need to be taken into account. Protein pVIII has an alpha-helical structure with subtle deviations in curvature and kinking (Zeri et al. 2003; Woodburn et al. 2009; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). The pVIII helical axis is inclined ~20 degrees to the main phage particle axis (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013; Rodi, Mandava and Makowski 2015). The C-terminal part of pVIII is located

inside the phage particle near the genetic material, while the N-terminal end is exposed to the environment (Arap 2005).

In summary, two main coat proteins are suitable for the display of different types of molecules: pVIII is well suited for peptide and small protein display, but it is an ineffective platform for the display of large peptides; the pIII protein, despite its low copy number, can be utilized efficiently to display large peptides or proteins (Aghebati-Maleki et al. 2016). The key distinction in using one of the two major capsid proteins as a molecule presentation platform is display valency: peptide/antibody fragment attached to pIII can be displayed at a maximum of five copies per virion, while display on the pVIII protein allows the presentation of hundreds (type 88–described later on) or thousands of copies of peptides/antibody fragments (type 8–described later on) on a single phage particle (Bratkovič 2010). For experiments such as high-affinity antibody isolation, the use of pIII fusion is most suitable because a decreased valency is preferred. On the other hand, antibody-pVIII fusion results in high-avidity selection but probably low-affinity binding (Ebrahimizadeh and Rajabibazl 2014). In addition to the two main coat proteins, all other filamentous phage coat proteins were tested for the presentation of foreign peptides or small proteins, especially proteins pVI, pVII and pIX. However, the minor coat protein pIII and the major coat protein pVIII are by far the most widely used (Gao, Huang and Zhu 1999; Løset, Bogen and Sandlie 2011; Barderas and Benito-Peña 2019).

The most commonly used vectors in phage display systems are equipped with the P_{lac} promoter. This promoter is used to carry out the expression of fused genes coding for molecules attached to the pIII protein. The pIII display is obtained by removing or depleting the catabolic repressor (glucose) of the $lacZ$ promoter, which results in a fusion product sufficient for production of the 'monovalent' phage display (described later on) (Hoogenboom et al. 1998; Fagerlund, Myrset and Kulseth 2008). Unfortunately, display systems relying on the P_{lac} promoter are very often leaky because of the absence of the O_2 operator situated in the lac operon structural genes (Fagerlund,

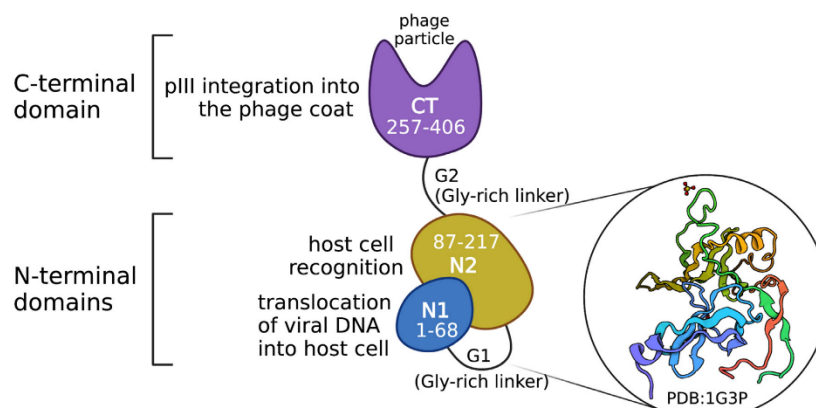


Figure 3. Structure of the pIII protein of M13 bacteriophage. The pIII protein contains two N-terminal domains, N1 and N2, joined with the G1 linker, and the C-terminal domain, CT. N- and C-terminal domains are connected with the G2 linker (Bratkovič 2010).

Myrset and Kulseth 2008). To overcome this problem, two different promoters, P_{BAD} and P_{tet} (also called $tet^{p/o}$), have been successfully used to modify the display of entire proteins connected to pIII (Fagerlund, Myrset and Kulseth 2008).

FILAMENTOUS PHAGE DISPLAY FORMATS

Depending on the specific requirements of desired constructs, and specific purposes of peptides displayed on virions, various systems of the filamentous phage display can be used. They were constructed to find optimal solutions for the efficiency of the system in the light of contradictions related to the number of displayed molecules and their size. Specific goals of experiments might require a display of either a few copies of longer peptides or maximal possible number of copies of short peptides, presentation of a desired peptide attached to either each molecule of the phage coat protein or to only some of such molecules, and location of the DNA fragment coding for a recombinant polypeptide in either a phage genome or a phagemid. All these possibilities can be achieved by using various formats of the filamentous phage display system.

All vectors used in filamentous phage display technology can be categorized according to the following aspects: (i) phage coat protein type used for display, (ii) connection of the displayed peptide/protein to all copies of pIII/pVII or to some of them and (iii) the type of matrix on which the insert for display is encoded—the phage genome or other genome, such as a phagemid (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). According to Smith's classification, there are six types of phage display formats (Fig. 4) (Smith and Petrenko 1997).

Type 3 is a display vector system referring to the natural filamentous phage genome, which is represented by the ssDNA vector type (Omidfar and Daneshpour 2015). In the type 3 vector, the insert encoded by the pIII gene leads to the display of the fusion protein/peptide in all of the five pIII protein copies (Smith and Petrenko 1997). Likewise, the type 8 display results in the presentation of foreign molecules in each of the produced pVIII proteins (Smith and Petrenko 1997). The major difference between types 3 and 8 is the number of copies of the displayed peptide, up to 5 in type 3 and ~2700 in type 8. Those formats are highly effective in displaying short peptides up to 12 amino acids, because longer peptides significantly decrease infectivity

and amplification of the phage that limits the construction of diverse peptide libraries (Sidhu 2000). Type 33 is characterized by the presence of two types of pIII protein, wild type and recombinant, as two different copies of the corresponding gene are present in the phage genome. Since wild type pIII carries out phage-related functions, and it is not linked to any peptide, only some of the expressed pIII molecules are fused with foreign peptides/proteins (Smith and Petrenko 1997; Chang et al. 2020). Type 33 vectors, in comparison with type 3, are able to display longer polypeptides (proteins or antibody fragments) but with significantly lower valency (Chang et al. 2020). The same concerns type 88 vectors. To summarize, types 3, 8, 33 and 88 are based on natural phage vectors and allow for polyvalent phage display in which a foreign molecule/peptide is connected to all copies of the phage coat protein (mainly pIII and pVIII, but also sometimes pVI, pVII, pIX are used, as described later), and the genome of a phage vector contains a single recombinant coat protein gene (Petrenko 2018). Phage vectors were the first used platforms in early phage display experiments, and generally they are easier to work with. However, some drawbacks are associated with this type of vectors, such as pIII infectivity loss due to foreign peptide fusion. Moreover, the resulting polyvalent display carries a higher risk of selecting less affine binders (Castel et al. 2011). To address those issues, phagemids (hybrids of phage and plasmid vector, representing types 3 + 3 and 8 + 8), which allow monovalent display, were developed (Bass, Greene and Wells 1990).

Types 3 + 3 and 8 + 8 describe the phagemid system, and similarly to type 33 or 88, they have two copies of the pIII or pVIII gene, though they are located on distinct replicons (Smith and Petrenko 1997). The recombinant form of the pIII or pVIII gene with foreign sequences for display is located in the phagemid genome, while the wild-type gene is present in the phage genome and called the helper (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Specifically, phagemids are designed to contain the origin of replication for both the M13 phage and the *E. coli* plasmid in addition to gene III or VIII, an antibiotic-resistance gene and relevant multiple cloning sites (Mead and Kemper 1988). However, they do not contain any of the other structural or non-structural genes necessary for folding a complete, functional phage (Azzazy and Highsmith 2002). Phagemids can be used as plasmids, which allows the use of molecular biology tools for phagemid manipulation, or can be packaged as a recombinant

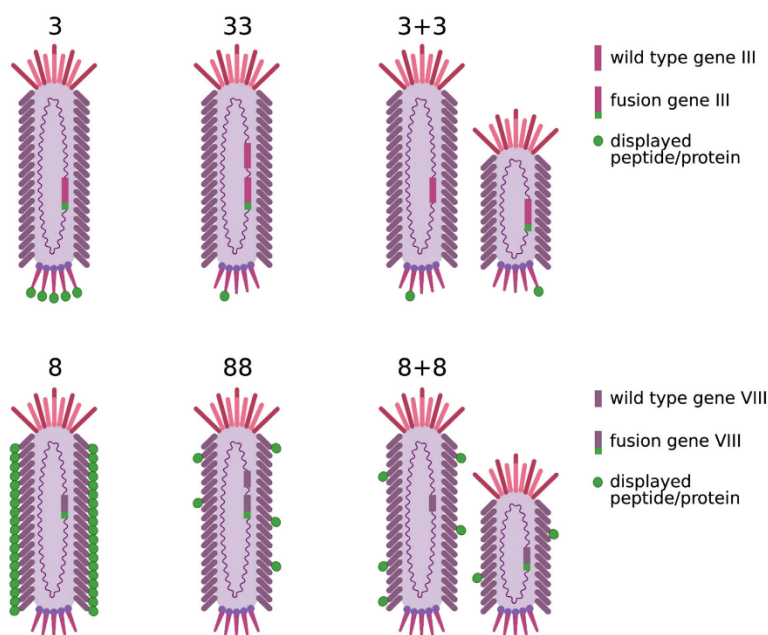


Figure 4. Major phage display formats. The initial classification of phage display formats, proposed by Smith, distinguished six types of phage display formats and took into account the phage coat protein type used for display, connection of the displayed peptide/protein to all copies of specific coat protein or to a part of them, and the type of replicon in which the insert for display is located (Bratkovič 2010; Huang, Bishop-Hurley and Cooper 2012; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

M13 phage using the helper phage, which contains a somewhat defective origin of replication and provides, *in trans*, all the wild-type structural proteins essential for the production of a phage particle (Azzazy and Highsmith 2002; Marintcheva 2017). 'Wild-type helper phage' refers to a helper phage that encodes all virion proteins. This phage usually has an Ff origin of replication that is resistant to interference and/or a curtailed packaging signal and an additional (plasmid-derived) origin of replication, which allows selective replication and packaging of phagemid ssDNA, so that ~90% of secreted virions are 'phagemid particles' instead of helper phages (Barbas et al. 2001). A major benefit of a phagemid vector is the ability to produce one copy of each protein/peptide per phage particle (monovalent display), preventing avidity effects because of the expression of many copies of the displayed peptide, and therefore enhancing the selection stringency (O'connell et al. 2002; Jestin 2008; Castel et al. 2011). Phagemid vectors are also applicable in toxic protein display because their expression can be triggered at the same time as phage infection under inducible promoter control (Beekwilder et al. 1999). Nonetheless, an increased incidence of plasmid instability and gene deletion is the main drawback of the phagemid-helper phage system. On the other hand, this problem can be overcome by placing a gene coding for the fusion coat protein under the control of a strong transcriptional promoter, although this approach is likely to increase bacterial stress (Krebber, Burmester and Plückthun 1996).

The major difference between phagemid display and phage vector display lies in the valency (Fig. 5)—the viral vectors create only polyvalent display, while the phagemid/wild-type helper vectors could create a monovalent display, where valency is decreased, because displayed peptides/antibody fragments are diluted (Armstrong et al. 1996). Monovalent display is most

commonly accomplished with the 3 + 3 vector system, and it allows to discriminate between low- and high-affinity binders due to decreased valency, and hence decreased avidity, whereas polyvalent display (especially on pVIII) is more suitable for low-affinity binders' selection, since the virion avidity offsets the low affinity of individual peptides (Armstrong et al. 1996; Shalom and Shoham 2003; Huang, Bishop-Hurley and Cooper 2012; Omidfar and Daneshpour 2015). Monovalent display technology is highly efficient during selection of strong binders from complex antibody libraries due to low valency of antibody fragments on the phage surface. Moreover, it decreases the risk for modifications in phage infection because of the low number of chimeric proteins on the phage surface (Sidhu 2001; Castel et al. 2011). On the other hand, polyvalent display is preferred for selection of weakly binding or rare clones, and it also might be required if the initial library does not include all possible sequences, and therefore, there may be no high-affinity binders included (Lowman 1997; Sidhu 2001; Castel et al. 2011).

BENEFITS AND OBSTACLES OF FILAMENTOUS PHAGE DISPLAY

Phage display technology offers a wide range of benefits, such as swiftness, simplicity and a low-cost methodology for binders' identification, compared with traditional screening methods including blue-white screening, restriction mapping or colony PCR (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). The major strength of filamentous phage display is its capacity to generate an immensely diverse library of peptides or proteins displayed on the phage surface. Furthermore, it is possible to adjust affinity selection conditions and formats for desired properties, and the selected clones can be easily identified through DNA sequencing

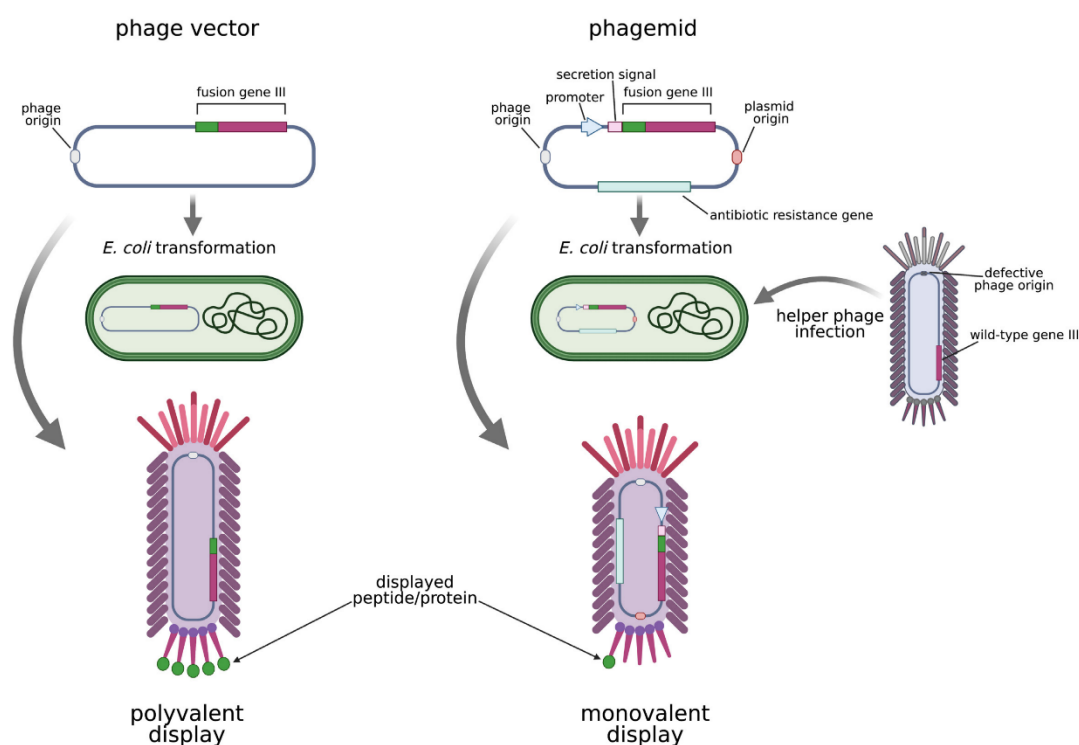


Figure 5. Comparison of a phage vector and a phagemid. The main difference between phage vector and phagemid is display valency. If the phage vector contains only one copy of a recombinant gene encoding displaying capsid protein, the resulting phage display is always polyvalent. The use of a phagemid, in turn, generates the display of lower valency (in the case of pIII mostly monovalent) as the helper phage provides the wild-type copy of the coat protein that is usually expressed more efficiently than the recombinant one (Hoess 2001; Willats 2002).

(Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Importantly, because filamentous phages are semi-lysogenic, they can replicate and shed constantly without killing the bacterial host (Hess and Jewell 2020). Another major advantage of filamentous phages is their ability to produce a very high titer (up to 10^{14} phages per ml). This ability to produce very large viral stocks comes from the lack of replication regulation and the capacity for episome transfer during cellular division into daughter cells (Marintcheva 2017). These properties allow phage production to be very fast and sustainable, facilitating rapid selection of protein-based hits for therapeutic purposes (Marintcheva 2017; Hess and Jewell 2020). Additionally, phage display provides certain benefits in the antibody discovery field in comparison to *in vivo* techniques that require animal immunization, including the full control of the experiment at every stage, which provides a high level of customization for direct and rational antibody discovery, thus, providing a significant increase in their therapeutic efficacy, as well as the reduction of animal usage (Laustsen et al. 2021).

On the other hand, traditional filamentous phage display, including production and display of peptides on the filamentous phage surface, followed by colony picking (biopanning), functional testing (e.g. ELISA test) and Sanger sequencing of positive clones, presents certain drawbacks (Bratkovič 2010). All filamentous phage capsid proteins are necessary for phage growth; therefore, there are large restrictions on protein arrangement changes (Marintcheva 2017). It is possible to insert long fragments of foreign DNA, but the subsequent phages are then

much larger and therefore are less stable and have a slower propagation rate (Marintcheva 2017). The traditional filamentous phage display approach is incompatible if the cDNA has an inherent stop codon at the 3' portion of the gene transcript (Bratkovič 2010). Both the main capsid proteins pIII and pVIII require a leader peptide sequence at the N-terminus to reach the periplasm, and any fusion genes encoding those proteins must therefore be inserted in the exact reading frame between the leader sequence and the mature coat protein-coding region (Bratkovič 2010). Another drawback of the filamentous phage display arises from the fact that peptides or proteins fold in the *E. coli* periplasm only when the phagemid has periplasm leader sequences upstream of the gene of interest, otherwise cytoplasmic expression occurs. However, cytoplasm contains multiple pathways for the reduction of disulfide bonds, which results in the impaired conformation and biological function of the displayed peptide or protein, and therefore, display on Ff phages is suitable mainly for surface and secreted proteins folded in the periplasm of *E. coli* (Gagic et al. 2016). The filamentous phage-specific semi-lysogenic life cycle also presents some limitations for the successful display of peptides or proteins. Filamentous phages are released from the host cell without disrupting the cell membrane integrity, therefore, proteins forming the capsid must cross the lipid bilayer of the inner membrane. Thus, if a peptide or protein has properties that prevent it from crossing the membrane, the proper transfer and assembly of the hybrid capsid protein might be stopped (Castagnoli et al. 2012).

Despite these drawbacks of the filamentous phage display system, the elasticity of this technology coupled with the unique phage properties, including phage to phage conservation, packaging and sustainability, has definitely caused changes, and it is continually implemented in discoveries and innovations in molecular and chemical engineering (Petrenko 2008; Peltomaa et al. 2016; Barderas and Benito-Peña 2019).

ALTERNATIVE FORMATS OF FILAMENTOUS PHAGE DISPLAY

Drawbacks and limitations of the classical filamentous phage display systems, described in the previous section, inspired researchers to develop alternative formats. They employ modifications of the cloning systems using 'classical' genes coding for pIII and pVIII proteins with specific modifications, the use of other phage coat proteins (pVI, pVII, pIX) as carriers of the recombinant peptides, and combinations with other systems, like antigen-displaying bacteria or synthetic peptides. Details of such alternative formats are discussed later to indicate diversity of the already available systems.

Indirect display on pIII

Indirect display on the pIII coat protein, in the form of a specific 3 + 3 display system, was achieved by Cramer and Suter in 1993 in order to resolve the filamentous phage incapacity to display cDNA (Cramer and Suter 1993). This system relies on high-affinity interactions between the Jun and Fos proteins that form a super-secondary structural subject (the leucine zipper motif) (Cramer and Suter 1993) (Fig. 6). The Jun leucine zipper is attached to the N-terminus of the pIII coat protein that results in the display of the Jun protein on the phage surface, whereas the library of cDNA is cloned to code for a C-terminal fusion to the Fos leucine zipper protein (Cramer and Suter 1993). In periplasm, Jun and Fos proteins form a coiled complex—leucine zipper, and thus, the cDNA-encoded protein is indirectly bound to the pIII and displayed on the surface of the phage (Cramer and Suter 1993). This approach theoretically solves the problem of weak cDNA display because the library inserts are fused to the C-terminus of the Fos protein that eliminates the need for an in-frame connection downstream of the insert (since cDNA inserts require to be in frame with both upstream and downstream sequences) (Rakonjac et al. 2011). However, the required procedures are more laborious, and the obtained library involves only a small fraction of all the potential recombinant gene products (Bratkovič 2010). Moreover, a major limitation of indirect pIII display is that filamentous phage particles have to be secreted across the bacterial membrane that can act as a barrier to certain clones and possibly bias the selection (Piggott and Karuso 2016).

Fusion to the C-terminus of pVI

Successful display of proteins anchored to the C-terminus of pVI in a phagemid format 6 + 6 has been described by Jespers and coworkers (Jespersen et al. 1995). In 1999, Hufton et al. presented a functional cDNA display based on fusion to the pVI protein (Hufton et al. 1999). However, this format has lower efficiency than the similar 3 + 3 format (Bratkovič 2010). Perhaps due to those lower production capacities or to restrictions of the chimera size, the use of this pVI display system has not yet gained much popularity (Piggott and Karuso 2016).

pVII and pIX display

Ff phage proteins pVI and pIX are synthesized without N-terminal signal peptides (in contrast to proteins pIII and pVIII that rely on a N-terminal leader peptide for periplasmic targeting and virion integration), and thus, they do not undergo post-translational processing (Simons, Konings and Schoenmakers 1981). This feature of pVII and pIX proteins may allow to overcome some signal sequence-dependent events that can disrupt an infectious phage particle assembly and function or negatively affect the survival of individual phage particles during biopanning (Løset and Sandlie 2012). Løset and coworkers established three peptide tags displayed on pVII that were up to 17 aa long, and had varying charges and pI values (Løset, Bogen and Sandlie 2011). In 2020, the first phage-displayed protease substrate library, employing the pVII capsid protein, was reported (Kara et al. 2020). Signal sequence-independent pIX display indicated better performance in the antibody affinity selection than the pIII display, including stronger enrichment of particular clones and selection of higher affinity and stability clones, and therefore, it could be effectively used in antigen display (Høydahl et al. 2016).

Landscape phages

The origin of 'landscape phages' is related to the significant changes in surface architecture in phages with pVIII fusions in type 8 vectors (Petrenko 2008) (Fig. 7). These changes are caused by the arrangement of thousands of copies of the foreign peptide in an ultra-tight, repeating pattern around the tubular capsid (Petrenko 2008, 2018). The guest peptides presented on the phage capsid build well-defined organic surface structures called landscapes that differ from one phage clone to another, creating a variant of polyvalent display (Petrenko 2008, 2018). In other words, landscape phages are M13 phage particles with 2–4 amino acid molecules on every wild-type pVIII coat protein substituted with random octamers (Petrenko et al. 1996). This replacement results in a fixed peptide framework that enables phage particles to have features that rely on the introduced variable peptides (Petrenko et al. 1996). Moreover, if the guest peptide is displayed on every subunit of the pVIII protein, additional features may arise due to the global architecture 'landscape' of the entire phage surface (Petrenko et al. 1996; Petrenko and Smith 2000). Polyvalent display on landscape phages impairs selection for high affinity because individually strong and weak peptide ligands cannot be differentiated due to the significant increase in avidity (Petrenko 2018).

Selectively infective phage

In selectively infective phage (SIP) technology, contrary to traditional phage display, the desired specific protein–ligand interaction is directly responsible for returning infectivity in an otherwise noninfective display phage (Krebber et al. 1997) (Fig. 8A). The main advantage of SIP over the traditional phage display is the direct junction of the productive protein–ligand interaction with phage infectivity and amplification, without a need for the elution step (Jung et al. 1999). This technology is based on the modular structure of the gene encoding the pIII protein, which is composed of three domains, N1, N2 and C-terminal (Krebber et al. 1997). In SIP, the filamentous phage infectivity is destroyed by deletion of fragment(s) of the gene III coding for the N1 and/or N2 domain(s) of pIII (Jung et al. 1999). To replace the N1 or N1-N2 regions, a peptide or protein is genetically fused to

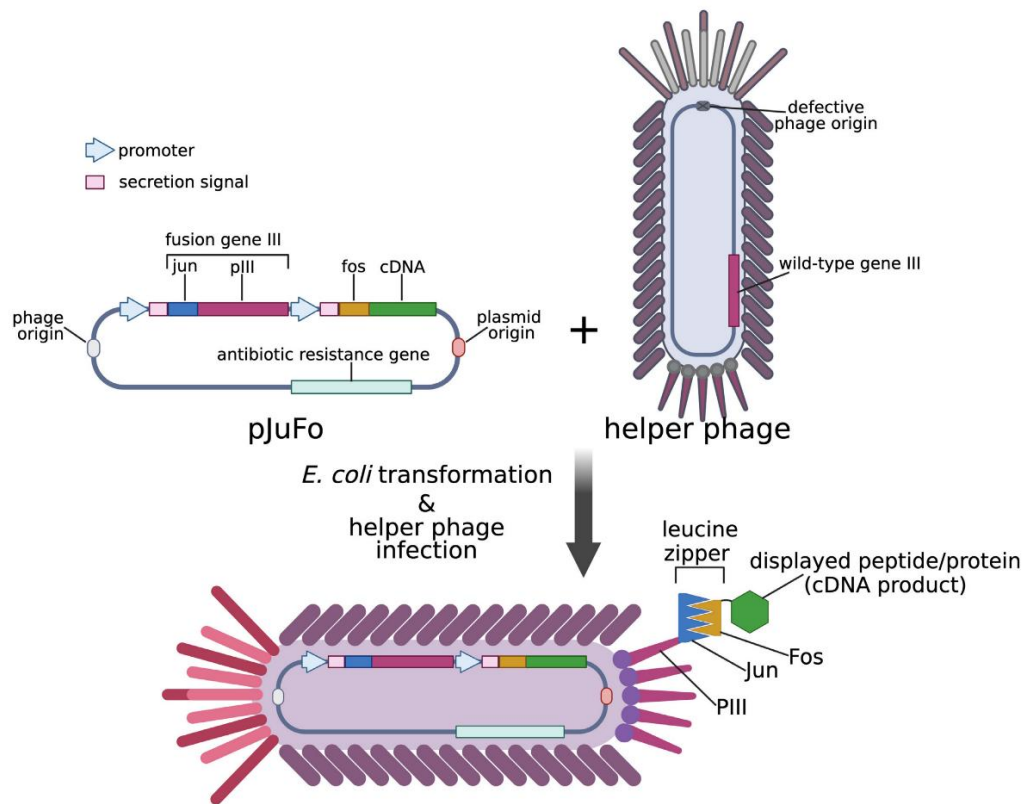


Figure 6. Indirect pIII display. An example for the system with the use of fragments of eukaryotic genes coding for Jun and Fos proteins is shown (Cramer and Suter 1993).

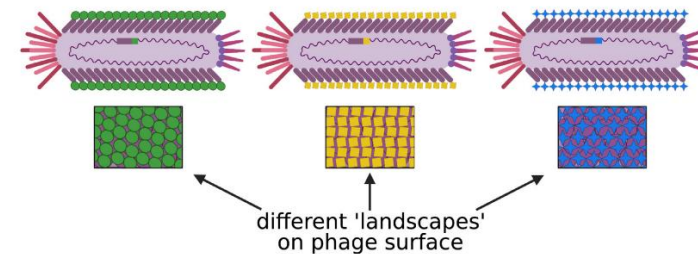


Figure 7. The idea of landscape phages. Different 'landscapes' of peptides displayed on phage surface are presented (Petrenko 2008, 2018).

the C-terminal domain or the N2-C-terminal domains of pIII that results in formation of a noninfective phage particles (Krebber et al. 1997). Since the N1 domain is necessary for infection, the N1 or N1-N2 domains must be added to restore the phage infectivity (Spada, Krebber and Plückthun 1997) (Fig. 8B). The infectivity restoring molecules, further referred to as 'adaptors', provide the missing N-terminal domains coupled to a ligand that binds to the peptide or protein displayed on the phage surface (Krebber et al. 1997). The adaptor molecule and the peptide-displaying phage particles (which are noninfective) are combined, and if the displayed peptide can bind the ligand from the adaptor,

peptide–ligand complexes are formed (Krebber et al. 1997). The N-terminal domains of pIII reconnect with the phage particles, and therefore, phages infectivity is restored (Krebber et al. 1997).

By linking protein–protein interactions to phage infectivity, the SIP technology enables for rapid identification of interacting proteins. Moreover, it is a low-background process that removes the need for the ineffective physical separation of specific and nonspecific binders, thus, it is proposed as an effective and rapid method for selecting peptide/antibody fragments with high affinity toward the antigen (Krebber et al. 1997; Hertveldt, Robben and Volckaert 2002).

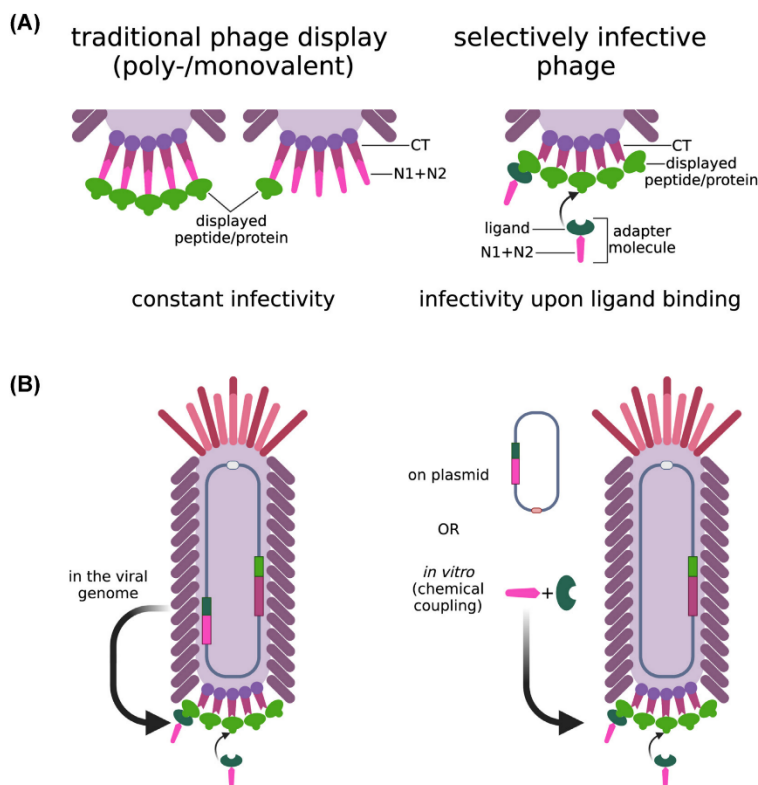


Figure 8. Selectively infective phage (SIP). (A) In the SIP technology, displayed peptide/protein is fused to the C-terminal domain of the pIII protein, whereas ligand is fused to its N-terminal domains that are responsible for phage infectivity. (B) Adapter molecule can be provided either as an phage genome-encoded molecule ('in cis') or as phagemid-encoded molecule or *in vitro* ('in trans') (Krebber et al. 1997).

Delayed infectivity panning

Delayed infectivity panning (DIP) technology combines conventional phage-displayed libraries with bacterial antigen display, where antigen-displaying bacteria are used to select antibody-displaying phage (Benhar et al. 2000) (Fig. 9). The principle of DIP is based on display of the protein sequences in multiple copies at the *E. coli* surface, obtained by constructing fusions with the hybrid Lpp-OmpA' sequence (Lpp, *E. coli* major outer membrane lipoprotein; OmpA, *E. coli* outer membrane protein) (Benhar et al. 2000). At low temperatures, bacteria do not form the F-pilus, which is necessary for phage infection, and under these conditions, target-displaying *E. coli* cells are used to capture phage (Benhar et al. 2000). Subsequently, after washing steps, bacteria with captured phages are transferred to 37°C, which facilitates F-pilus formation, and thus, enables infection by the captured phages (Benhar et al. 2000). The DIP process is very effective, therefore, it is relevant for the effective isolation of rare clones present in a large library, and should also be suitable for the isolation and characterization of not only antibodies but also any protein pairs that can be displayed on phage virions or on the surface of bacteria (Benhar 2001).

Biosynthetic phage display

Another display technology named 'biosynthetic phage display' was developed by Dwyer and coworkers in 2000 (Dwyer et al.

2000). It involves displaying one part of the protein as a fusion to the pIII or pVIII coat protein, while the other part is synthetically produced (Dwyer et al. 2000). Both chemically synthesized nonnatural amino acid parts of the displayed protein and pIII or pVIII peptide extensions are chemically connected before selection is carried out on the library (Dwyer et al. 2000). Biosynthetic display technology involves the fusion of phage display mutagenesis and peptide synthesis, thereby providing a new level of protein engineering (Bratković 2010).

OTHER PHAGE-BASED SYSTEMS

Filamentous phages are commonly used in the most often employed phage display systems. However, detailed understanding of structures, genetics and life cycles of some other bacteriophages provided a basis for construction of phage display systems with the use of other bacteriophages. Such systems have some important advantages over those based on filamentous phages, like possibility to display relatively large polypeptides or significantly more effective screening of cDNA libraries. Hence, the details of the use of other phages in developing display systems are described later, and features of such systems are discussed.

Tailed phages, which constitute the order named *Caudovirales*, have a common origin, and their virions consist of a head and a structured tail (Ackermann 1998). Lytic phages are capable of displaying larger proteins than filamentous phages due

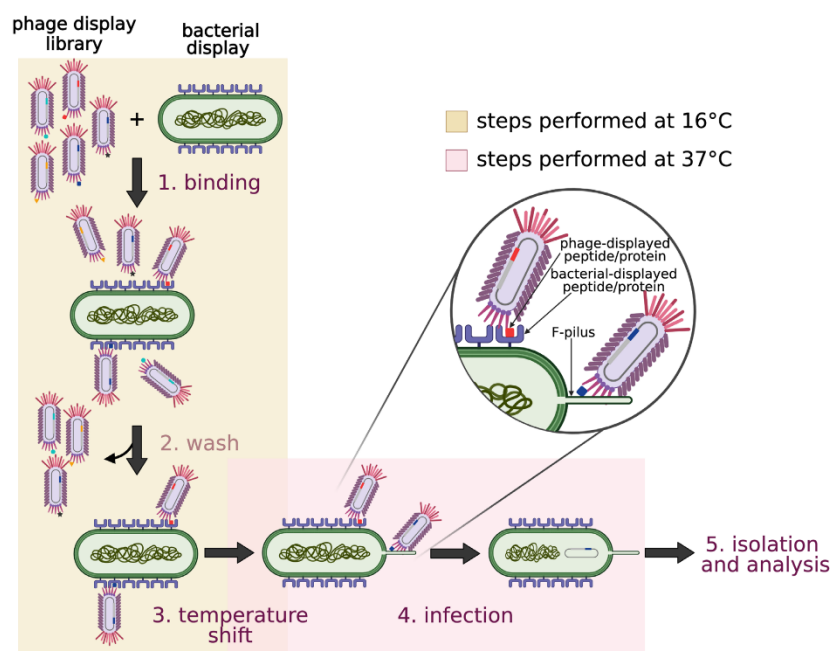


Figure 9. Delayed infectivity panning (DIP) procedure. Five steps of this procedure are distinguished, including binding of phages to bacterial cell surface, washing unadsorbed phages out, temperature shift, actual infection, and isolation and analysis of resultant phages (Benhar et al. 2000).

to their ability to carry larger fragments of foreign DNA (Martinscheva 2017). In lytic species, phage assembly occurs within the infected cell, and host cell lysis releases the progeny phages, creating new opportunities in display technologies (Bratkovič 2010). Peptides displayed on the surface of lytic phages do not have to be consistent with the host cell synthesis and secretion apparatuses; therefore, libraries may exhibit far more diversity than filamentous phage libraries (Krumpe and Mori 2006). Aside from filamentous and tailed phages, small icosahedral phages are also used in phage display systems, as they might be especially useful in presenting short peptides. Types of bacteriophages used in phage display systems (filamentous, tailed and icosahedral phages) are summarized in Fig. 10.

Bacteriophage T7

The T7 phage, a member of the *Podoviridae* family, has a 56-nm icosahedral capsid head, which is made up of 415 copies of capsid protein gp10 and has 40-kb lineal double stranded (ds) DNA genome (Bratkovič 2010). Other major proteins in the T7 phage virion are the fiber protein gp1, the connector protein gp8, the tail proteins gp11 and gp12, and proteins gp15 and gp16, which assist in phage DNA insertion (Deng et al. 2018). Both tail proteins, which form the 29-nm-long tail, enable binding of the phage to the host bacteria (Hess and Jewell 2020). The main capsid protein gp10 occurs in two different forms: the shorter 10A (344 aa), and the longer 10B (397 aa); the latter is produced due to a translational frameshift (Bratkovič 2010). A functional T7 phage capsid can be composed entirely of either 10A or 10B protein or from various ratios of the two. The assembly of T7 virions occurs in the *E. coli* cytoplasm, and progeny phages are released by cell lysis; thus, there is no need for secretion of the displayed

peptides via the periplasm and the cell membrane, as necessary for filamentous phages (Ruszel 1991). This knowledge prompted Rosenberg et al. to implement restriction sites at the 3' end of gene 10, which enabled the display of (poly)peptides as fusions to the C-terminus of the truncated protein 10B (Rosenberg et al. 1996). They developed a series of phage vectors for peptide and protein display on the T7 phage surface that were commercialized by Novagen, Merck Biosciences (Rosenberg et al. 1996). Larman and coworkers reported the establishment of a T7 phage-display polypeptide library derived from a synthetically obtained human proteome (Larman et al. 2011). The library was designed from 'tiles' with overlapping residues, and each library included 413 000 various peptides, enough to cover the human proteome (Larman et al. 2011). In this way, the entire human proteome can be screened with only one or two rounds of affinity selection (Larman et al. 2011).

A distinctive feature of the T7 phage particle is its stability in harsh environmental conditions that inactivate other phages used for display, including high temperature and low pH (Gao et al. 2010; Deng et al. 2018). Additionally, comparing to filamentous bacteriophages, T7 phages grow faster, their genome is more stable and have the capacity to display large proteins (>3000 bp DNA fragments can be successfully cloned) (Deutscher 2019). In terms of display technology, varied valency was achieved through upstream cloning of promoters of various strengths and the presence of modified translation initiation sites (Bratkovič 2010). T7 phage displaying only relatively short peptides (<50 amino acids) can be obtained at high valency. Large proteins (up to 1200 amino acid residues) are feasible but are restricted to a few copies per phage (Bratkovič 2010). The accessibility of an effective packaging system is certainly a major advantage of the T7 phage display system (Tan et al.

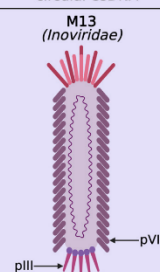
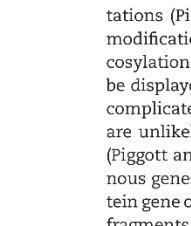
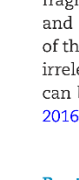
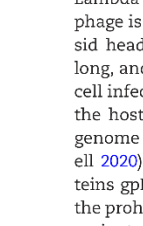
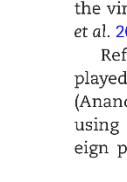

type	filamentous phages	icosahedral 'tailed' phages			small icosahedral phages	
genetic material	circular ssDNA	linear dsDNA			linear ssRNA	
phage (family)	M13 (<i>Inoviridae</i>)	λ (<i>Siphoviridae</i>)	T7 (<i>Podoviridae</i>)	T4 (<i>Myoviridae</i>)	QB (<i>Leviviridae</i>)	MS2 (<i>Leviviridae</i>)
						
capsid dimensions	930 nm x 6.5 nm	60 nm x 150 nm	56 nm x 29 nm	120 nm x 86 nm	28 nm	26 nm
genome length	6.4 kb	48.5 kb	40 kb	171 kb	4.2 kb	3.6 kb
protein(s) used for display	pIII, pVIII (rarely: pVI, pVII, pIX)	gpD, gpV	gp10B	Hoc, Soc	CP, A1 (coat proteins)	CP (coat protein)

Figure 10. Types of bacteriophages used in phage display. Apart from M13 bacteriophage that belongs to filamentous phages family, phage display can also be based on 'tailed' phages, such as T7, T4 and λ , and small, ssRNA icosahedral phages, QB and MS2. Main capsid proteins available for peptide/protein display are indicated by arrows (Tan et al. 2016).

2016). Furthermore, a more diverse library can be presented on the phage T7 surface than on the phage M13 capsid, and the display sequence shows lower charge and hydrophobicity bias (Krumpe and Mori 2006).

However, the T7 display system has some significant limitations (Piggott and Karuso 2016). Important posttranslational modifications of eukaryotic proteins, like phosphorylation, glycosylation, prenylation, and C- and N-terminal tailoring, cannot be displayed on T7 phage (Piggott and Karuso 2016). Very large, complicated, multidomain and membrane-associated proteins are unlikely to be displayed properly on the T7 phage surface (Piggott and Karuso 2016). In addition, two-thirds of the exogenous genes in T7 libraries are inserted with the phage coat protein gene out of frame, resulting in the display of random peptide fragments that are not encoded by the attached gene (Piggott and Karuso 2016). However, it is worth pointing out that many of those theoretical T7 phage display limitations are, in practice, irrelevant due to the very large number of phage particles that can be received in a small sample volume (Piggott and Karuso 2016).

Bacteriophage λ

Lambda (λ) phage is a member of the *Siphoviridae* family. This phage is characterized by an \sim 54 nm diameter icosahedral capsid head with \sim 4-nm shell thickness, a flexible tail \sim 150 nm long, and a 48.5-kb linear dsDNA genome (Nicastro 2014). Upon cell infection, λ phage can enter either a lytic life cycle and lyse the host cell or a lysogenic development in which the phage genome is integrated into the host cell genome (Hess and Jewell 2020). The λ phage genome encodes the major capsid proteins gpD (415 copies) and gpE (135–140 trimers of gpE connect the prohead to stabilize the λ capsid), the portal protein gpB, the major tail protein gpV (tubular tail is built of major tail protein V hexamer rings and is connected to the virion head (Hoess 2005), the viral protease gpC, and the scaffolding protein gpNu3 (Gao et al. 2010; Hess and Jewell 2020).

Referring to current research, polypeptides have been displayed on the λ phage surface linked to gpV and gpD proteins (Anand et al. 2021). The first λ display vector was constructed using the C-terminus of the gpV tail protein fused with foreign polypeptides (Maruyama, Maruyama and Brenner 1994).

Although constructs with the gpV protein have been used successfully for biopanning of antibody libraries, the gpV fusion system presents certain drawbacks, such as low display level and subsequently low phage recovery after affinity purification (Beghetto and Gargano 2011). To overcome these problems, the major capsid protein gpD has been explored as a display platform (Sternberg and Hoess 1995). The attachment of foreign molecules to the N- or C-terminus of gpD protein does not disturb λ phage assembly. Moreover, comparing to the filamentous phage coat proteins pIII or pVIII, higher capacity to display large domains of proteins of different sizes with less degradation of the fusion protein and in higher density, can be achieved using a two-gene system, in which both recombinant D-fusion protein and wild-type gpD are co-packaged into lambda head and subsequently co-exposed on the surface of the capsid (Sternberg and Hoess 1995; Gupta et al. 2003; Beghetto and Gargano 2011; Tan et al. 2016). Furthermore, λ vectors provide an easy way to assemble a chimeric phage because of the intracellular encapsidation of the fusion protein, similarly to phage T7 (Santi et al. 2000). This feature, combined with the protein gpD capacity to display large molecules, makes the λ display system particularly attractive to display cDNA libraries (Santi et al. 2000). Several cDNA libraries with a complexity of 10^7 – 10^8 independent clones displayed on λ was reported, such as two large cDNA repertoires from mammalian tissues (human brains and mouse embryo) (Santi et al. 2000), library of cDNA fragments from *Toxoplasma gondii* (Beghetto et al. 2001), and cDNA libraries from solid human tumors (Minenkova et al. 2003). In 2014, the λ display system was combined with the next-generation sequencing (NGS) to make a new platform, called PROLIFER (for 'phage-based representation of immunoligand epitope repertoire'), which enabled simultaneous analysis of dozens of phage-displayed antigen-specific libraries during selection, and provided increased resolution in epitope identification (Domina et al. 2014).

Bacteriophage T4

T4 phage belongs to the *Myoviridae* family, and it is characterized by an elongated icosahedral head measuring \sim 120 nm by 86 nm (Tao et al. 2019). After infection, the phage particles can enter only a lytic life cycle, which means that the bacterial host cell has to be destroyed to release replicated viral progenies

(Nicastro 2014). The genome consists of 171 kb of dsDNA that passes through the portal vertex formed by the portal protein gp20 to infect bacteria (Hess and Jewell 2020). The T4 phage capsid head has a more complicated architecture than the T7 phage, and it consists of the hexagonally stacked major capsid protein gp23 with pentamers of the corner protein gp24 at the peaks (Bratkovič 2010). Two redundant proteins symmetrically occur at the viral head: Soc (small outer capsid protein; 10 kDa, 870 copies per capsid) forms a constant entwined array, and Hoc (highly antigenic protein; 39 kDa, 155 copies per capsid), which is located in the middle of each gp23 (major capsid protein) hexagon (Bratkovič 2010). Under laboratory conditions, mutant T4 phage in which both *soc* and *hoc* genes are defective do not show a significant decrease in infectivity or replicative capacity (Ishii and Yanagida 1977). Moreover, Hoc⁻Soc⁻ capsids can be assembled *in vitro* from purified recombinant Soc and Hoc proteins with high specificity and nanomolar affinity (Qin et al. 2010). Therefore, phage T4 delivers a useful platform to display large proteins (as Soc or Hoc fusions), multi-protein complexes, or antigen fragments without negatively affecting the Soc and Hoc ability to bind to the capsid (Tao et al. 2017). The molecules displayed on the T4 phage surface can be connected to the N- and C-termini of the Soc and Hoc proteins, however, the N-terminus of Hoc is more suitable for display, because the C-terminal domain is required for the binding of the Hoc protein to the capsid (Ren, Baumann and Black 1997; Ren and Black 1998; Shivachandra et al. 2007; Fokine et al. 2011).

In 1996, Ren and coworkers designed two T4-Soc display system formats (Ren et al. 1996). In the first, peptides to be displayed were produced as C-terminal fusions of SOC and linked *in vitro* with the display platform (the phage capsid without the wild-type Soc) to create artificial T4 phage particles (Ren et al. 1996). The second display format relies on the *in vivo* incorporation of the recombinant *soc* gene into the T4 phage genome, transmitted by the positive selection plasmid pRH (Ren et al. 1996). The *soc* gene was flanked by specific T4 gene fragments in the pRH genome, which enabled homologous recombination with the T4 genome (Ren et al. 1996). Finally, bacterial cells with recombination plasmids were infected by a specifically designed phage with wild-type *soc* deletion to form fusion viral particles (Ren et al. 1996; Ren and Black 1998).

Bacteriophage T4 promotes protein display mainly as fusions of the nonessential capsid proteins Hoc and Soc, and hence, decreases the potentially destructive effects of fusions on phage stability (Marintcheva 2017). The main advantage of the T4 phage display system over other display formats is the use of T4 Hoc/Soc dual sites to present two different molecules simultaneously as fusions to Hoc and Soc on the T4 capsid surface (both the Hoc and Soc proteins have been used) (Wu et al. 2007; Tao et al. 2017). This system is appealing for cDNA expression and displays a high copy number of peptides and proteins on the surface of the T4 phage capsid (Gao et al. 2010).

Bacteriophage Q β

Q β phage is a 28-nm-diameter lytic virus of the *Leviviridae* family (Hess and Jewell 2020). A distinctive feature of this family is that it consists of the smallest and simplest phages (Hess and Jewell 2020). Their short 4.2-kb single-stranded (ss) RNA genome encodes only a few proteins: the major coat protein CP, the maturation protein A2, the coat protein A1 and the replicase (Kashiwagi and Yomo 2011). This phage binds to the F pilus of *E. coli* to insert its genome in the same way as filamentous phages, whereas the maturation protein A2 inhibits cell wall synthesis,

which triggers lysis and the release of new Q β phage particles (Reed et al. 2013). The A1 coat protein is only occasionally generated because of the leaky stop codon, and it is a target for display technology (Nchinda et al. 2021). This protein contains a 196-amino acid extension of the C-terminus of the major coat protein CP, and is necessary for infection of the host cell (Rumnieks and Tars 2011). Despite the Q β phage display is still under development, this novel display platform can be applicable in the directed evolutionary biotechnology and affinity maturation (Nchinda et al. 2021).

Bacteriophage MS2

MS2 phage, like Q β phage, belongs to the *Leviviridae* family (Hess and Jewell 2020). The infection process of MS2 phage, like that of Q β phage, has a lytic character. The 26 nm icosahedral head contains the 3.6 kb ssRNA genome that encodes the major coat protein CP, the maturation protein A, the replicase and the lysis protein L (Fu and Li 2016). While both the N- and C-termini of the major coat protein CP are necessary for assembly, there is a prominent beta-hairpin that has been used for antigen display (Fu and Li 2016). The MS2 virus-like particle (VLP) has been developed for random peptide libraries (Spingola and Peabody 1997). Furthermore, Lino and coworkers presented a functional MS2 VLP platform that displayed four genetically fused fragments of scFv (Lino, Caldeira and Peabody 2017).

EUKARYOTIC VIRUS-BASED, CELL-BASED AND CELL-FREE SYSTEMS USED IN DISPLAY TECHNOLOGIES

Apart from bacteriophage-based systems for display peptides, other biological entities have also been applied for such purposes. Peptides can be displayed on surfaces of viruses infecting eukaryotic cells, as well as on those of bacterial, yeast and mammalian cells. Moreover, cell-free display systems were developed, including ribosome display, mRNA display, covalent DNA display and CIS display. These systems are depicted schematically in Fig. 11, and major eukaryotic virus-based, cell-based and cell-free peptide display systems are discussed later.

Bacterial display

Bacterial cell surface display is a commonly used technique for presenting heterologous proteins on the Gram-positive and Gram-negative bacterial cells' surfaces, and the first examples of heterologous bacterial surface display systems were reported approximately three decades ago (Agterberg et al. 1990; Janssen et al. 1994). Peptides or proteins to be displayed on the bacterial cell surface (named the target or passenger protein) are attached to an anchoring motif (named the carrier protein) by C-terminal fusion, N-terminal fusion or sandwich fusion, depending on the features of passenger and carrier proteins (Lee, Choi and Xu 2003). For anchoring motifs, bacterial cell-surface proteins or their fragments are usually applied (Lee, Choi and Xu 2003).

The most commonly used bacterium for the bacterial display is *E. coli* due to availability of various genetic tools and mutants, and the high transformation efficiency (Lee, Choi and Xu 2003). However, the major flaw in the case of all Gram-negative bacteria is that the display of proteins may cause the outer membrane fragility (Lee, Choi and Xu 2003). Bacterial display in Gram-positive bacteria was achieved in the *Staphylococcus* and

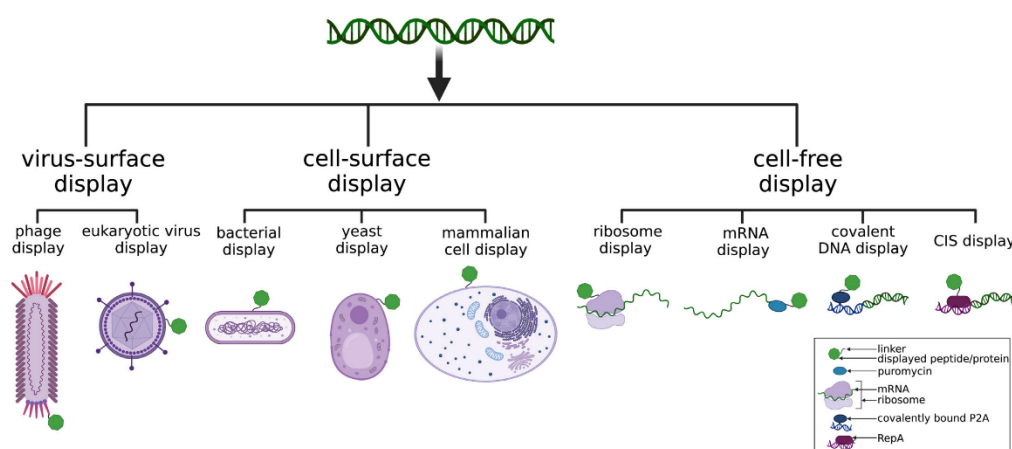


Figure 11. Types of surface display systems. The three main systems are based on virus-surface, cell-surface and cell-free displays (Lim, Choong and Lim 2017).

Bacillus genera (Lee, Choi and Xu 2003). *Bacillus subtilis* spore surface display (BSSD) technology, based on anchoring exogenous functional proteins on the spore surface (bacterial endospores are highly resistant, dormant structures formed in response to nutrient starvation and other stresses), was developed (in 2001) in order to increase the stability and functionality of these proteins, and since then it was intensively exploited in the fields of biodegradation, biocatalysts, pharmaceuticals and industrial enzymes (Isticato et al. 2001). In 2012, the first single-domain antibody library was displayed on Gram-positive bacteria, using the *Staphylococcus carnosus* system (Fleetwood et al. 2012).

Bacterial surface display technology has the capability to present antibody fragments, functional enzymes, foreign peptide epitopes and whole polypeptide libraries (Samuelson et al. 2002). Moreover, there are many potential applications of bacterial display, including the production of whole-cell biocatalysts, biosensors or bioadsorbents for heavy metals and harmful chemicals removal, and the development of live bacterial vaccine delivery systems (Benhar 2001; Lee, Choi and Xu 2003). However, the existing bacterial display systems still have some drawbacks, such as low display efficiency or passenger protein size restriction, furthermore, most applications are in the laboratory research stage (Li, Chavali and Babu 2018). Another limitation is the incapability to express complex eukaryotic proteins that require posttranslational modifications, including glycosylation and disulfide isomerization, to exhibit activity (Li, Chavali and Babu 2018).

Yeast display

Display on the yeast cell wall is possible due to incorporation a protein of interest into cell surface glycoproteins, α -1,3-mannanase or α -1,6-mannanase, which mediate interactions between yeast cells during mating of the yeast (Kondo and Ueda 2004). *Saccharomyces cerevisiae* is the most frequently used yeast species in construction of display platforms (Kondo and Ueda 2004; Lee et al. 2006; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Several different molecules have been presented on the yeast surface, such as enzymes, cytokines, scFv and Fab (antigen-binding) antibody fragments, the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Cochran et al. 2004), and peptides encoded by human testis cDNA fragments (Bidlingmaier and Liu 2006). In addition,

yeast display has been used to engineer and affinity mature several antibodies, including antibodies against cholera toxin (Tasumi et al. 2009), antibodies against antihuman immunodeficiency virus (HIV)-1 (Walker, Bowley and Burton 2009), murine monoclonal antibodies against the pandemic H1N1 virus (Shembekar et al. 2013), human antibodies against glioblastoma stem-like cells (Zorniak et al. 2017), and many more.

In recent years, there have been reported innovative studies that described posttranslationally modified peptides, displayed on yeast cells and effective incorporation of nonnatural amino acids with orthogonal reactivity in yeast-displayed polypeptides (Van Deventer et al. 2016; Hetrick, Walker and Donk 2018; Stieglitz et al. 2018). In 2018, first in vitro platform for nanobody discovery (nanobodies are small (12–15 kDa) and stable single-domain fragments of the naturally occurring heavy chain-only antibodies) were developed based on yeast surface display (McMahon et al. 2018). Yeast display technology is more suitable than bacteria-based technology when the displayed proteins require endoplasmic reticulum-specific posttranslational processing for efficient activity and folding; moreover, this type of display is compatible with fluorescence-activated cell sorting (FACS) that enables biophysical characterization and high-throughput screening of large combinatorial peptide and protein libraries (Kondo and Ueda 2004; Sergeeva et al. 2006). Even though yeast surface display technology is a relevant technique for the affinity maturation of antibody-antigen interactions, a higher glycosylation degree can impact the function and folding of engineered proteins (Cochran et al. 2009; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

Eukaryotic virus display

Eukaryotic viruses, contrary to bacteriophages, can infect cells of protists, fungi, plants and animals, including humans. Three eukaryotic viral families have been adapted for use in display technology: *Adenoviridae*, *Retroviridae* and *Baculoviridae*. Among them, adenoviruses are the most potent group for their use as gene delivery vehicles, however, in terms of direct library display and selection, they lag behind other viral groups (Sergeeva et al. 2006). Nonetheless, numerous peptides and antigens have been displayed on adenoviral capsid-display vectors, such as ovalbumin (Johrden et al. 2013), influenza A antigens (Zhou et al. 2013) or

human papillomavirus (HPV) L2 protein (Wu et al. 2015; Vujadinovic et al. 2018).

Retroviral display, another eukaryotic virus-based display platform, can be applied to display proteins, antigens and enzymes (Urban and Merten 2011). Limited library displaying laminin-binding human synthetic scFv on retrovirus surface resulted in significant antigen binder enrichment in one selection cycle (Urban et al. 2005). In 2010, Granieri et al. developed a high-throughput technique for screening of structurally complex enzyme variants by encapsulation of retroviruses displaying complex mammalian enzymes into droplets of a water-in-oil emulsion, which could be manipulated using microfluidic devices, thus, each droplet acts as an independent reaction vessel allowing for active selection of enzyme variants under multiple turnover conditions (Granieri et al. 2010).

The key feature of baculovirus/insect cell display is the ability to tolerate large insertions of exogenous DNA and to display proteins that require posttranslational modifications for full functionality. Moreover, studies on the baculovirus display format have shown that both infected insect cells and the virus itself can present peptide libraries on their surfaces (Crawford et al. 2006; Marintcheva 2017). Baculovirus/insect cell display has been applied in such areas as recombinant protein production, tissue therapy and construction of biopesticides (Tsai et al. 2020). An important application of the baculovirus display technology is its use in studies on human-infecting viruses or pseudoviruses, especially their structural proteins, as baculoviruses are safe instruments to humans (Tsai et al. 2020). Some examples of molecules displayed on the baculovirus surface include Spike (S) protein from SARS coronavirus (SARS-CoV) (Chang et al. 2004), the γ -secretase complex implicated in Alzheimer's disease (Hayashi et al. 2004), a maize cDNA-based library of peptides displayed on insect cells (Meller Harel et al. 2008) and the envelope protein of the Japanese encephalitis virus, also displayed on the insect cell surface (Du et al. 2015). Therefore, the eukaryotic virus display systems provide a promising technology. They have already been used to study the complex eukaryotic transmembrane protein functions, to replace human-infecting viruses in diagnostic or antiviral assays, and to serve as vaccine antigens (Tsai et al. 2020).

Mammalian cell display

In principle, mammalian cell display depends on antibody-encoded DNA transient transfection, and initially this technology, adapted from yeast display, was used for isolation of high-affinity antibodies in human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells (Ho and Pastan 2009). This type of display has certain advantages over other display systems, such as the presence of the endogenous eukaryotic secretion machinery that enables the proper folding and biophysical characteristics of displayed antibodies, moreover, this system allows high-throughput and rapid screening of millions of antibody-displayed cells (Parthiban et al. 2019; Robertson et al. 2020).

Originally, only relatively small libraries (up to 10^7 clones) could have been achieved through mammalian cell display, however, recent advances mostly overcome this issue, for example by expanding the library size with the use of libraries derived from immunized animals, in which initial selection and maturation of antibodies occurred *in vivo*, or by using CRISPR/Cas9 integration methods, which further helped to reduce other developability issues, such as polyreactivity, aggregation propensity and immunogenicity of displayed antibodies (Parthiban et al.

2019; Dyson et al. 2020). In 2020, Robertson and coworkers developed a novel mammalian display system allowing for antibody selection against membrane proteins in their native configuration, which increased the chance of identifying functional antibodies because only physiologically relevant epitopes were displayed (Robertson et al. 2020). Other recently described mammalian cell display system, the tetraspanin anchored (TANCHOR) display, enables reliable presentation of heterologous peptides and proteins on human cell surface and provides a new alternative platform for antibody binding studies, and other applications (Ivanusic et al. 2020). In summary, a variety of antigens, peptides and proteins have been displayed on mammalian cell surfaces (Sergeeva et al. 2006), and further development of this display system should become important in biomedical applications.

Cell-free display

Cell-free *in vitro* display techniques are transcription/translation systems extracted from various ribosome-rich sources, such as wheat germs or *E. coli*, and used for the high-throughput screening, selection and evolution of biomolecules, and thereby provide genotype-phenotype connection by covalent linkage between proteins, DNA, RNA and ribosomes without the need to introduce DNA into a cellular host (Park, Lui and Cochran 2017; Contreras-Llano and Tan 2018). The major limitations of all cell-based display platforms are the size of the library, which affects the DNA transformation effectiveness, and the eventual toxicity of the displayed molecules to the host cell (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Furthermore, most cell-based display experiments are associated with the presence of amplification bias, due to slight variations in growth rate, which can have significant influence on the overall diversity of the library, and hence, effective binders can be lost in the repeatable amplification process after each round of binding (Park, Lui and Cochran 2017). The implementation of cell-free display systems can overcome these problems because there is no transformation step, and therefore, the diversity and size of libraries are limited only by the amount of DNA that can be physically added to cell-free display systems (potentially up to 10^{14} – 10^{15} molecules), and also the possibility of toxicity or amplification biases is eliminated (Hanes and Plückthun 1997; Fitzgerald 2000; Lipovsek and Plückthun 2004). A range of cell-free *in vitro* display platforms have been developed, including ribosome display, messenger RNA (mRNA) display, covalent and noncovalent DNA display, and *in vitro* compartmentalization (Rothe, Hosse and Power 2006; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

Ribosome display

Transformation efficiency is a significant limiting phase of creating a large phage display library (Azzazy and Highsmith 2002). To address this issue, ribosome display of protein as a model of the first cell-free *in vitro* display was constructed (Mattheakis, Bhatt and Dower 1994). In ribosome display, DNA encoding a protein library is initially transcribed into mRNA (lacking a stop codon), which is subsequently purified and used for cell-free translation *in vitro* (Azzazy and Highsmith 2002; Marintcheva 2017). Then, mRNA-ribosome-peptide complexes are used for affinity selection, and afterward, mRNA is dissociated from the ribosomal complexes and undergoes reverse transcription into cDNA (Azzazy and Highsmith 2002). The produced cDNA is next amplified by PCR and employed for the next cycle of enrichment and PCR, and/or sequenced and analyzed (Azzazy and Highsmith 2002).

Cell-free *in vitro* ribosome display technology strives to concurrently select and evolve proteins from various libraries without any bacterial transformation; therefore, large libraries of peptides and folded proteins can be designed and used for selection (Hanes and Plückthun 1997; Hanes et al. 1998). The ribosome display technology has been applied to select picloram-specific variable fragments of heavy chain antibodies (Yau et al. 2003), or streptavidin (STA) binding peptides that confer higher affinity to bovine heart fatty acid-binding protein (FABP) (Lamla and Erdmann 2003). The advantages of ribosome display technology include the possibility of constructing a large and diverse library of up to 10^{12} – 10^{14} members, as well as production of proteolytically sensitive and unstable proteins, generation of toxic proteins and incorporation of modified amino acids at specific positions. Two possible limitations of this technology are RNase contamination and the intrinsic affinity of the mRNA or ribosome toward the target molecules in comparison to displayed peptides and proteins (Rothe, Hosse and Power 2006; Hamzeh-Mivehroud et al. 2013).

mRNA display

The mRNA display technology is based on the construction of a DNA library followed by cell-free *in vitro* transcription into mRNA (Nemoto et al. 1997; Roberts and Szostak 1997; Takahashi, Austin and Roberts 2003). In this approach, first, protein–mRNA complexes are developed by the cell-free translation of mRNA *in vitro*. Second, the linkage to the displayed protein is created via a short DNA–puromycin linker, which was added previously to the 3' end of the transcribed mRNA (Nemoto et al. 1997; Roberts and Szostak 1997). The resulting complex is more stable than ribosome display due to the covalent link between mRNA and displayed protein (Nemoto et al. 1997; Roberts and Szostak 1997). Moreover, the size of the puromycin DNA linker is significantly smaller than ribosome, and thus the chance to interact with an immobilized selection target is significantly lower. Therefore, mRNA display results are less biased than those in ribosome display (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Continuous attempts to use mRNA display to isolate high-affinity ligands resulted in the selection of various combinatorial or semicombinatorial libraries of peptides (Baggio et al. 2002). Other mRNA applications include the identification of drug-binding targets, protein–protein or DNA–protein interaction mapping, and the recent elucidation of protease–substrate interactions (Valencia et al. 2008).

Covalent DNA display

Bacteriophage P2 replicates by attaching replication initiator protein (P2A) to its own DNA (Lindahl 1970). This unprecedented attribute has been applied in covalent display technology (CDT) (Lindahl 1970). In covalent DNA display, linkage between the displayed polypeptide or protein and the gene is attained by forming a covalent bond between the DNA-binding protein P2A (produced as a conjunction with polypeptide) and the DNA encoding the fusion (Fitzgerald 2000). As a result, it is possible to connect the displayed protein to its own cDNA through a covalent bond (Rothe, Hosse and Power 2006). It is likely that CDT has the ability to overcome many limitations of other display systems, but it has not yet been widely used. Nevertheless, some libraries that display linear peptides or scFv attached to either the N- or the C-terminus of P2A have been described (Fitzgerald 2000; Reiersen et al. 2005).

CIS display

CIS display, a library selection system based on DNA, connects an expressed peptide/protein library to its own DNA sequence

without the need for cloning (Mathonet et al. 2011). This technique is based on the bacterial initiator protein RepA, which has a specific feature called 'cis activity'. This means that the RepA protein can be bound only to the same DNA template from which it was generated (Mathonet et al. 2011). In the translation process, the cis-element stops the ribosome, the translated RepA interacts noncovalently with its *ori* and DNA-nascent protein complexes are created (Rothe, Hosse and Power 2006). As a result, by encoding a peptide/protein library linked to RepA, the expressed library is fused to its coding DNA, and can be easily sequenced to reveal the peptide sequence (Odegrip et al. 2004). Unlike phage display, CIS display can be carried out *ex cellulo*, and as a result, it can overcome the limitations resulting from the need to transfer the DNA into bacterial cells (Mathonet et al. 2011). CIS display technique has been applied to select a high-affinity binder toward the extracellular region of human vascular endothelial growth factor receptor isoform 2 (VEGFR-2) (Patel et al. 2013), and has been integrated with NGS and bioinformatics to facilitate the design of peptides with a potential therapeutic target (Mathonet et al. 2011).

PHAGE DISPLAY LIBRARIES

A crucial point in the practical use of peptide display is vast majority of experiments and procedures, with employment of any kind of display technology, is creation and analysis of a library of displayed molecules of peptides. In this section, we discuss types of libraries, their analysis and selection, considering phage display libraries as examples of the most commonly used display systems.

A phage display library is a diversified phage clone population in which every clone contains a random foreign DNA insert and hence presents a different molecule on its surface (Smith and Petrenko 1997). The key advantage of phage display libraries is the possibility to test a vast amount of phages in every round due to the high transformation efficiency that allows to obtain the most promising binders (Aghebat-Maleki et al. 2016). Other benefits of phage libraries include low propagation costs and ease of handling due to the large number of commercial kits available to perform ordinary molecular biology tasks (Aghebat-Maleki et al. 2016). In addition, a single phage display library is generally sufficient for multiple selection cycles (biopanning) once produced, and can be stored for a long time (Chan et al. 2014). Some possible disadvantages of phage display libraries can include potential mistakes in the selection procedure because of variable expression levels of certain sequences of peptides in *E. coli* (Castel et al. 2011). Moreover, consecutive library amplifications can quickly reduce phage population diversity (Castel et al. 2011). Despite these limitations, phage display libraries are widely used especially in discovering antibodies for therapy and diagnostic purposes, and several reports about the development and implementation of this technology have been released. Based on the purpose of a specific study, two library types are commonly employed: antibody libraries and peptide libraries (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013). Library preparation and biopanning procedures are exemplified schematically in Fig. 12.

Peptide libraries

Peptide libraries are generated by using typical molecular cloning methods to insert fragments of oligonucleotides into the frame of the Ff phage coat protein genes (usually the N-terminus of pIII or pVIII) (Krumpe and Mori 2006). Subsequently, particular

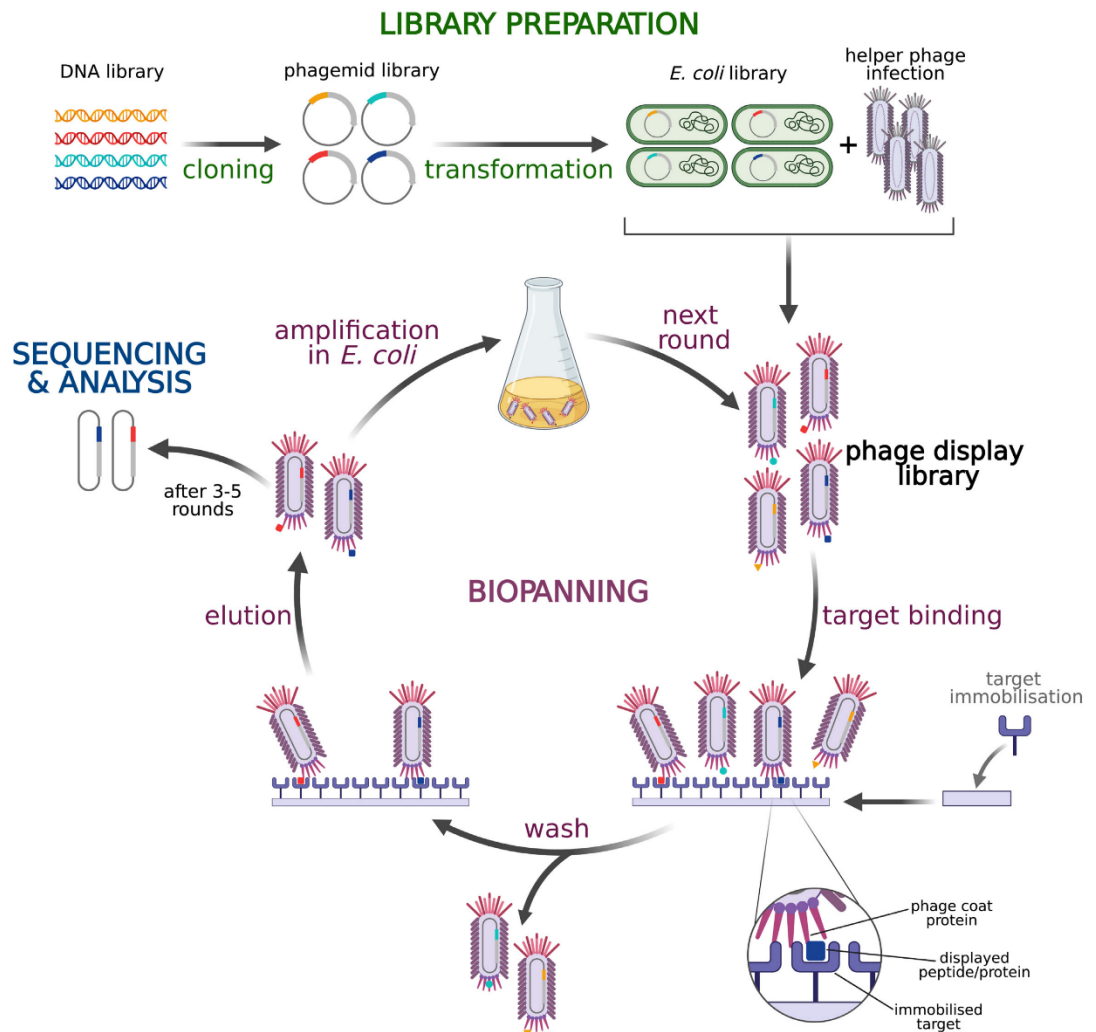


Figure 12. Library preparation and biopanning procedures based on phagemid and helper phage M13 pIII display. DNA sequences that constitute the basis of displayed peptides/proteins are primarily cloned to a phagemid vector. *Escherichia coli* cells are transformed with resulting phagemid library and, after helper phage infection, phage display library is produced. The library is affinity-screened against previously immobilized target of interest. The careful washing step is required to get rid of unbound phages. After washing, phages that interact with the target are eluted and amplified in *E. coli*. The whole cycle is repeated several (usually 3–5) times to select the most specific binders. After consecutive rounds of biopanning, the obtained sequences are functionally analyzed (Hamzeh-Mivehroud et al. 2013; Gagic et al. 2016; Barderas and Benito-Peña 2019).

peptides displayed by phages interact with a molecular target, and thus can be selected by affinity selection from a whole mixture of billions of unique displayed peptides (Krumpe and Mori 2006). Peptides are displayed on the phage surface in a linear form without well-defined 3D structure, which allows for high conformational elasticity and adaptability, however, such flexibility decreases their affinity to the target (Smith and Petrenko 1997). To overcome this problem, peptides can be structurally constrained in order to limit the number of possible conformers, and to increase independence of peptides on the phage environment (Castel et al. 2011). The most common strategy to obtain conformationally constrained peptides involves flanking

of random peptide sequences with two cysteine residues to create disulfide bridges that results in cyclization of peptides and reduction of available conformations range (Castel et al. 2011). In general, constrained peptides have a higher specificity and affinity, moreover, they exhibit a lower conformational entropy, which increases the probability of binding capacity preservation after removal from the phage context (Luzzago et al. 1993). Two different types of phage display libraries have been established: random peptide libraries (RPLs) and natural peptide libraries (NPLs) (Mullen et al. 2006).

Random peptide libraries are by far the most popular type of phage display library (Pande, Szwedczyk and Grover 2010). In RPL,

the displayed variants of peptides (from 6 to 43 amino acids in length) are encoded by synthetic inserts of random degenerate oligonucleotides (Burritt *et al.* 1995; McConnell *et al.* 1996). These libraries are most often constructed with generic CX_nN structures flanked on either side by cyclized cysteines, resulting in the expression of random peptides (7–9 amino acids in length) (Sergeeva *et al.* 2006). The main advantage of random peptide libraries is their universality, which leads to numerous applications, such as the identification of linear antigenic epitopes or other molecules with various binding capacities, or application in directed *in vitro* evolution (Mullen *et al.* 2006; Sergeeva *et al.* 2006; Kubo 2017). However, one of the RPLs disadvantages is their universal nature, because their construction mode creates the possibility to display surface peptides that are not present inside the antigen or unchanged pathogen (Lundin *et al.* 1996). On the other hand, natural peptide libraries (NPLs) are constructed by random fragmentation of DNA of the selected species, such as pathogenic microbes (Mullen *et al.* 2006). Therefore, in these libraries, the phage particles display only natural peptide fragments (Mullen *et al.* 2006). NPLs provide an important alternative to RPLs in vaccine component identification and bacterial adhesin identification (Mullen *et al.* 2006). The reason for this is the higher efficiency of NPL-selected peptides in providing an antibody response that interacts with the native pathogen compared to that of RPLs (Matthews, Davis and Smith 2002). However, it should be noted that most clones obtained from natural peptide libraries are nonfunctional (Mullen *et al.* 2006).

Antibody libraries

The first antibody library was constructed in 1990, in which the display of functional antibody fragments on the surface of phage was obtained by the introduction of the heavy (V_H) and light (V_L) chain variable regions of the antilysozyme antibody (D1.3) into a fd-tet phage vector at the N-terminus of the minor coat protein pIII (McCafferty *et al.* 1990). Antibody phage display technology was also independently developed and improved by two other research groups, namely by Breitling and Dübel (Breitling *et al.* 1991), and by Lerner and Barbas (Barbas *et al.* 1991). In principle, antibody libraries involve cloning and shuffling the V_H and V_L chain-coding regions, and there are three types of antibody libraries that can be generated: naïve, immune and synthetic libraries.

Construction of immune libraries from immunized donors is the simplest method of obtaining antibody phage display libraries (Barbas *et al.* 1991). Immune library construction involves the isolation of immunized IgG-secreting plasma cells from immunized donors, followed by amplification of the coding DNA sequences and packaging them into phage library vectors (Omidfar and Daneshpour 2015). Immune libraries are usually used to produce antibodies for a certain target in medical research and applications, moreover, they provide selection of high-affinity antibodies as a result of the affinity maturation process (Clackson *et al.* 1991; Hust *et al.* 2011; Omidfar and Daneshpour 2015). However, they present certain drawbacks, such as time-consuming donor immunization process and a requirement for construction of a new antibody library for each antigen (Bazan, Calkosiński and Gamian 2012). Additionally, generation of human antibodies and prediction of the immune response are not always possible, and often there is no immune response to toxic antigens or auto-antigens (Bazan, Calkosiński and Gamian 2012). The naïve and synthetic antibody libraries are referred to as 'universal' or 'single-pot'. Unlike immune libraries, the generation and implementation of these

libraries make it possible to determine antibodies against every possible form of antigen, but far more effort is required (Frenzel *et al.* 2017). To provide suitable binders for all potential antigen configurations, these single-pot libraries must include a far more diverse range of antibody genes in comparison to immune libraries (Frenzel *et al.* 2017). Naïve libraries are generated using reconfigured V genes from IgM (B cells) obtained from nonimmunized donors (Hust and Dübel 2004). Semisynthetic libraries can be obtained from a single antibody with synthetic randomized complementarity-determining region 3 (CDR3) on the heavy chain or from rearranged V genes derived from germline (pre-B) cells (Pini *et al.* 1998; Hust and Dübel 2004; Frenzel *et al.* 2017). In universal fully synthetic libraries, random CDRs (complementarity-determining regions) are incorporated into completely synthetic framework sequences (Tiller *et al.* 2013; Frenzel *et al.* 2017).

In phage display antibody libraries, both Fab and scFv fragments have been effectively designed and used to identify antibodies that bind a specific molecular target, however, both present some benefits and obstacles (McCafferty *et al.* 1990; Winter *et al.* 1994; Hoogenboom *et al.* 1998; Hamzeh-Mivehroud *et al.* 2013; Barderas and Benito-Peña 2019). The construction of scFv antibody fragment libraries is significantly easier by using overlap extension PCR (SOE-PCR), which can be used also for construction of Fab antibody fragment libraries, but with more difficulty (Andris-Widhopf, Steinberger and Barbas 2001; Zhu and Dimitrov 2009). The other benefit of scFv libraries includes the possibility of engineering single-chain variable fragments in multivalent formats, and thus improving the avidity toward the target (Hamzeh-Mivehroud *et al.* 2013). One of the advantages of Fab antibody fragment libraries is that the Fab fragment folded framework seems to be kinetically and thermodynamically robust (Röthlisberger, Honegger and Plückthun 2005). Moreover, Fab fragments typically have a much lower tendency to multimerize than scFv fragments, and are therefore more prone to provide affinity information rather than avidity (Barbas *et al.* 2001). However, the key drawback of Fab libraries is the overall lower levels of expression in *E. coli* in comparison with the smaller scFv fragments (Azzazy and Highsmith 2002).

Selection of the phage display libraries

When a fusion protein or antibody library is built and displayed on the phage surface, a phage clone with a specific binding affinity can be separated from the mixture of all other phages, such as nonbinding phages by a method called affinity selection (Parmley and Smith 1988). Other generic names for this procedure include immunological panning or biopanning (this term was first mentioned in a scientific article where the phage selection/isolation was based on the strong biotin/streptavidin interaction) (Parmley and Smith 1988).

The step-by-step affinity selection process involves five stages. Step I is a preparation of a phage display primary library or amplification of the already existing library (Arap 2005). Step II relies on an exposure of phage particles to an immobilized target for which specific ligands are planned to be identified (Arap 2005). Target molecule can be presented on a solid surface (such as nitrocellulose, column matrices, microplates, magnetic beads or polystyrene tubes), or alternatively the biopanning can be carried out in a solution phase (but it must be followed by an affinity capture step to isolate the target-phage complexes) (Lou and Marks 2010; Aghebati-Maleki *et al.* 2016). Step III is a washing step in which unbound or weakly bound

phages are removed (Smith 2019). In Step IV, after the washing procedure, the bound phages are eluted by breaking target-displayed molecule bond without compromising phage infectivity, usually by applying an enzymatic cleavage with trypsin, or changes in pH, but sometimes also by adding a competing ligand or denaturant agents (Pande, Szewczyk and Grover 2010; Aghebati-Maleki et al. 2016). Step V is amplification of the collected phages by infecting *E. coli* to produce an enriched pool of phages, as the new library for the next round of affinity selection (Tan et al. 2016; Smith 2019). The repetition of binding–elution–amplification steps significantly increases the proportion of the target-specific phages in high-diversity libraries; therefore, usually 3 to 5 rounds of affinity selection are required to collect phages displaying high-affinity ligands (Aghebati-Maleki et al. 2016; Ledsgaard et al. 2018). A crucial affinity selection parameter is stringency (selection pressure), which reflects the degree to which phage particles displaying high-affinity molecules are favored over phages that display low-affinity molecules (Smith 2019). The stringency during biopanning rounds is crucial in order to retain the best binding phages and it can be intensified by a gradual increase in the number or duration of washing step (Vodnik et al. 2011; Aghebati-Maleki et al. 2016). Finally, after the last round of biopanning, phage clones or the whole phage pool are analyzed in terms of specificity, and a variety of methods can be used to validate target-specific phages, such as immunostaining with antiphage antibodies through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunocytochemistry techniques, or other competitive assays such as surface plasmon resonance (SPR) (Pande, Szewczyk and Grover 2010). After biopanning procedure, DNA sequencing by Sanger method is commonly used to analyze selected phage clones individually; however, in the last two decades high-throughput methodologies, denoted as NGS, have been developed and adapted to sequencing phage display libraries in a large scale (Dias-Neto et al. 2009). NGS technology enables identification of extremely rare clones and also provides the complete sequence spectrum through analysis of the entire phage pool after every round, or last round of biopanning. Moreover, it increases the possibility to select phages with binding affinity to certain targets (Vodnik et al. 2011; Liu et al. 2015).

A number of modifications in biopanning protocol or additional selection techniques have been developed in order to improve and expand the possibilities of the standard affinity selection procedure described earlier. By *in vivo* biopanning, phage ligands able to bind to a specific organ or tissue may be identified (Arap, Pasqualini and Ruoslahti 1998). In this technique, phage particles are provided intravenously to an animal, and unspecific phages have a tendency to spread across the whole animal organism, whereas phage particles with specific target ligands accumulate in certain tissues (Takagi et al. 2007). Phage-derived ligands unique to a tissue or organ may theoretically be used for medical diagnosis or treatment by combining phages with a medication, or by attaching phage particles to nanoparticles combined with a drug, especially since a number of tumor-homing peptides have been identified through an *in vivo* phage display (Thapa et al. 2008; Pleiko et al. 2021). Recently, *in vivo* panning have been connected with NGS, allowing the identification of target-selective homing peptides and is likely to facilitate progress toward the development of affinity-guided smart drugs (Pleiko et al. 2021).

Another selection technique, the SPR biosensor technology, depends on the SPR, which is an optical phenomenon that allows monitoring the interactions between biomolecules without labeling (Jonsson et al. 1991; Malmberg et al. 1996). The SPR

biosensor system consists of the sensor microchip on which one of the interacting biomolecules is immobilized, a microfluid channel system that provides the constant injection of the other interacting biomolecule over the sensor surface, and an optical detection system that measures an SPR response that reflects the changes in mass concentrations at the surface of the sensor chip as a result of association and dissociation between molecules (Hashimoto 2000). The SPR-based biosensor analysis of phage-displayed antibodies provides more specific kinetic information, and therefore, facilitates the selection of antibodies based on their kinetic binding properties (Malmberg et al. 1996). Many applications of the SPR biosensor selection technology, combined with phage display, have been described, including detection of pathogens such as *Salmonella* (Karoonthaisiri et al. 2014) or *Staphylococcus aureus* (Liu et al. 2016), optical detection of cancer cells (Wang et al. 2016), or isolation of antibodies against dengue virus (Lebani et al. 2017).

Cell-based panning is an alternative for membrane protein binder selection in antibody libraries, since membrane proteins are often targets for therapeutic antibodies, but their purification is challenging due to the presence of the hydrophobic domain and easy denaturation during biochemical processes (Jones et al. 2016). Another selection alternative, the subtractive panning strategy, allows for selection of high-affinity and high-specificity antibodies, and it is based on changing the selection matrix and elution conditions during panning rounds (Eisenhardt et al. 2007). This selection technique allows for generation of conformation-specific antibodies that are highly demanded in biological research, therapeutics and medical diagnosis (Eisenhardt et al. 2007).

The next method, cell-based selection, employs the display of cell-surface antigens in their native form by using whole cells as the antigen source (Jones et al. 2016). Several other specific selection strategies have been developed such as antibody-guided selection using capture-sandwich ELISA (Itoh and Suzuki 2002), selection by epitope masking (Ditzel 2002), capture-lift screening (Watkins 2002), ultra-rapid selection of antibodies (Hogan, Rookey and Ladner 2018), rescue and *in situ* selection and evaluation (Vanhercke et al. 2005), selection by affinity isolation of antigen-specific B cells (Ditzel 2009), sequential antigen panning (Euler and Schuitemaker 2012), invert biopanning (Rahbaria et al. 2016) or Yin-Yang biopanning (Lim, Woo and Lim 2019).

CONCLUDING REMARKS

The introduction of phage display technology over 30 years ago provided excellent tools to expose peptides on the surface of bacteriophages. Although phage display systems based on filamentous bacteriophages are the most commonly used platforms, there are many different, sophisticated alternative forms of this technique that allow the search for peptides or proteins with remarkably large variability in properties. Therefore, the applications of phage display are extremely broad, from material sciences through diagnostics to the development of novel therapeutic approaches. In fact, there are examples that the use of phage display technology made a clear advance or had an advantage over non-phage display systems. These include discovery of antibodies under nonphysiological conditions, to identify pH-dependent antibodies with special binding properties (Bonvin et al. 2015), development of recombinant antibodies against strong toxins (Laustsen et al. 2018; Føns et al. 2020) and introduction of a methodology based on phage display technology and a cross-panning strategy, enabling the selection of

cross-reactive monoclonal antibodies (Ahmadi et al. 2020). However, despite their usefulness, the phage display methods might still be improved. For example, problems with the production and presentation of hydrophobic peptides on phage surfaces or the formation of aggregates by recombinant proteins remain unsolved. It might be assumed that the construction of a phage display system in thermophilic bacteriophages could provide a solution. However, to date, no thermophilic phages or bacteria have been used for this purpose. This is perhaps due to the requirement for detailed knowledge on phages and their hosts, while the understanding of the structure and biology of thermophilic bacteriophages is still relatively poor. Although many phage display systems are available and there are thousands of publications describing specific applications of this technique, novel and improved phage display platforms are still desired, and further studies on the practical use of phages that expose peptides on their surfaces will bring many new fascinating discoveries in various fields of science and medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Piotr Skowron, Agnieszka Żylicz-Stachula, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Paweł Sachadyn, Piotr Mucha, Michał Pikula and Arkadiusz Piotrowski for inspirational discussions. All figures were created using BioRender.com.

FUNDING

This work was supported by the Polish National Center for Research and Development (grant number TECHMAT-STRATEG2/410747/11/NCBR/2019) and the University of Gdansk within the UGrants Program (project no. 1220/61/2021; grant no. 533-D000-GA01-21).

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus Res* 1998;**51**:135–201.
- Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci* 2016;**23**:66.
- Agterberg M, Adriaanse H, van Bruggen A et al. Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. *Gene* 1990;**88**:37–45.
- Ahmadi S, Pucca MB, Jürgensen JA et al. An in vitro methodology for discovering broadly-neutralizing monoclonal antibodies. *Sci Rep* 2020;**10**:10765.
- Amery L, Mannaerts G, Subramani S et al. Identification of a novel human peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase related protein using the M13 phage protein VI phage display technology. *Comb Chem High Throughput Screen* 2012;**4**:545–52.
- Anand T, Virmani N, Bera BC et al. Phage display technique as a tool for diagnosis and antibody selection for coronaviruses. *Curr Microbiol* 2021;**78**:1124–34.
- Andris-Widhopf J, Steinberger P, Barbas CF. Bacteriophage display of combinatorial antibody libraries. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- Arap MA. Phage display technology: applications and innovations. *Genet Mol Biol* 2005;**28**. DOI: 10.1590/S1415-47572005000100001.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998;**279**:377–80.
- Armstrong N, Adey NB, McConnell SJ et al. Vectors for phage display. *Phage Disp Pept Proteins* 1996:35–53.
- Azzazy HME, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002;**35**:425–45.
- Bábičková J, Tóthová Ľ, Boor P et al. In vivo phage display: a discovery tool in molecular biomedicine. *Biotechnol Adv* 2013;**31**. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.004.
- Baggio R, Burgstaller P, Hale SP et al. Identification of epitope-like consensus motifs using mRNA display. *J Mol Recognit* 2002;**15**:126–34.
- Barbas CF, Kang AS, Lerner RA et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:7978–82.
- Barbas CFI, Burton DR, Scott JK et al. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Barderas R, Benito-Peña E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal Bioanal Chem* 2019;**411**:2475–9.
- Bass S, Greene R, Wells JA. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* 1990;**8**:309–14.
- Bazan J, Calkosiński I, Gamian A. Phage display: a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother* 2012;**8**:1817–28.
- Beekwilder J, Rakonjac J, Jongsma M et al. A phagemid vector using the *E. coli* phage shock promoter facilitates phage display of toxic proteins. *Gene* 1999;**228**:23–31.
- Beghetto E, Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. *Molecules* 2011;**16**:3089.
- Beghetto E, Pucci A, Minenkova O et al. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Int J Parasitol* 2001;**31**:1659–68.
- Benhar I, Azriel R, Nahary L et al. Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA' fusions on live bacteria. *J Mol Biol* 2000;**301**:893–904.
- Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* 2001;**19**:1–33.
- Bidlingmaier S, Liu B. Construction and application of a yeast surface-displayed human cDNA library to identify post-translational modification-dependent protein-protein interactions*. *Mol Cell Proteomics* 2006;**5**:533–40.
- Bonvin P, Venet S, Fontaine G et al. De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties. *MAbs* 2015;**7**:294.
- Bratkovič T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:749–67.
- Breitling F, Dübel S, Seehaus T et al. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;**104**:147–53.
- Brunet E, Chauvin C, Choumet V et al. A novel strategy for the functional cloning of enzymes using filamentous phage display: the case of nucleotidyl transferases. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**. DOI: 10.1093/nar/30.9.e40.
- Burritt JB, Quinn MT, Jutila MA et al. Topological mapping of neurophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries. *J Biol Chem* 1995;**270**:16974–80.
- Castagnoli L, Zucconi A, Quondam M et al. Alternative bacteriophage display systems. *Comb Chem High Throughput Screen* 2012;**4**:121–33.

- Castel G, Chtéoui M, Heyd B et al. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules* 2011;16. DOI: 10.3390/molecules16053499.
- Chan CEZ, Lim APC, MacAry PA et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int Immunol* 2014;26:649–57.
- Chang A, Ting JP, Espada A et al. A novel phage display vector for selection of target-specific peptides. *Protein Eng Des Sel* 2020;33:gzaa023.
- Chang Y-J, Liu CY-Y, Chiang B-L et al. Induction of IL-8 release in lung cells via activator protein-1 by recombinant baculovirus displaying severe acute respiratory syndrome-coronavirus spike proteins: identification of two functional regions. *J Immunol* 2004;173:7602–14.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD et al. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352:624–8.
- Cochran J, Moore S, Cochran F et al. Cell surface display systems for protein engineering. In: *Protein Engineering and Design*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009.
- Cochran JR, Kim YS, Olsen MJ et al. Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J Immunol Methods* 2004;287:147–58.
- Contreras-Llano LE, Tan C. High-throughput screening of biomolecules using cell-free gene expression systems. *Synth Biol* 2018;3. DOI: 10.1093/SYNBIO/YSY012.
- Cramer R, Suter M. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 1993;137. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90253-Y.
- Crawford F, Jordan KR, Stadinski B et al. Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunol Rev* 2006;210:156–70.
- Deng X, Wang L, You X et al. Advances in the T7 phage display system (review). *Mol Med Rep* 2018;17:714–20.
- Deutscher S. Phage display to detect and identify autoantibodies in disease. *N Engl J Med* 2019;381. DOI: 10.1056/nejmcibr1903249.
- Deventer Van JA, Le DN, Zhao J et al. A platform for constructing, evaluating, and screening bioconjugates on the yeast surface. *Protein Eng Des Sel* 2016;29:485–93.
- Dias-Neto E, Nunes DN, Giordano RJ et al. Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis. *PLoS One* 2009;4. DOI: 10.1371/journal.pone.0008338.
- Ditzel HJ. Affinity isolation of antigen-specific circulating B cells for generation of phage display-derived human monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* 2009;562:37–43.
- Ditzel HJ. Rescue of a broader range of antibody specificities using an epitope-masking strategy. *Methods Mol Biol* 2002;178:179–86.
- Domina M, Cariccio VL, Benfatto S et al. Rapid profiling of the antigen regions recognized by serum antibodies using massively parallel sequencing of antigen-specific libraries. *PLoS One* 2014;9:e114159.
- Du R, Yin F, Wang M et al. Glycoprotein E of the Japanese encephalitis virus forms virus-like particles and induces syncytia when expressed by a baculovirus. *J Gen Virol* 2015;96:1006–14.
- Dwyer MA, Lu W, Dwyer JJ et al. Biosynthetic phage display: a novel protein engineering tool combining chemical and genetic diversity. *Chem Biol* 2000;7:263–74.
- Dyson MR, Masters E, Pazeraitis D et al. Beyond affinity: selection of antibody variants with optimal biophysical properties and reduced immunogenicity from mammalian display libraries. *MAbs* 2020;12:1829335.
- Ebrahimizadeh W, Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application. *Curr Microbiol* 2014;69:109–20.
- Eisenhardt SU, Schwarz M, Bassler N et al. Subtractive single-chain antibody (Scfv) phage-display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules. *Nat Protoc* 2007;2:3063–73.
- Euler Z, Schuitemaker H. Cross-reactive broadly neutralizing antibodies: timing is everything. *Front Immunol* 2012;3. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00215.
- Fagerlund A, Myrset AH, Kulseth MA. Construction and characterization of a 9-mer phage display pVIII-library with regulated peptide density. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80. DOI: 10.1007/s00253-008-1630-z.
- Falciani C, Lozzi L, Pini A et al. Bioactive peptides from libraries. *Chem Biol* 2005;12. DOI: 10.1016/j.chembiol.2005.02.009.
- Fernandez-Gacio A, Uguen M, Fastrez J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol* 2003;21. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00194-X.
- Fitzgerald K. In vitro display technologies - New tools for drug discovery. *Drug Discov Today* 2000;5:253–8.
- Fleetwood F, Devoogdt N, Pellis M et al. Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2012;70:1081–93.
- Fokine A, Islam MZ, Zhang Z et al. Structure of the three N-terminal immunoglobulin domains of the highly immunogenic outer capsid protein from a T4-like bacteriophage. *J Virol* 2011;85:8141–8.
- Føns S, Ledsgaard L, Nikolaev MV et al. Discovery of a recombinant human monoclonal immunoglobulin G antibody against α -latrotoxin from the Mediterranean Black Widow Spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). *Front Immunol* 2020;11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.587825.
- Frenzel A, Kügler J, Helmsing S et al. Designing human antibodies by phage display. *Transfus Med Hemother* 2017;44:312–8.
- Fu Y, Li J. A novel delivery platform based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *Virus Res* 2016;211:9–16.
- Gagic D, Ciric M, Wen WX et al. Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous phage display. *Front Microbiol* 2016;7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00429.
- Gao J, Wang Y, Liu Z et al. Phage display and its application in vaccine design. *Ann Microbiol* 2010;60. DOI: 10.1007/s13213-009-0014-7.
- Gao X, Huang Y, Zhu S. Construction of murine phage antibody library and selection of ricin-specific single-chain antibodies. *IUBMB Life* 1999;48. DOI: 10.1080/713803560.
- Granieri L, Baret JC, Griffiths AD et al. High-throughput screening of enzymes by retroviral display using droplet-based microfluidics. *Chem Biol* 2010;17:229–35.
- Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* 1991;220. DOI: 10.1016/0022-2836(91)90354-9.
- Gupta A, Onda M, Pastan I et al. High-density functional display of proteins on bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 2003;334:241–54.
- Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB et al. Phage display as a technology delivering on the promise of

- peptide drug discovery. *Drug Discov Today* 2013;18. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.09.001.
- Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S et al. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14130–5.
- Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4937–42.
- Hashimoto S. Principles of BIACORE. In: *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions*. Tokyo: Springer, 2000, 23–30.
- Hayashi I, Urano Y, Fukuda R et al. Selective reconstitution and recovery of functional γ -secretase complex on budded baculovirus particles. *J Biol Chem* 2004;279:38040–6.
- Hertveldt K, Robben J, Volckaert G. In vivo selectively infective phage as a tool to detect protein interactions: evaluation of a novel vector system with yeast Ste7p-Fus3p interacting proteins. *Yeast* 2002;19:499–508.
- Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng Transl Med* 2020;5. DOI: 10.1002/btm2.10142.
- Hetrick KJ, Walker MC, Donk WA van der. Development and application of yeast and phage display of diverse lanthipeptides. *ACS Central Sci* 2018;4:458–67.
- Hiipakka M, Poikonen K, Saksela K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol* 1999;293:1097–106.
- Hines JC, Ray DS. Construction and characterization of new coliphage M13 cloning vectors. *Gene* 1980;11. DOI: 10.1016/0378-1119(80)90061-X.
- Ho M, Pastan I. Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. *Methods Mol Biol* 2009;562:99–113.
- Hoess RH. Bacteriophage lambda as a vehicle for peptide and protein display. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;3:23–8.
- Hoess RH. Protein design and phage display. *Chem Rev* 2001;101:3205–18.
- Hogan S, Rookey K, Ladner R. URSA: ultra rapid selection of antibodies from an antibody phage display library. 2018;38:536–8.
- Hoogenboom HR, De Brune AP, Hufton SE et al. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4. DOI: 10.1016/S1380-2933(98)00007-4.
- Høydahl LS, Nilssen NR, Gunnarsen KS et al. Multivalent pIX phage display selects for distinct and improved antibody properties. *Sci Rep* 2016;6:1–13.
- Huang JX, Bishop-Hurley SL, Cooper MA. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4569–82.
- Hufton SE, Moerkerk PT, Meulemans EV et al. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J Immunol Methods* 1999;231:39–51.
- Hust M, Dübel S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol* 2004;22:8–14.
- Hust M, Meyer T, Voedisch B et al. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol* 2011;152:159–70.
- Irving MB, Pan O, Scott JK. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00208-8.
- Ishii T, Yanagida M. The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro. *J Mol Biol* 1977;109:487–514.
- Isticato R, Cangiano G, Tran HT et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 2001;183:6294–301.
- Itoh K, Suzuki T. Antibody-guided selection using capture-sandwich ELISA. *Methods Mol Biol* 2002;178:195–9.
- Ivanusic D, Madela K, Burghard H et al. tANCHOR: a novel mammalian cell surface peptide display system. 2020;70:21–8.
- Janssen R, Wauben M, van der Zee R et al. Immunogenicity of a mycobacterial T-cell epitope expressed in outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *Vaccine* 1994;12:406–9.
- Jespersen LS, Messens JH, De Keyser A et al. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology* 1995;13:378–82.
- Jestin JL. Functional cloning by phage display. *Biochimie* 2008;90:1273–8.
- Johrden L, Tenbusch M, Lietz R et al. Comparison of polystyrene nanoparticles and UV-inactivated antigen-displaying adenovirus for vaccine delivery in mice. *Viol J* 2013;10. DOI: 10.1186/1743-422X-10-108.
- Jones ML, Alfaleh MA, Kumble S et al. Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display. *Sci Rep* 2016;6:1–11.
- Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B et al. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques* 1991;11.
- Jung S, Arndt KM, Müller KM et al. Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *J Immunol Methods* 1999;231:93–104.
- Kara E, Nielsen NV, Eggertsdottir B et al. Design and characterization of a new pVII combinatorial phage display peptide library for protease substrate mining using factor VII activating protease (FSAP) as model. *ChemBioChem* 2020;21: 1875–84.
- Karoonuthaisiri N, Charlermroj R, Morton MJ et al. Development of a M13 bacteriophage-based SPR detection using *Salmonella* as a case study. *Sens Actuators B* 2014;190: 214–20.
- Kashiwagi A, Yomo T. Ongoing phenotypic and genomic changes in experimental coevolution of rna bacteriophage q β and *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2011;7. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002188.
- Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display: applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:28–40.
- Kreber A, Burmester J, Plückthun A. Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* 1996;178:71–4.
- Kreber C, Spada S, Desplancq D et al. Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein–ligand interactions. *J Mol Biol* 1997;268:607–18.
- Krumpe LRH, Mori T. The use of phage-displayed peptide libraries to develop tumor-targeting drugs. *Int J Pept Res Ther* 2006;12:79–91.
- Ku J, Schultz PG. Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92. DOI: 10.1073/pnas.92.14.6552.
- Kubo T. Random peptide library for ligand and drug discovery. In: *Toxins and Drug Discovery*. Dordrecht: Springer, 2017, 207–30.
- La Cruz VF De, Lal AA, McCutchan TF. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* 1988;263:4318–22.

- Lamla T, Erdmann VA. Searching sequence space for high-affinity binding peptides using ribosome display. *J Mol Biol* 2003;**329**:381–8.
- Larman HB, Zhao Z, Laserson U et al. Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome. *Nat Biotechnol* 2011;**29**:535–41.
- Laustsen AH, Greiff V, Karatt-Vellatt A et al. Animal immunization, in vitro display technologies, and machine learning for antibody discovery. *Trends Biotechnol* 2021. DOI: 10.1016/j.tibtech.2021.03.003.
- Laustsen AH, Karatt-Vellatt A, Masters EW et al. In vivo neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies. *Nat Commun* 2018;**9**:1–9.
- Lebani K, Jones ML, Watterson D et al. Isolation of serotype-specific antibodies against dengue virus non-structural protein 1 using phage display and application in a multiplexed serotyping assay. *PLoS One* 2017;**12**:e0180669.
- Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A et al. Basics of antibody phage display technology. *Toxins* 2018;**10**:236.
- Lee HW, Lee SH, Park KJ et al. Construction and characterization of a pseudo-immune human antibody library using yeast surface display. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:896–903.
- Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 2003;**21**:45–52.
- Li X-H, Chavali PL, Babu MM. Capturing dynamic protein interactions. *Science* 2018;**359**:1105–6.
- Lim CC, Choong YS, Lim TS. High affinity matured human antibodies from naïve and synthetic antibody repertoires. *Antib Eng* 2017. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.71664.
- Lim CC, Woo PCY, Lim TS. Development of a phage display panning strategy utilizing crude antigens: isolation of MERS-CoV nucleoprotein human antibodies. *Sci Rep* 2019;**9**:1–15.
- Lindahl G. Bacteriophage P2: replication of the chromosome requires a protein which acts only on the genome that coded for it. *Virology* 1970;**42**:522–33.
- Lino CA, Caldeira JC, Peabody DS. Display of single-chain variable fragments on bacteriophage MS2 virus-like particles. *J Nanobiotechnol* 2017;**15**. DOI: 10.1186/s12951-016-0240-7.
- Lipovsek D, Plückthun A. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods* 2004;**290**:51–67.
- Liu GW, Livesay BR, Kacherovsky NA et al. Efficient identification of murine M2 macrophage peptide targeting ligands by phage display and next-generation sequencing. *Bioconjug Chem* 2015;**26**:1811–7.
- Liu P, Han L, Wang F et al. Gold nanoprobe functionalized with specific fusion protein selection from phage display and its application in rapid, selective and sensitive colorimetric biosensing of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron* 2016;**82**:195–203.
- Løset GÅ, Bogen B, Sandlie I. Expanding the versatility of phage display I: efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage. *PLoS One* 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0014702.
- Løset GÅ, Sandlie I. Next generation phage display by use of pVII and pIX as display scaffolds. *Methods* 2012;**58**:40–6.
- Lou J, Marks JD. Affinity maturation by chain shuffling and site directed mutagenesis. *Antib Eng* 2010:377–96.
- Lowman HB. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997;**26**:401–24.
- Lundin K, Samuelsson A, Jansson M et al. Peptides isolated from random peptide libraries on phage elicit a neutralizing anti-HIV-1 response: analysis of immunological mimicry. *Immunology* 1996;**89**:579–86.
- Luzzago A, Felici F, Tramontano A et al. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 1993;**128**:51–7.
- Malmborg AC, Dueñas M, Ohlin M et al. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore(TM) biosensor. *J Immunol Methods* 1996;**198**:51–7.
- Maniatis T, Hardison RC, Lacy E et al. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 1978;**15**. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90036-3.
- Marintcheva B. *Harnessing the Power of Viruses*. London: Academic Press, 2017.
- Maruyama IN, Maruyama HI, Brenner S. Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1994;**91**:8273.
- Mathonet P, Ioannou A, Betley J et al. GIS display, a DNA-based in vitro selection technology for therapeutic peptides. *Chim Oggi-Chem Today* 2011;**29**:10–2.
- Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci* 1994;**91**:9022–6.
- Matthews LJ, Davis R, Smith GP. Immunogenically fit subunit vaccine components via epitope discovery from natural peptide libraries. *J Immunol* 2002;**169**:837–46.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;**348**:552–4.
- McConnell SJ, Uveges AJ, Fowlkes DM et al. Construction and screening of M13 phage libraries displaying long random peptides. *Mol Divers* 1996;**1**:165–76.
- McMahon C, Baier AS, Pascolutti R et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol* 2018;**25**:289–96.
- Mead DA, Kemper B. Chimeric single-stranded DNA phage-plasmid cloning vectors. *Biotechnology* 1988;**10**:85–102.
- Meller Harel HY, Fontaine V, Chen H et al. Display of a maize cDNA library on baculovirus infected insect cells. *BMC Biotech* 2008;**8**. DOI: 10.1186/1472-6750-8-64.
- Minenkova O, Pucci A, Pavoni E et al. Identification of tumor-associated antigens by screening phage-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. *Int J Cancer* 2003;**106**:534–44.
- Mullen LM, Nair SP, Ward JM et al. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol* 2006;**14**:141–7.
- Nchinda GW, Al-Atoom N, Coats MT et al. Uniqueness of RNA coliphage Q β Display system in directed evolutionary biotechnology. *Viruses* 2021;**13**:568.
- Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y et al. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett* 1997;**414**:405–8.
- Nicastro J. *Construction and Characterization of a Fine-Tuned Lytic Phage Display System*. Master's Thesis. University of Waterloo, 2014.
- Noren KA, Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 2001;**23**. DOI: 10.1006/meth.2000.1118.
- O'connell D, Becerril B, Roy-Burman A et al. Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *J Mol Biol* 2002;**321**:49–56.

- Odegrip R, Coomber D, Eldridge B et al. CIS display: in vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci* 2004;**101**:2806–10.
- Omidfar K, Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 2015;**10**. DOI: 10.1517/17460441.2015.1037738.
- Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* 2010;**28**. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.
- Parhami-Seren B, Viswanathan M, Margolies MN. Selection of high affinity p-azophenylarsenate Fabs from heavy-chain CDR2 insertion libraries. *J Immunol Methods* 2002;**259**. DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00488-4.
- Park SJ, Lui BH, Cochran JR. 4.14 Rational and combinatorial methods to create designer protein interfaces. *Compr Biomater II* 2017:221–47.
- Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;**73**. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90495-7.
- Parthiban K, Perera RL, Sattar M et al. A comprehensive search of functional sequence space using large mammalian display libraries created by gene editing. *MAbs* 2019;**11**:884–98.
- Patel S, Mathonet P, Jaulent AM et al. Selection of a high-affinity WW domain against the extracellular region of VEGF receptor isoform-2 from a combinatorial library using CIS display. *Protein Eng Des Sel* 2013;**26**:307–15.
- Peltomaa R, López-Perolio I, Benito-Peña E et al. Application of bacteriophages in sensor development. *Anal Bioanal Chem* 2016;**408**:1805–28.
- Petrenko VA, Smith GP, Gong X et al. A library of organic landscapes on filamentous phage. *Protein Eng Des Sel* 1996;**9**:797–801.
- Petrenko VA, Smith GP. Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng Des Sel* 2000;**13**:589–92.
- Petrenko VA. Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;**5**:825–36.
- Petrenko VA. Landscape phage: evolution from phage display to nanobiotechnology. *Viruses* 2018;**10**. DOI: 10.3390/v10060311.
- Piggott AM, Karuso P. Identifying the cellular targets of natural products using T7 phage display. *Nat Prod Rep* 2016;**33**:626–36.
- Pini A, Viti F, Santucci A et al. Design and use of a phage display library: antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 1998;**273**:21769–76.
- Pleiko K, Pöšnograjeva K, Haugas M et al. In vivo phage display: identification of organ-specific peptides using deep sequencing and differential profiling across tissues. *Nucleic Acids Res* 2021;**49**:e38.
- Qin L, Fokine A, O'Donnell E et al. Structure of the small outer capsid protein, Soc: a clamp for stabilizing capsids of T4-like phages. *J Mol Biol* 2010;**395**:728.
- Rahbarnia L, Farajnia S, Babaei H et al. Invert biopanning: a novel method for efficient and rapid isolation of scFvs by phage display technology. *Biologicals* 2016;**44**:567–73.
- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J et al. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 2011;**13**:51–76.
- Reed CA, Langlais C, Wang IN et al. A2 expression and assembly regulates lysis in Q β infections. *Microbiol (United Kingdom)* 2013;**159**:507–14.
- Reiersen H, Løbersli I, Løset GA et al. Covalent antibody display: an in vitro antibody-DNA library selection system. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**. DOI: 10.1093/nar/gni010.
- Ren ZJ, Baumann RG, Black LW. Cloning of linear DNAs in vivo by overexpressed T4 DNA ligase: construction of a T4 phage hoc gene display vector. *Gene* 1997;**195**:303–11.
- Ren ZJ, Black LW. Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene* 1998;**215**:439–44.
- Ren ZJ, Lewis GK, Wingfield PT et al. Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Sci* 1996;**5**:1833–43.
- Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1997;**94**:12297–302.
- Robertson N, Lopez-Anton N, Gurjar SA et al. Development of a novel mammalian display system for selection of antibodies against membrane proteins. *J Biol Chem* 2020;**295**:18436–48.
- Rodi DJ, Mandava S, Makowski L. Filamentous bacteriophage structure and biology. In: *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*. 2nd edn. CRC Press, 2015.
- Rosenberg AH, Griffin K, Todd Washington M et al. Selection, identification, and genetic analysis of random mutants in the cloned primase/helicase gene of bacteriophage T7. *J Biol Chem* 1996;**271**:26819–24.
- Rothe A, Hosse RJ, Power ABE. In vitro display technologies reveal novel biopharmaceuticals. *FASEB J* 2006;**20**:1599–610.
- Röthlisberger D, Honegger A, Plückthun A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol* 2005;**347**:773–89.
- Rumnieks J, Tars K. Crystal structure of the read-through domain from bacteriophage Q β A1 protein. *Protein Sci* 2011;**20**:1707–12.
- Russel M. Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol* 1991;**5**. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01907.x.
- Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PÅ et al. Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* 2002;**96**:129–54.
- Santi E, Capone S, Mennuni C et al. Bacteriophage lambda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics. *J Mol Biol* 2000;**296**:497–508.
- Sergeeva A, Kolonin MG, Mollidrem JJ et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;**58**:1622–54.
- Shallom D, Shoham Y. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 2003;**6**:219–28.
- Shembekar N, Mallajosyula VVA, Mishra A et al. Isolation of a high affinity neutralizing monoclonal antibody against 2009 pandemic H1N1 virus that binds at the 'Sa' antigenic site. *PLoS One* 2013;**8**:55516.
- Shivachandra SB, Li Q, Peachman KK et al. Multicomponent anthrax toxin display and delivery using bacteriophage T4. *Vaccine* 2007;**25**:1225–35.
- Sidhu SS. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng* 2001;**18**:57–63.
- Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2000;**11**:610–6.
- Simons GF, Konings RN, Schoenmakers JG. Genes VI, VII, and IX of phage M13 code for minor capsid proteins of the virion. *Proc Natl Acad Sci* 1981;**78**:4194–8.
- Sioud M. Phage display libraries: from binders to targeted drug delivery and human therapeutics. *Mol Biotechnol* 2019;**61**:286–303.
- Smith GP, Petrenko VA. Phage display. *Chem Rev* 1997;**97**:391–410.

- Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993. DOI: 10.1016/0076-6879(93)17065-D.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-) 1985. DOI: 10.1126/science.4001944.
- Smith GP. Phage Display: simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed* 2019;58:14428–37.
- Spada S, Krebber C, Plückthun A. Selectively infective phages (SIP). *Biol Chem* 1997;378:445–56.
- Spingola M, Peabody DS. MS2 coat protein mutants which bind Q β RNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2808–15.
- Sternberg N, Hoess RH. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage λ . *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:1609–13.
- Stieglitz JT, Kehoe HP, Lei M et al. A robust and quantitative reporter system to evaluate noncanonical amino acid incorporation in yeast. *ACS Synth Biol* 2018;7:2256–69.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
- Takagi T, Arisawa T, Yamamoto K et al. Identification of ligands binding specifically to inflammatory intestinal mucosa using phage display. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:286–9.
- Takahashi TT, Austin RJ, Roberts RW. mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem Sci* 2003;28:159–65.
- Tan Y, Tian T, Liu W et al. Advance in phage display technology for bioanalysis. *Biotechnol J* 2016;11:732–45.
- Tao P, Li Q, Shivachandra SB et al. Bacteriophage T4 as a nanoparticle platform to display and deliver pathogen antigens: construction of an effective anthrax vaccine. *Methods Mol Biol* 2017;1581:255–67.
- Tao P, Zhu J, Mahalingam M et al. Bacteriophage T4 nanoparticles for vaccine delivery against infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;145:57–72.
- Tasumi S, Velikovskiy CA, Xu G et al. High-affinity lamprey VLRA and VLRB monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:12891–6.
- Thapa N, Hong HY, Sangeetha P et al. Identification of a peptide ligand recognizing dysfunctional endothelial cells for targeting atherosclerosis. *J Control Release* 2008;131:27–33.
- Tiller T, Schuster I, Deppe D et al. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs* 2013;5:445–70.
- Tsai CH, Wei SC, Lo HR et al. Baculovirus as versatile vectors for protein display and biotechnological applications. *Curr Issues Mol Biol* 2020;34:231–55.
- Urban JH, Merten CA. Retroviral display in gene therapy, protein engineering, and vaccine development. *ACS Chem Biol* 2011;6:61–74.
- Urban JH, Schneider RM, Compté M et al. Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1–8.
- Valencia CA, Cotten SW, Dong B et al. mRNA-display-based selections for proteins with desired functions: a protease-substrate case study. *Biotechnol Prog* 2008;24:561–9.
- Vanhercke T, Ampe C, Tirry L et al. Rescue and in situ selection and evaluation (RISE): a method for high-throughput panning of phage display libraries. *J Biomol Screen* 2005;10:108–17.
- Vodnik M, Zager U, Strukelj B et al. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* 2011;16:790–817.
- Volpicella M, Gallerani R, Ceci LR et al. Functional expression on bacteriophage of the mustard trypsin inhibitor MTI-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:813–7.
- Vujadinovic M, Khan S, Oosterhuis K et al. Adenovirus based HPV L2 vaccine induces broad cross-reactive humoral immune responses. *Vaccine* 2018;36:4462–70.
- Walker LM, Bowley DR, Burton DR. Efficient recovery of high-affinity antibodies from a single-chain fab yeast display library. *J Mol Biol* 2009;389:365–75.
- Wang H, Wang X, Wang J et al. A SPR biosensor based on signal amplification using antibody-QD conjugates for quantitative determination of multiple tumor markers. *Sci Rep* 2016;6:1–9.
- Watkins JD. Screening of phage-expressed antibody libraries by capture lift. *Methods Mol Biol* 2002;178:187–93.
- Webster R. Filamentous phage biology. In: Barbas CF, Burton DR, Scott JK et al. (eds). *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 1.1–1.37.
- Willats WGT. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 2002;50:837–54.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE et al. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994;12:433–55.
- Woodburn KW, Wilson SD, Fong KL et al. Chronic pharmacological and safety evaluation of hematide™, a PEGylated peptidic erythropoiesis-stimulating agent, in rodents. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;104:155–63.
- Wu J, Tu C, Yu X et al. Bacteriophage T4 nanoparticle capsid surface SOC and HOC bipartite display with enhanced classical swine fever virus immunogenicity: a powerful immunological approach. *J Virol Methods* 2007;139:50–60.
- Wu WH, Alkutkar T, Karanam B et al. Capsid display of a conserved human papillomavirus L2 peptide in the adenovirus 5 hexon protein: a candidate prophylactic hpv vaccine approach. *Virol J* 2015;12:140.
- Yau KYF, Groves MAT, Li S et al. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *J Immunol Methods* 2003;281:161–75.
- Zacher AN, Stock CA, Golden JW et al. A new filamentous phage cloning vector: fd-tet. *Gene* 1980;9:127–40.
- Zeri AC, Mesleh MF, Nevzorov AA et al. Structure of the coat protein in fd filamentous bacteriophage particles determined by solid-state NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6458–63.
- Zhou D, Wu TL, Emmer KL et al. Hexon-modified recombinant E1-deleted adenovirus vectors as dual specificity vaccine carriers for influenza virus. *Mol Ther* 2013;21:696–706.
- Zhu Z, Dimitrov DS. Construction of a large naïve human phage-displayed Fab library through one-step cloning. *Methods Mol Biol* 2009;525:129–42.
- Zorniak M, Clark PA, Umlauf BJ et al. Yeast display biopanning identifies human antibodies targeting glioblastoma stem-like cells. *Sci Rep* 2017;7:15840.

Gdańsk, dnia 17.08.2022

mgr Joanna Morcinek-Orłowska

Tytuł zawodowy, imię i nazwisko

Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii UG

Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy „Weronika Jaroszewicz, Joanna Morcinek-Orłowska, Karolina Pierzynowska, Lidia Gaffke, Grzegorz Węgrzyn, Phage display and other peptide display technologies, FEMS Microbiology Reviews, Volume 46, Issue 2, March 2022, fuab052”, mój wkład merytoryczny w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

przygotowanie rysunków
przygotowanie literatury (bibliografii)

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Weroniki Jaroszewicz przy przygotowywaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale nr 3.

Joanna Morcinek-Orłowska

/podpis współautora/

Gdańsk, dnia 18.08.2022

Dr Karolina Pierzynowska
Tytuł zawodowy, imię i nazwisko

Katedra Biologii Molekularnej UG
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Weronika Jaroszewicz, Joanna Morcinek-Orłowska, Karolina Pierzynowska, Lidia Gaffke, Grzegorz Węgrzyn „Phage display and other peptide display technologies” *FEMS Microbiology Reviews*, 2022; **46**, fuab052”, mój wkład merytoryczny w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: udział w poprawkach wstępnej wersji manuskryptu oraz zbieraniu danych literaturowych.



.....
/pódpis współautora/

Gdańsk, dnia 18.08.2022

Dr Lidia Gaffke
Tytuł zawodowy, imię i nazwisko
Katedra Biologii Molekularnej UG
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Weronika Jaroszewicz, Joanna Morcinek-Orłowska, Karolina Pierzynowska, Lidia Gaffke, Grzegorz Węgrzyn „Phage display and other peptide display technologies” *FEMS Microbiology Reviews*, 2022; **46**, fuab052”, mój wkład merytoryczny w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w zbieraniu danych, udział w poprawkach wstępnej wersji manuskryptu.


.....
/podpis współautora/




Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16 sierpnia 2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Weronika Jaroszewicz, Joanna Morcinek-Orłowska, Karolina Pierzynowska, Lidia Gaffke, Grzegorz Węgrzyn „Phage display and other peptide display technologies” *FEMS Microbiology Reviews*, 2022; **46**, fuab052”, mój wkład merytoryczny w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: **kierowanie zadaniem badawczym w projekcie naukowym, w ramach którego powstał ten artykuł, nadzór nad pracami redakcyjnymi, w tym dyskusje naukowe, udział w poprawianiu wstępnej wersji manuskryptu oraz przygotowanie jego ostatecznej wersji, korespondencja z redakcją czasopisma.**

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Weroniki Jaroszewicz przy przygotowywaniu tekstu manuskryptu.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
KATEDRY BIOLOGII MOLEKULARNEJ
prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl



4. Cel pracy

Celem mojej pracy było skonstruowanie systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84. Aby osiągnąć główny cel pracy, poszczególne etapy prowadzące do uzyskania działającego systemu rozdzieliłam na trzy cele pośrednie. Pierwszym z nich była konstrukcja biblioteki genów bakteriofaga TP-84 przy użyciu plazmidu pUC19. Kolejnym celem było klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ, w tym optymalizacja metody klonowania Gibsona oraz Golden Gate. Ostatni cel obejmował wprowadzanie *in vitro* modyfikowanego genomu do wirionu bakteriofaga TP-84, w celu otrzymania funkcjonującego systemu prezentowania białek/peptydów na jego powierzchni.

5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1. Odczynniki chemiczne

- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylo-- β -D-Galaktopiranozyd (X-Gal) – EURx, Polska
- Alkohol etylowy 99,8% CZDA – POCH, Polska
- Chlorek cezu – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Chlorek magnezu sześciowodny – BioShop, Kanada
- Chlorek manganu(II) czterowodny – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Chlorek manganu(II) dwuwodny – Thermo Fisher, USA
- Chlorek potasu – POCH, Polska
- Chlorek sodu – Chempur, Polska
- Chlorek wapnia uwodniony – BioShop, Kanada
- Chlorek wapnia – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Chloroform – POCH, Polska
- D-Fruktoza – BioShop, Kanada
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Ditiotretitol (DTT) – Thermo Fisher, USA
- Glicerol – POCH, Polska
- Glikol polietylenowy (PEG) 8000 – BioShop, Kanada
- Iaopropylo-1-tio- β -D galaktopiranozyd (IPTG) – BLIRT, Polska
- Kwas octowy 99,5%-99,8% - POCH, Polska
- Kwas siarkowy(VI) 95% - POCH, Polska
- L-(+)-arabinoza – Carl Roth, Niemcy
- Lizozym – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Mleko odtłuszczone w proszku granulowane – SM Gostyń
- Octan potasu – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Tris-HCl – Sigma-Aldrich, Niemcy
- Woda wolna od nukleaz – Carl Roth, Niemcy

5.1.2. Szczepy bakteryjne i bakteriofagi

Szczepy bakteryjne i bakteriofagi używane w pracy przedstawione są w Tabeli 1.

Tabela 1. Spis szczepów bakteryjnych i bakteriofagów użytych w pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
<i>Escherichia coli</i> DH5a	4,5 Mbp (ang. Mega base pair); Amp ^R ; Genotyp: <i>F</i> 80Δ <i>lacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> hsdR17(<i>rk-</i> , <i>mk+</i>) <i>phoAsupE44 - thi-1 gyrA96 relA1</i> [1]	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, UG
<i>Escherichia coli</i> TransforMax EPI300	Amp ^R ; Genotyp: <i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ: rpsL (StrR) nupG trfA dhfr</i> ; Chemokompetentne komórki <i>E. coli</i> wyprodukowane przez firmę Lucigen Corporation; zaprojektowane do transformacji dużymi plazmidami do wielkości 145 kbp (ang. kilo base pair).	Lucigen, USA
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> szczep 10	3,7 Mbp; <i>Geobacillus stearothermophilus</i> to Gram-dodatnia, termofilna bakteria występująca w glebie, gorących źródłach i w dnach oceanów [2]. Minimalna temperatura wzrostu wynosi około 43-45°C a maksymalna 80°C, przy czym za optymalną temperaturę wzrostu uznaje się 55-60°C [2].	Kolekcja prof. dr hab. Piotra Skowrona, Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, UG
Bakteriofag TP-84	47,7 kbp; Bakteriofag TP-84 z rodziny <i>Siphoviridae</i> infekujący gospodarza <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , jest bakteriofagiem litycznym zbudowanym z heksagonalnej główki o wymiarach 53 x 30 nm oraz ogonka o wymiarach 130 x 3-5 nm [3]. Genom bakteriofaga stanowi liniowy, dwuniciowy DNA (dsDNA) o masie cząsteczkowej ok. 22,5 Mega Daltonów (MDa) i całkowitej długości 13,9 μm [3]. Genom bakteriofaga TP-84 zawiera 42% par zasad G+C [4]. Optymalne warunki namnażania bakteriofaga TP-84 obejmują zastosowanie pożywki wzbogaconej w fruktozę, aby ograniczyć sporulację komórek gospodarza dla bakteriofaga TP-84, chlorku magnezu i wapnia w celu uzyskania wyższego miana bakteriofaga, pH 6.5, temperatury 55-60°C oraz środowiska aerobowego [5].	Kolekcja prof. dr hab. Piotra Skowrona, Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, UG

5.1.3. Plazmidy

Plazmidy używane w tej pracy przedstawione są w Tabeli 2.

Tabela 2. Spis plazmidów użytych w pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
pUC19	Amp ^R ; 2,7 kbp; Wektor plazmidowy wysokokopijny zawierający MCS (miejsce wielokrotnego klonowania, ang. multiple cloning site) w obrębie genu <i>lacZ</i> , co umożliwia stosowanie testu α -komplementacji (Addgene, #50005).	Addgene
pBAC-lacZ	Cm ^R ; 11,1 kbp; Wektor plazmidowy typu BAC (sztuczny chromosom bakteryjny, ang. Bacterial artificial chromosome) bazujący na systemie indukowalnego zwiększania liczby kopii. Jest to system opracowany przez prof. Szybalskiego, który umożliwia przechowywanie plazmidów jednokopijnych [6]. W tej formie duże genomowe fragmenty DNA lub fragmenty, których produkty mogą być toksyczne dla gospodarza są stabilnie przechowywane, a kiedy jest potrzebna większa ilość DNA istnieje możliwość zaindukowania wielu kopii plazmidu [6]. System ten opiera się na plazmidzie pBAC/ <i>oriV</i> zawierającym mutację w genie <i>trfA</i> (gen kodujący białko TrfA, które inicjuje replikację plazmidu) oraz dodatkowe miejsce inicjacji replikacji (origin), <i>oriV</i> . Szczep gospodarza <i>E. coli</i> podczas indukcji poprzez dodanie L-arabinozy dostarcza <i>in trans</i> funkcję amplifikacji specyficzną dla <i>oriV</i> powodując wzrost amplifikacji plazmidu oraz ekspresji klonowanych genów (Addgene #13422) [6].	Addgene

5.1.4. Oligonukleotydy

Używane w pracy oligonukleotydy przedstawione są w Tabeli 3.

Tabela 3. Spis oligonukleotydów użytych w pracy. **Pogrubienie** oznacza sekwencję komplementarną do amplifikowanego genu/fragmentu genomu. Podkreślenie oznacza sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrycyjne, sekwencje specyficzne dla metki FLAG lub sekwencje kodujące metkę histydynową z dołączonym linkerem.

Startery do klonowania metodą RF

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Temp. topnienia [°C]*
06_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGGGCATCAAGTGGAC AA	64

06_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCAGCCTGGCCACCCC C	76
08_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGGCCAACATGGACCA G	65
08_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCATGGCTTCTTCACCCC CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCCTTTACATTTAGAA CAATTCC	64
12_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAGGATTGTGCAACGA TTAAATGA	62
12_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCCAGGGGTAAACAT TCC	65
18_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATGCGTTTGGATCAGT GTCG	66
18_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCCTATGGGCTATACA TTCG	67
22_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCATAGCCATGTATGCCG ATATTT	64
22_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGACGAAAATATCGAT TCGAATA	63
74_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATGCATTCCGATTCCG CA	64
74_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGGACTACAAAGACCAT GACGGT	68
FLAG-N_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGCCGCTGCTCTTGTCATCG TCATCCTTGTAGT	66
FLAG-N_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGGCAGCAGCGACTACAAA GACCATGACGGT	78
FLAG-C_RF_F	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCACTTGTCATCGTCATCC TTGTAGT	78
FLAG-C_RF_R	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCGGCATCAAGTGGACAAAATG	67
06_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCCCTTTACATTTAGAACAAATTCC	65
08_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCCAGGGGTAAACATTCCATT	67
12_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCCCTTTACATTTAGAACAAATTCC	57
18_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCCAGGGGTAAACATTCCATT	63
22_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGGCCCTATGGGCTATACATTCCG	61
74_His-N_RF_F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC ACAGCAGCGGCACGAAAATATCGATTTCGAATA	60
06_His-C_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCAGTGATGATGATGATG ATGGCTGCTGCCCGCCTGGCCACCCCCTGTT	75
08_His-C_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCAGTGATGATGATGATG ATGGCTGCTGCCCTGGCTTCTTCACCCCCAGT	67
12_His-C_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAGTGATGATGATGATG ATGGCTGCTGCCGGATTGTGCAACGATTAAATGA	63
18_His-C_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAGTGATGATGATGATG ATGGCTGCTGCCCTGCGTTTGGATCAGTGTCGC	70
22_His-C_RF_R	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCAGTGATGATGATGATG ATGGCTGCTGCCCTAGCCATGTATGCCGATATTT	61

74_His-C_RF_R	<u>GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAGTGATGATGATGATG</u> <u>ATGGCTGCTGCCTGCATTTCGGATTTCGCCATTC</u>	70
06_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCGGCATCAAGTGGACAAA</u> ATGG	66
08_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCGCCAACATGGACCAGAT</u> CG	67
12_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCCCTTTACATTTAGAACA</u> ATTCCAAC	61
18_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCCAGGGGTAAACATTCC</u> ATTCCG	68
22_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCCCTATGGGCTATACATT</u> CGGC	64
74_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCACGAAAAATATCGATTTC</u> GAATAAAC	62
06_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCCGCCTGGCCACCCCCTGT</u>	75
08_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCTGGCTTCTTCACCCCCAG</u>	66
12_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCGGATTGTGCAACGATTAA</u> ATGAAC	65
18_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCTGCGTTTGGATCAGTGTC</u> G	66
22_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCATAGCCATGTATGCCGATA</u> TTTCA	65
74_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCTGCATTTCGGATTTCGCCAT</u>	67

Startery do klonowania metodą RF genu 8 bakteriofaga TP-84 w dwóch częściach

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Temp. topnienia [°C]*
08_I_RF_F	<u>CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGGCCAACATGGACCA</u> G	65
08_I_RF_R	<u>GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGGCGATAAGCGGCCAGT</u> G	69
08_II_RF_F	<u>AAAACACTGGCCGCTTATCGCCGGATGAAGCGGAAGAAC</u> GA	65
08_II_RF_R	<u>GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCATGGCTTCTTCACCCC</u> <u>GTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCGGGCGATAAGCGGCCAGT</u> G	64
08_I_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCTCATGGCTTCTTCACCCC</u>	69
08_II_FLAG-C_RF_R	<u>GGTCTTTGTAGTCGCTGCTGCCTCATGGCTTCTTCACCCC</u>	64
08_I_FLAG-N_RF_F	<u>TGACGATGACAAGAGCAGCGGGCGCCAACATGGACCAGAT</u> CG	59
08_I_His-C_RF_F	<u>CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGGCCAACATGGACCA</u> GA	59
08_II_His-C_RF_R	<u>GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTCAGTGATGATGATGATG</u> <u>ATGGCTGCTGCCTGGCTTCTTCACCCCCAGT</u>	67
08_I_His-N_RF_F	<u>CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCATCATCATCATCATC</u> <u>ACAGCAGCGGGCGCCAACATGGACCAGATCG</u>	67

Startery do kolonijnej PCR / sekwencjonowania

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Temp. topnienia [°C]*
06_seq_F	GATCATCGCGATCTGGAAAT	64
06_seq_R	TGCCTTCCAGGTAAAAATCG	64
08_seq_F	AAACTGGTCTGGATCATCG	64
08_seq_R	GGCGTATTCTGGCAGTTGTT	64
12_seq_F	CATCGTGACAAGCGAACAAT	64
12_seq_R	GCGTGGTGGATTTGTTTCTT	64
18_seq_F	GACCATCGTTGTTGGTCAA	63
18_seq_R	CGTTTTCATATGTGCGGTTG	64
22_seq_F	AGAACGGCAAACATGATCC	64
22_seq_R	ATGTATTTTTTCGCCGCTTGG	64
74_seq_F	TGTGAAACGGATCGAGGAAT	64
74_seq_R	TTCGTCAATCCTTCCCATTC	64
FLAG_seq_R	TCGTCATCCTTGTAGTCGATG	63
pUC19_seq_F	TGTGGAATTGTGAGCGGATA	64
pUC19_seq_R	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT	64
pBAC_seq_F	GACCTGAGCGCATTTTTACG	64
pBAC_seq_R	AACCACCACGCTCATCGATA	65
R1_seq_F	TGCCGATCGATGACTGGGAT	70
R1_seq_R	TGCCAAAAATCAACACCATT	63
R2_seq_F	GGATGTTTAATGCTTGAACC	58
R2_seq_R	TATCGCTGTGTCTGCACTCC	64
R3_seq_F	CAATGATGCCGCCAGTCATG	70
R3_seq_R	TCACCAGGATCGGATCGCGG	75
R4_seq_F	TTTTTATGCGATTCACGGTG	63
R4_seq_R	TTTCGGCTTTTTTTCAGTACA	60
R5_seq_F	GTCATTCCAGAAATCAAAGA	57
R5_seq_R	TTGACGTTTCTGGCCACTTC	65
R6_seq_F	AGCGGCGAAAAATACATCGA	66
R6_seq_R	TGTTGTTTTCTTTTCTTCTT	53
R7_seq_F	CCATAACTATAAATTGTTTG	49
R7_seq_R	ACATCCACCATCCATCGCCG	72
R8_seq_F	GCCTATGTTCTATTTTCTTG	55
R8_seq_R	GCCGCCGCCAGGTGGTGGA	82
GEN_12_mod_seq_F	GAACGGTTCGATTCACCTTC	66

GEN_12_mod_se q_R	TTCGATCACATCACCAGGTTT	64
----------------------	------------------------------	----

Startery do klonowania metodą Gibsona

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Temp. topnienia [°C]*
R1_G_F_EheI	AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGAC GGCGCCGTTTCGTTTACATTATATTTT	68
R1_G_F_AarI	AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGAC CACCTGCCACCTGCGATCGTTTCGTTTACATTATATTTT	78
R1_G_F_BspOI	AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGAC GCTAGCGTTTCGTTTACATTATATTTT	61
R1_G_C_F	CGGATAGCGGATCTTTTTTTGTTCGTTTACATTATATTTTA TATTTTTTAAAAATCATCG	66
R1_G_R	CGGATCGATCGCCAGGCCGCCGAATCCATTTTTGACCGCT TGATATAACCAGTTTGCGCC	82
R2_G_F	AGCGGTCAAAAATGGATTCGGCGGCCTGGCGATCGATCC GGCAAAAGGGGAAATCGGCAA	92
R2_G_R	ACAATGGCCACGATGTCCGGCGTGTTCCTTTTCATCTG CTTTTAGAATCGCATCCAGG	81
R3_G_F	CAGATGAAAAGGGAAACACGCCGACATCGTGGCCATTG TCACTGAAATGGGCGATGATA	87
R3_G_R	GAATCGATATTTTCGTATCATCATTCACCATTCTTTTCGT TCCATTTCTGTATATAGTG	74
R4_G_F	CGAAAGAATGGTGAATGATGATGACGAAAAATATCGATT CGAATAAACAAGCGGCAACCA	80
R4_G_R	TTTGTCCACTTGATGCCCATATCTTCCCCTCTCCTTTTCGTT ATTCTTTCCAGATCACCGA	80
R5_G_F	ACGAAAGGAGAGGGGAAGATATGGGCATCAAGTGGACA AAATGGTCAACAAACGTGATCA	83
R5_G_R	TGTCTATCCCTTTTTTGTGATTAGGATTGTGCAACGATTAA ATGAACGACTGCTTGTGGC	81
R5_G_MOD_R	TGTTCTAAATGTAAAGGCATCGTTTTTTTACCTCCTTAAAA TGAATATTGTCCGGCTTGTGTC	76
R6_G_F	TAATCGTTGCACAATCCTAATGACAAAAAAGGGATAGAC ACATGATCTAGTCTATCCCTT	74
R6_G_MOD_F	AGGATGACGATGACAAGTGATGACAAAAAAGGGATAGAC ACATGATCTAGTCTATCCCTT	74
R6_G_R	CCATGCCGATCACCCCTTTTTTCATAGCCATGTATGCCGAT ATTTCACTGTAATTTGATTG	76
R7_G_F	ATCGGCATACATGGCTATGAAAAAGGGGTGATCGGCATG GCGATTCAAAAAGCGTTATTC	83
R7_G_R	CATTTTCGCATCCACCACAATGGTGTGATGGCCCTGGCG CAGATCCAGACCAGGAAAAGT	88
R8_G_F	GCGCCAGGGCCATCGACACCATTGTGGTGGATGCGAAAT GTGGCCGAATGGGTGAAACAG	86
R8_G_R	AATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATGCAGCAACGAGACC CTGTAAAAAAAAGATCCGCTATCCG	69

R8_G_C_R	AAAATATAATGTAAACGAACAAAAAAGATCCGCTATCC GTTTGGATGGCGGATCATAGG	82
R1_G_R_cutB	AATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATGCAGCAACGAGACC CTGTACGAATCCATTTTTGACCGCT	66
R1_G_R_cutA	AATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATGCAGCAACGAGACC CTGTACATCATTACCATTCTTTCG	61
GEN_12_mod_G_F	TTTTAAGGAGGTAAAAACGATGCCTTTACATTTAGAACA ATTCCAACGTGAAGCATTCC	77
GEN_12_mod_G_R	TGTCTATCCCTTTTTTGTATCACTTGTTCATCGTCATCCTT GTAGTCGATGTCATGATCT	79

Startery do klonowania metodą Golden Gate

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Temp. topnienia [°C]*
R1_GG_F	ATCGAGGTCTCAAGCTGTTTCGTTTACATTATATTTTA	50
R1_GG_R	TGAGCGGTCTCTCCGCCGAATCCATTTTTGACCGC	65
R2_GG_F	ATCGAGGTCTCAGCGGCCTGGCGATCGATCCGGCA	76
R2_GG_R	TGAGCGGTCTCTACGATGTCCGGCGTGTTCCTTT	71
R3_GG_F	ATCGAGGTCTCATCGTGGCCATTGTCACTGAAATG	62
R3_GG_R	TGAGCGGTCTCTCATCATTACCATTCTTTCGTTTC	57
R4_GG_F	ATCGAGGTCTCAGATGATGACGAAAAATATCGATTC	56
R4_GG_R	TGAGCGGTCTCTATCTTCCCCTCTCCTTTCGTTATT	65
R5_GG_F	ATCGAGGTCTCAAGATATGGGCATCAAGTGGACAA	66
R5_GG_R	TGAGCGGTCTCTGTCATTAGGATTGTGCAACGATTA	64
R6_GG_F	ATCGAGGTCTCATGACAAAAAGGGATAGACACATG	64
R6_GG_R	TGAGCGGTCTCTTTTTTCATAGCCATGTATGCCGA	63
R7_GG_F	ATCGAGGTCTCAAAAAGGGGTGATCGGCATGGCGAT	74
R7_GG_R	TGAGCGGTCTCTGGATTCGGCAAACAATTTATAGTT	57
R8_GG_F	ATCGAGGTCTCAATCCACCGATAAAAACGGAAATC	58
R8_GG_R	ATGAGCGGTCTCTCGCGAAAAAAGATCCGCTATCC	57

*Temperatury hybrydyzacji (ang. annealing) były zależne od pary starterów używanych do konkretnej PCR. Podane są one w tabelach z profilami termicznymi poszczególnych PCR. Temperatury topnienia starterów hybrydowych dotyczą sekwencji, które ulegały wydłużaniu, bez sekwencji stanowiących „nawisy” (ang. overhang), linkery lub znaczniki molekularne. Temperatury topnienia obliczone były za pomocą kalkulatora OligoEvaluator™ (Sigma-Aldrich, USA).

5.1.5. Enzymy i odczynniki stosowane do manipulacji DNA

5.1.5.1. Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne używane w tej pracy przedstawione są w Tabeli 4.

Tabela 4. Enzymy restrykcyjne używane podczas realizacji badań

Nazwa	Miejsce cięcia	Optymalna temperatura inkubacji	Bufor	Warunki inaktywacji	Producent
<i>DpnI</i> (10 U/ μ l)	5' GA ^{m6} ↓TC 3' 3' CT↑A ^{m6} G 5'	37°C	10 x Bufor Tango	20 min, 80°C	Thermo Fisher, USA
<i>ZraI</i> (10 U/ μ l)	5' GAC↓GTC 3' 3' CTG↑CAG 5'	37°C	Bufor rCutSmart	20 min, 80°C	New England Biolabs, USA
<i>EheI</i> (10 U/ μ l)	5' GGC↓GCC 3' 3' CCG↑CGG 5'	37°C	10 x Bufor Tango	20 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
<i>AarI</i> (2 U/ μ l)	5' CACCTGCN ₄ ↓ 3' 3' GTGGACGN ₈ ↑ 5'	37°C	10 x Bufor AarI	20 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
<i>BspOI</i> (10 U/ μ l)	5' GCTAG↓C 3' 3' C↑GATCG 5'	37°C	10 x Bufor O	20 min, 80°C	Thermo Fisher, USA
FastDigest <i>BglI</i>	5' GCCNNNN↓NGGC 3' 3' CGGN↑NNNNCCG 5'	37°C	10 x Bufor FastDigest/FastDigest Green	5 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
FastDigest <i>MauBI</i>	5' CG↓CGCGCG 3' 3' GCGCGC↑GC 5'	37°C	10 x Bufor FastDigest/FastDigest Green	5 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
FastDigest <i>HindIII</i>	5' A↓AGCTT 3' 3' TTCGA↑A 5'	37°C	10 x Bufor FastDigest/FastDigest Green	5 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
<i>Eco31I</i> (10 U/ μ l)	5' GGTCTCN ₁ ↓ 3' 3' CCAGAGN ₅ ↑ 5'	37°C	10 x Bufor G	20 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
FastDigest <i>BpiI</i>	5' GAAGACN ₂ ↓ 3' 3' CTTCTGN ₆ ↑ 5'	37°C	10 x Bufor FastDigest/FastDigest Green	10 min, 65°C	Thermo Fisher, USA
FastDigest <i>EcoRI</i>	5' G↓AATTC 3' 3' GAATT↑C 5'	37°C	10 x Bufor FastDigest/FastDigest Green	5 min, 65°C	Thermo Fisher, USA

5.1.5.2. Inne enzymy i odczynniki używane do manipulacji DNA oraz immunodetekcji znakowanych białek kapsydowych bakteriofaga TP-84

Enzymy i odczynniki stosowane do manipulacji DNA oraz immunodetekcji znakowanych białek kapsydowych TP-84 przedstawione są w Tabeli 5.

Tabela 5. Enzymy i odczynniki stosowane do PCR, do klonowania metodami Gibsona, Goden Gate, RF Cloning oraz do immunodetekcji

Nazwa	Typ aktywności / zastosowanie	Producent
dGTP, dATP, dTTP, dCTP	Nukleotydy do mieszaniny reakcyjnej do reakcji Gibsona	New England Biolabs, USA
dNTP	Gotowe do użycia, równomolowe roztwory ultraczystych nukleotydów	New England Biolabs, USA
ET SSB	Termostabilne białko wiążące się do jednoniciowego DNA	New England Biolabs, USA
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Gotowa mieszanina do PCR	Thermo Fisher, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Polimeraza o skróconym czasie wydłużania	New England Biolabs, USA
Phusion High-Fidelity Polymerase	Polimeraza do syntezy długich odcinków DNA	New England Biolabs, USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	Polimeraza o wysokiej wierności	New England Biolabs, USA
SapphireAmp fast PCR—hot-start master mix	Gotowa mieszanina reakcyjna używana do kolonijnej PCR	Takara Bio, Japonia
T4 DNA ligase	Ligaza T4 DNA	New England Biolabs, USA
T5 Exonuklease	Egzonukleaza degradująca DNA w kierunku 5' → 3'	New England Biolabs, USA
Taq DNA Ligase	Termostabilna ligaza DNA	New England Biolabs, USA
β-Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)	Dinukleotyd beta-nikotymino adeninowy do reakcji Gibsona	Sigma-Aldrich, USA
2x NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	Mieszanina reakcyjna do reakcji Gibsona	New England Biolabs, USA

SuperSignal West Pico PLUS	Substrat chemiluminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej	Thermo Fisher, USA
Anti-FLAG Tag antibody produced in rabbit	Królicze przeciwciała poliklonalne anty-FLAG	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)– Peroxidase antibody produced in goat	Przeciwciała II-rzędowe anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową	Sigma-Aldrich, USA

5.1.6. Odczynniki do elektroforezy agarozowej

Odczynniki stosowane do elektroforezy agarozowej przedstawione są w Tabeli 6.

Tabela 6. Odczynniki i materiały używane do elektroforezy agarozowej

Nazwa	Zastosowanie	Producent
6 x TriTrack DNA Loading Dye	Barwnik obciążający DNA	Thermo Fisher, USA
1 kb Plus DNA Ladder	Marker wielkości do elektroforezy o zakresie 100 pz do 15000 pz	Thermo Fisher, USA
GeneRuler High Range DNA Ladder	Marker wielkości do elektroforezy o zakresie 10171 pz do 48502 pz	Thermo Fisher, USA
SimplySafe	Barwnik do barwienia DNA w żelu agarozowym	EURx, Polska
Agaroza	Naturalny polisacharyd używany do wykonania żelu agarozowego	Thermo Fisher, USA

5.1.7. Bufory

Używane w pracy bufory przedstawione są w Tabeli 7.

Tabela 7. Bufory używane w pracy

Nazwa	Skład
1 x Bufor TMC	10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , pH 7,3
1 x Bufor MOPS	200 mM kwas 4-morfolinopropanosulfonowy (MOPS), 20 mM octan sodu, 10 mM EDTA, pH 6,8
1 x Bufor TAE	40 mM Tris-HCl, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x Bufor TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x Bufor RF1	0,1 M KCl, 0,05 M MnCl ₂ x 2 H ₂ O, 0,3 M CH ₃ COOK, 15% glicerol, pH 5,8
1 x Bufor RF2	0,5 M MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 15% glycerol, pH 6,8

1 x Bufor reakcji Q5	2 mM MgCl ₂
1 x Bufor Phusion HF	7,5 mM MgCl ₂
1 x Bufor CutSmart	50 mM octan potasu, 20 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 100 µg/ml BSA (surowicza albumina bydłęca), pH 7,9
1 x Bufor Tango	33 mM Tris-octan, 10 mM octan magnezu, 66 mM octan potasu, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9
1 x Bufor T4 DNA ligazy	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5
1 x Bufor AarI	10 mM Bis-Tris Propan-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 6,5
1 x Bufor O	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5
1 x Bufor G	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml, pH 7,5
1 x Bufor TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6
1 x Bufor TM	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO ₄ , pH 7,5

5.1.8. Podłoża i pożywki

Pożywki i podłoża mikrobiologiczne przedstawione są w Tabeli 8.

Tabela 8. Pożywki i podłoża używane w pracy

Nazwa	Skład (na 1000 ml)
Pożywka płynna LB (Luria-Bertani)	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl
Podłoże stałe LA	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl 1,5% (w/o) agar
Pożywka LB wzbogacona do hodowli <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5 mM CaCl ₂ x H ₂ O 0,5% D-fruktoza

Podłoże LA wzbogacone do hodowli <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5 mM CaCl ₂ x H ₂ O 0,5% D-fruktoza 2% agar
Podłoże Top-Agar do miareczkowania bakteriofaga TP-84	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5 mM CaCl ₂ x H ₂ O 0,5% D-fruktoza 0,6% agar
Pożywka P do regeneracji protoplastów <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10	1% (w/o) pepton 0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy 1% (w/o) NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5 mM CaCl ₂ x H ₂ O 5% D-fruktoza

Pożywki i podłoża przed wylaniem zostały wyjałowione poprzez autoklawowanie w 121°C przy ciśnieniu 0,7 atm przez 20 minut.

5.1.9. Antybiotyki

Używane w pracy antybiotyki są przedstawione w Tabeli 9.

Tabela 9. Antybiotyki użyte w pracy

Nazwa	Stężenie końcowe [µg/ml]	Producent
Ampicylina	50	Carl Roth, Niemcy
Streptomycyna	50	BioShop, Kanada
Chloramfenikol	15	Carl Roth, Niemcy

5.1.10. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji materiału genetycznego z wirusów Viral Mini Kit PLUS (Syngen Biotech, Polska)
- Zestaw do oczyszczania produktów PCR i ekstrakcji DNA z żelu agarozowego Nucleospin Gel and PCR CleanUp (Takara Bio, Japonia)
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA Gene MATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx, Polska)
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.11. Materiały podstawowe

- Cienkościenne probówki do PCR (0,2 ml) – Bionovo, Polska
- Kolby szklane o pojemności 50 ml, 100 ml, 200 ml i 1000 ml
- Końcówki do pipet automatycznych – Sarstedt, Niemcy
- Probówki Eppendorfa (2 ml i 1,5 ml) – Sarstedt, Niemcy
- Probówki wirówkowy typu Falcon (15 ml i 50 ml) – Jet Biofil, Chiny
- Pudełka na probówki do głębokiego mrożenia – Biologix, Chiny
- Szalki Petriego plastikowe - Sarstedt, Niemcy
- Szklane probówki

5.1.12. Aparatura, sprzęty i materiały laboratoryjne

- Aparat do elektroforezy agarozowej MUPID One – Nippon Genetics, Japonia
- Autoklaw – Spectro-Lab, Polska
- Filtry strzykawkowe, Millex-GP 0,22 μ m, 33 mm- Merc Millipore, USA
- Klisze rentgenowskie – CL-XPosure Film, 13x18 cm - Thermo Fisher, USA
- Kołyska laboratoryjna MR-1 – Biosan, Polska
- Koncentrator próżniowy Concentrator Plus, Eppendorf, Niemcy
- Kuchenka mikrofalowa – Sharp, Japonia

- Membrany nitrocelulozowe Whatman Protran BA 83 0,2 μm – Cytiva, USA
- Parafilm PM-996 – Bemis, USA
- pH-metr – Mettler Toledo, USA
- Pipety automatyczne – Eppendorf, Niemcy
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 – Thermo Fisher, USA
- Spektrofotometr SmartSpec 3000 – Bio-Rad, USA
- Strzykawki BD Discardit II 5 ml, 10 ml, 20 ml – Becton Dickinson, USA
- Termoblok HB-2 – Wealtec, Tajwan
- Termocykler Mastercycler X50 – Eppendorf, Niemcy
- Termomikser ThermoMixer C – Eppendorf, Niemcy
- Transluminator – Wealtec, Tajwan
- Ultrawirówka Optima XPN-100 - Beckman Coulter Life Sciences, USA
- Utrwalacz i dopełniacz Kodak RP X-OMAT LO – Carestream, Polska
- Waga elektroniczna – Steinberg, Niemcy
- Wirówka 3-16KL - Sigma, Niemcy
- Wirówka MiniSpin – Eppendorf, Niemcy
- Wytrząsarka powietrzna Series 25 – New Brunswick Scientific, USA
- Wytrząsarka Vortex Wizard – VELP Scientifica, Włochy
- Wytrząsarka wodna OLS200 – Grant, Wielka Brytania
- Wywoływacz i dopełniacz Kodak X-OMAT EX II – Carestream, Polska
- Zamrażarka niskotemperaturowa TwinGuard – PHCbi, Singapur

5.1.13. Usługi

- Sekwencjonowanie – Macrogen Europe, Holandia
- Synteza oligonukleotydów – Sigma-Aldrich, Niemcy

5.1.14. Programy komputerowe i strony internetowe

- <http://rf-cloning.org/> - projektowanie starterów i warunków PCR do klonowania metodą RF
- <https://pl.promega.com/resources/tools/biomath/> - obliczanie stężeń molowych fragmentów DNA używanych w klonowaniu metodą Gibsona oraz Golden Gate
- <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> - kalkulator obliczający masę wstawek (fragmentów DNA namnażanych za pomocą PCR) stosowanych w reakcji ligacji, przy różnych stosunkach molowych wektora plazmidowego do wstawek
- <http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet> - analizowanie sekwencji oligonukleotydów
- SnapGene – analiza sekwencji, starterów, projektowanie doświadczeń itp.
- Benchling.org – tworzenie map restrykcyjnych, analiza sekwencji itp.
- Geneious Prime – analiza i obrazowanie wyników sekwencjonowania nowej generacji

5.2. Metody

5.2.1. Metody hodowli *Geobacillus stearothermophilus* 10, bakteriofaga TP-84, oczyszczanie lizatów bakteriofagowych

5.2.1.1. Namnażanie *Geobacillus stearothermophilus* 10

Hodowlę nocną *G. stearothermophilus* 10 zaszczepiałam poprzez zamoczenie jałowej końcówki do pipet w probówce Eppendorfa z konserwą szczepu bakteryjnego, a następnie umieszczenie go w 50 ml jałowej pożywki LB uzupełnionej z 10 mM chlorkiem magnezu, 5 mM chlorkiem wapnia, 0,5% fruktozą oraz streptomycyną do końcowego stężenia 50 µg/ml [Materiały 5.1.8.]. Tak przygotowaną hodowlę bakteryjną umieszczałam w wytrząsarce powietrznej w 58°C, przez noc była ona inkubowana z wytrząsaniem przy 200 obr./min (ang. revolutions per minute, liczba obrotów na minutę). Namnożone bakterie *G. stearothermophilus* 10 używałam następnie do namnażania bakteriofaga TP-84. Wykonałam również konserwy

poprzez zmieszanie 700 μ l hodowli nocnej oraz 300 μ l 80% glicerolu, które po zamrożeniu w ciekłym azocie przechowywałam w -80°C .

5.2.1.2. Namnażanie bakteriofaga TP-84

Hodowlę nocną *G. stearothermophilus* 10 odmładzałam w stosunku 1:200, zawieszając 250 μ l hodowli nocnej w 50 ml wzbogaconej pożywki LB ze streptomycyną o końcowym stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Hodowla płynna była inkubowana z wytrząsaniem 200 obr./min w temperaturze 58°C do momentu, aż wartość pomiaru gęstości optycznej (OD) przy długości fali 540 nm wynosiła $\text{OD}_{540\text{nm}} = 0,2-0,8$, co wskazywało, że bakterie znajdują się w wykładniczej fazie wzrostu [4]. Następnie do hodowli dodawałam fruktozę do stężenia końcowego 1% i prowadziłam hodowlę w wyżej opisanych warunkach przez kolejne 30 minut. Dodatek fruktozy zwiększał żywotność bakterii w momencie infekcji oraz ograniczał możliwość sporulacji bakterii. Po upływie 30 minut do kolby z hodowlą bakteryjną dodawałam 100 μ l lizatu bakteriofaga TP-84 o wysokim mianie, około 10^{12} PFU/ml (jednostki tworzące łyśinki/ml, ang. plaque forming unit/ml). Wartość MOI (ang. MOI – multiplicity of infection, wartość ta opisuje liczbę wirionów przypadających na zakażaną komórkę bakteryjną) w momencie dodawania bakteriofagów do hodowli bakteryjnej wynosiła $\text{MOI}=0,1$. Aby umożliwić swobodną adsorpcję bakteriofagów na powierzchni komórek bakterii, kolbki pozostawiałam w temperaturze 58°C bez wytrząsania przez pierwsze 10 minut po infekcji. Po tym czasie hodowla płynna była ponownie inkubowana z wytrząsaniem 200 obr./min w 58°C , aż wartość $\text{OD}_{540\text{nm}}$ spadła poniżej 0,1. Po skończonej hodowli dodawałam do kolby 150 μ l chloroformu, aby usunąć ewentualne żywe komórki bakteryjne. Lizat przechowywałam w lodówce w celu oznaczenia jego miana i wykonywania dalszych eksperymentów. Sporządzałam także konserwy, poprzez zmieszanie 700 μ l lizatu oraz 300 μ l 80% glicerolu, które przechowywałam w -80°C .

5.2.1.3. Oczyszczanie i zagęszczanie lizatu bakteriofagowego

Pierwszą z metod, które zastosowałam w celu oczyszczenia i zagęszczenia lizatu bakteriofaga TP-84, była precypitacja z użyciem roztworu 20% PEG 8000/2,5 M NaCl. Lizat

podzielony na równe objętości umieszczałam w probówkach wirówkowych typu Falcon i dodawałam roztwór PEG8000/2,5 M NaCl w proporcji 4:1 (lizat:roztwór do precypitacji), a następnie delikatnie mieszałam przez odwracanie. Lizaty były inkubowane w lodzie, w temperaturze 5°C, przez noc. Następnego dnia probówki typu Falcon z precypitatem umieszczałam w wirówce, warunki wirowania były następujące: 11000 obr./min, 4°C, 20 minut. Po zakończonym wirowaniu wylewałam supernatant, a do pozostałego osadu dodawałam 0,5 ml buforu TMC [Materiały 5.1.7.], całość rozpipetowywałam i ponownie zostawiałam na noc w temperaturze w 5°C. Kolejnego dnia osad zawieszony w buforze TMC przenosiłam pipetą do małych probówek Eppendorfa i wirowałam (14000 obr./min, 4°C, 10 minut). Supernatant, stanowiący oczyszczony i zagęszczony lizat bakteriofagowy, przenosiłam do jałowych probówek Eppendorfa. Zagęszczony lizat przechowywałam w lodówce do dalszych manipulacji lub wykonywałam konserwy poprzez zmieszanie 700 µl lizatu oraz 300 µl 80% glicerolu, które przechowywałam w -80°C.

Drugą metodą służącą do dalszego zagęszczenia lizatu bakteriofaga TP-84 było ultrawirowanie w gradiencie gęstości chlorku cezu. Do probówek wirówkowych Beckmann wtłaczałam igłą kolejno 2 ml roztworu CsCl o gęstości 1,7 g/m³, 2 ml roztworu CsCl o gęstości 1,5 g/m³, 2 ml roztworu CsCl o gęstości 1,3 g/m³, 1,5 ml lizatu bakteriofaga TP-84 po precypitacji w roztworze PEG8000/NaCl i dopełniałam probówki do pełna buforem TMC, dodatkowo równoważąc je. Lutowałam szyjki probówek i umieszczałam je w ultrawirówce, gdzie wirowały się przy prędkości 30000 obr./min w 4°C przez 2 godziny. Po zakończeniu wirowania wprowadzałam strzykawkę z igłą do środka probówki wirówkowej poprzez nakłucie na poziomie uwidocznionego białego prążka, stanowiącego zagęszczone bakteriofagi TP-84, które zbierałam do jałowej probówki Eppendorfa. Zagęszczony lizat przechowywałam w lodówce lub wykonywałam konserwy poprzez zmieszanie 700 µl lizatu oraz 300 µl 80% glicerolu, które przechowywałam w -80°C.

5.2.1.4. Oznaczanie miana lizatu bakteriofagowego metodą płytek dwuwarstwowych

Oznaczenie miana lizatu, przed i po zagęszczaniu, pozwala ustalić wydajność oczyszczania, jak również samej metody namnażania bakteriofagów. Odmładzałam hodowlę nocną *G. stearothermophilus* 10 w stosunku 1:20, zawieszając 1 ml hodowli nocnej w 20 ml

świeżej wzbogaconej pożywki LB z dodatkiem streptomycyny (50 µg/ml). Odmłodzona hodowla była inkubowana w temperaturze 58°C z wytrząsaniem 200 obr./min, aż do wartości $OD_{540nm}=1,3-1,5$. Po osiągnięciu tej wartości do hodowli dodawałam fruktozę do końcowego stężenia 1%, i prowadziłam hodowlę przez kolejne 30 minut. W międzyczasie rozgrzewałam do 58°C podłoże półpłynne Top-Agar LB uzupełnione w sole magnezu i wapnia, 0,5% fruktozy oraz streptomycynę o końcowym stężeniu 50 µg/ml [Materiały 5.1.8.]. Płytki z wylanym wcześniej wzbogaconym podłożem LA [Materiały 5.1.8.] wstawiałam do ciepłarki rozgrzanej do 42°C na 20 minut. Wykonywałam seryjne rozcieńczenia badanego lizatu bakteriofaga TP-84 w probówkach Eppendorfa w zakresie od 10^{-1} do 10^{-12} , rozpoczynając od dodania 100 µl lizatu do 900 µl wzbogaconej pożywki LB. Następnie do szklanych, jałowych probówek dodawałam po 0,2 ml hodowli płynnej *G. stearothermophilus* 10 i po 0,1 ml wybranych rozcieńczeń lizatu bakteriofaga TP-84 (zwykle były to rozcieńczenia od 10^{-5} do 10^{-12}). Tak przygotowane probówki były inkubowane z wytrząsaniem 200 obr./min w 58°C przez 10 minut, po czym dolewałam do nich po 3 ml wcześniej rozgrzanego wzbogaconego Top-Agaru, mieszałam i wylewałam mieszaninę na płytki z podłożem wzbogaconym LA. Płytki były inkubowane przez noc w 58°C, po czym określałam miano bakteriofaga TP-84 na podstawie liczby łysinek widocznych na danym rozcieńczeniu na płytce. Stosowany wzór:

$$\text{PFU/ml} = a * 1/10^n * 10$$

(1)

Gdzie:

PFU/ml – miano bakteriofaga, czyli liczba cząstek wirusa zdolnych do uformowania łysinki w 1 ml lizatu

a – liczba łysinek bakteriofagowych na płytce przy danym rozcieńczeniu

10^n – rozcieńczenie lizatu

10 – ilość użytego lizatu bakteriofagowego wynosiła 0,1 ml, czyli wynik należy pomnożyć przez 10, ponieważ miano określa ilość cząstek wirusowych w 1 ml

5.2.2. Transfekcja protoplastów *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84

5.2.2.1. Przygotowanie protoplastów bakterii

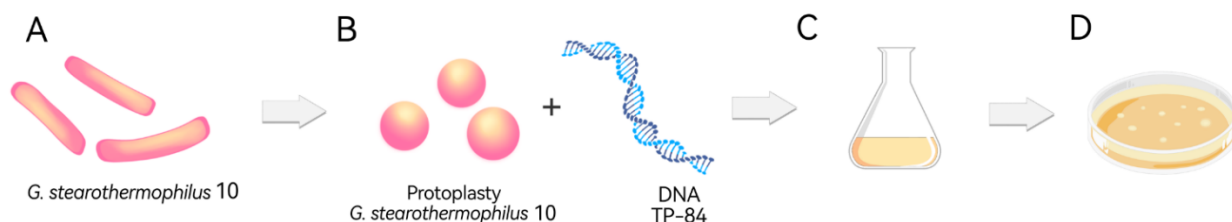
***G. stearothermophilus* 10**

Hodowlę nocną bakterii *G. stearothermophilus* 10 prowadzoną w wzbogaconej pożywce LB [Materiały 5.1.8.] ze streptomycyną o końcowym stężeniu 50 µg/ml odmładzałam w stosunku 1: 50 i prowadziłam hodowlę do $OD_{540nm}=0,5-1$. Następnie wirowałam (10°C, 7480 obr./min, 2 minuty) po 2 ml hodowli w probówkach Eppendorfa. Uzyskany osad zawieszałam w 500 µl pożywki P, która używana była do regeneracji protoplastów i składała się z pożywki płynnej LB z dodatkiem soli magnezu i wapnia, streptomycyny oraz 5% D-fruktozy [Materiały 5.1.8.]. Do bakterii w pożywce P dodawałam 10 µl lizozymu (2 mg/ml) i wstawiałam probówki do termobloku nagrzanego do 37°C na 20 minut, następnie wirowałam probówki (10°C, 3085 obr./min, 5 minut). Po odrzuceniu supernatantu, osad zawieszałam w 800 µl pożywki P i po wymieszaniu zawartości wykonywałam drugie wirowanie (10°C, 3085 obr./min, 5 minut), następnie odrzucałam supernatant, osad zawieszałam w 800 µl pożywki P i po wymieszaniu ponownie je wirowałam (3085 obr./min, 10°C, 5 minut). Uzyskane protoplasty zawarte w osadzie zawieszałam w 150 µl pożywki P.

5.2.2.2. Transfekcja protoplastów DNA bakteriofaga TP-84

Do otrzymanych protoplastów *G. stearothermophilus* 10 zwieszonych w 150 µl pożywki do regeneracji protoplastów P dodawałam 800-1000 ng DNA bakteriofaga TP-84 oraz 900 µl roztworu 30% PEG8000 w pożywce P. Mieszaninę inkubowałam przez 10 minut na lodzie, następnie probówki wirowałam (3960 obr./min, 10°C, 3 minuty). Po odrzuceniu supernatantu, osad zawieszałam w 200 µl pożywki P, a następnie umieszczałam probówki w termomikserze, ustawiając wytrząsanie na 400 obr./min w 50°C przez 30 minut. Po zakończeniu wytrząsania probówki umieszczałam w termobloku nagrzanym do 58°C i dodawałam po 300 µl odmłodzonej hodowli płynnej gospodarza, czyli bakterii *G.*

stearotherophilus 10 ($OD_{540nm}=0,6-1,5$). Po inkubacji w termobloku przez 10 minut, mieszaniny protoplastów i gospodarza przenosiłam do jałowych szklanych probówek i dodawałam do nich po 3 ml rozgrzanego do 60°C podłoża Top Agar do miareczkowania bakteriofaga TP-84 [Materiały 5.1.8.], ale z podwyższonym stężeniem D-fruktozy do 2,5% oraz dodatkiem streptomycyny (50 $\mu\text{g/ml}$). Po dokładnym wymieszaniu zawartość probówek wylewałam na płytki z wcześniej wylanym podłożem stałym LA wzbogaconym w D-fruktozę i sole [Materiały 5.1.8.]. Płytki pozostawiałam w temperaturze 55-58°C przez noc. Schemat przygotowywania i transfekcji protoplastów *G. stearotherophilus* 10 przedstawiony jest na Rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat przygotowywania i transfekcji protoplastów *G. stearotherophilus* 10 genomem bakteriofaga TP-84. A. Przygotowanie protoplastów bakterii *G. stearotherophilus* 10 przy użyciu lizozymu. B. Transfekcja protoplastów materiałem genetycznym wyizolowanym z bakteriofaga TP-84 przy użyciu roztworu 30% PEG8000. C. Dodanie transfekowanych protoplastów do hodowli płynnej gospodarza, czyli bakterii *G. stearotherophilus* 10. D. Wylanie mieszaniny z Top Agarem na płytki z podłożem stałym, inkubacja i obserwacja w kierunku obecności łyseinek.

5.2.3. Izolacja DNA

5.2.3.1. Izolacja genomowego DNA bakteriofaga TP-84

Bakteriofagi TP-84 namnażałam [Metody 5.2.1.2.] oraz oczyszczałam poprzez precypitację z użyciem roztworu 20% PEG 8000/2,5 M NaCl [Metody 5.2.1.3.]. Do izolacji DNA z zagęszczonego i oczyszczonego lizatu używałam zestawu Viral Mini Kit PLUS (Syngen, Polska). Izolację przeprowadzałam według protokołu producenta, do elucji używałam 50 μl wody wolnej od nukleaz (Roth, Niemcy). Po zakończonej izolacji dokonywałam analizy jakościowej i ilościowej DNA [Metody 5.2.4.]. Preparaty zawierające wyizolowany DNA przechowywałam w jałowych probówkach Eppendorfa w -20°C.

5.2.3.2. Izolacja plazmidowego DNA z komórek *E. coli* DH5 α

Kolonie bakteryjną zaszczepiałam w 20 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny o końcowym stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Hodowlę bakteryjną prowadziłam przez noc w wyrzäsarce wodnej przy 180 obr./min w 37°C. Następnego dnia hodowlę wirowałam (10000 obr./min, 10 minut, 4°C) i przeprowadzałam izolację plazmidowego DNA z użyciem zestawu GeneMATRIX Miniprep DNA Purification Kit (EURx, Polska), zgodnie z protokołem producenta. Elucję wykonywałam 50 μl wody wolnej od nukleaz (Roth, Polska). Po zakończonej izolacji dokonywałam analizy jakościowej i ilościowej DNA [Metody 5.2.4.]. Preparaty zawierające wyizolowany DNA przechowywałam w jałowych probówkach Eppendorfa w -20°C.

5.2.3.3. Izolacja plazmidowego DNA z komórek *E. coli*

TransforMax EPI300

Z kolonii bakteryjnej wykonywałam hodowlę nocną w 50 ml pożywki LB z dodatkiem chloramfenikolu (15 $\mu\text{g/ml}$). Następnego dnia odmładzałam hodowlę w stosunku 1:50 w pożywce LB z chloramfenikolem (15 $\mu\text{g/ml}$) oraz dodatkiem L-(+)-Arabinozy o końcowym stężeniu 1 mM. Hodowlę prowadziłam 12 godzin po czym 10-20 ml hodowli wirowałam (10 min, 4000 g, 4°C) i izolowałam plazmid z użyciem zestawu GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) według protokołu producenta, do elucji używałam 50-100 μl wody wolnej od nukleaz (Roth, Niemcy). Po zakończonej izolacji dokonywałam analizy jakościowej i ilościowej DNA [Metody 5.2.4.]. Preparaty zawierające wyizolowany DNA przechowywałam w jałowych probówkach Eppendorfa w -20°C.

5.2.3.4. Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Izolację fragmentów DNA z żelu agarozowego przeprowadzałam używając zestawu Nucleospin Gel and PCR CleanUp (Takara Bio, Japonia), zgodnie z instrukcją producenta. Elucję wykonywałam 20-30 μl wody wolnej od nukleaz (Roth, Polska). Po zakończonej izolacji

dokonywałam analizy jakościowej i ilościowej DNA [Metody 5.2.4.]. Preparaty zawierające wyizolowany DNA przechowywałam w jałowych probówkach Eppendorfa w -20°C .

5.2.4. Ocena ilościowa i jakościowa DNA

Ocenę ilościową i jakościową otrzymanych preparatów DNA dokonywałam na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy użyciu spektrofotometru Nanodrop. Ilość DNA w próbce, podawana w $\text{ng}/\mu\text{l}$, określana była automatycznie w oparciu o wartość absorbancji przy długości fali 260 nm, współczynnik ekstynkcji oraz długość drogi optycznej (równanie Beer'a-Lamberta). Ocena jakościowa preparatu DNA opierała się na analizie dwóch współczynników czystości: A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Pierwszy współczynnik to stosunek wartości absorbancji przy długości fali 260 nm do wartości absorbancji przy 280 nm, który dla czystego DNA powinien wynosić około 1,8 [7]. Jeżeli wartość tego współczynnika jest wyższa może to wskazywać na zanieczyszczenie badanego preparatu RNA, natomiast jeśli wartość jest poniżej 1,8 to próbka może być zanieczyszczona białkami [8]. Drugi współczynnik to stosunek wartości absorbancji przy 260 nm do wartości absorbancji przy 230 nm. Dla czystego preparatu DNA powinien wynosić on między 1,8 a 2,2. Niższe wartości mogą wskazywać na zanieczyszczenie próbki substancjami wykazującymi maksimum absorpcji przy długości fali 230 nm, na przykład fenolem, EDTA lub związkami organicznymi.

5.2.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym

W jałowej kolbce przygotowywałam 0,4-1% żel agarozowy poprzez dodanie odpowiedniej ilości agarozy do 70 ml buforu 0,5 x TAE. Po całkowitym rozpuszczeniu agarozy w kuchence mikrofalowej, dodawałam do roztworu 5 μl barwnika SimplySafe (EURx, Polska). Przygotowany żel wylewałam do sanek aparatu, wkładałam grzebień i pozostawiałam do zastygnięcia na około 15-30 minut. Następnie żel umieszczałam w aparacie do elektroforezy i wlewałam bufor 0,5 x TAE w takiej ilości, aby pokrył on żel 2-5 mm warstwą. Próbkę DNA wymieszane z 2-5 μl barwnika obciążającego 6 x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher, USA) nanosiłam do studzienek w żelu agarozowym. Próbkę po kolonijnej PCR (ang. polymerase chain reaction) nanosiłam na żel bezpośrednio, bez dodawania barwnika

obciążającego, który był obecny w mieszaninę reakcyjnej. W jednym z dołków umieszczałam około 2 μ l markera wielkości 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, USA). Zamykałam aparat do elektroforezy, podłączałam do prądu i nastawiałam napięcie na 70-135 V, a czas trwania elektroforezy na 20-40 minut. Po zakończeniu elektroforezy żel obserwowałam w transiluminatorze UV.

5.2.6. Transformacja materiału biologicznego

5.2.6.1. Transformacja *E. coli* DH5 α

5.2.6.1.1. Przygotowanie komórek chemokompetentnych *E. coli* szczepu DH5 α

Szczep *E. coli* DH5 α przygotowywany był metodą Hanahana [9]. Z konserwy zaszczipiałam hodowlę bakteryjną w 5 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny o końcowym stężeniu 50 μ g/ml, która była inkubowana przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 obr./min. Następnego dnia hodowlę nocną odmładzałam w stosunku 1:100 w 50 ml pożywki płynnej LB z dodatkiem ampicyliny (50 μ g/ml) i prowadziłam hodowlę w 37°C z wytrząsaniem 180 obr./min do OD₅₇₅=0,3-0,5. Po osiągnięciu tej wartości, hodowlę bakteryjną umieszczałam w lodzie na 15 minut, a następnie ją wirowałam (4000 obr./min, 10 minut, 4°C). Osad bakteryjny zawieszałam w 16 ml zimnego buforu RF1 [Materiały 5.1.7.] i umieszczałam w lodzie na 30 minut. Następnie ponownie wirowałam jak wyżej, a otrzymany osad zawieszałam w 4 ml zimnego buforu RF2 [Metody 5.1.7.] i umieszczałam w lodzie na 15 minut. Tak otrzymane komórki chemokompetentne, zdolne do pobierania plazmidowego DNA, rozdzielałam po 100 μ l do jałowych probówek Eppendorfa, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80°C.

5.2.6.1.2. Transformacja komórek chemokompetentnych *E. coli* DH5 α

Zamrożone komórki kompetentne umieszczałam w lodzie na 10 minut w celu ich wstępnego rozmrożenia. Następnie dodawałam do nich 100 ng plazmidu lub całą objętość PCR po trawieniu enzymem *DpnI* (20 μ l) [Metody 5.2.8.1.4.]. Komórki kompetentne z dodanym materiałem genetycznym były inkubowane w lodzie przez 30 minut. Po tym czasie wywoływałam szok cieplny poprzez przeniesienie probówek z lodu do 42°C na 90 sekund, a następnie z powrotem umieszczałam je w lodzie na 2 minuty. Do probówek dodawałam 1 ml jałowej pożywki LB i umieszczałam je w termomikserze nagrzanym do 37°C, gdzie inkubowały się z wytrząsaniem 1000 obr./min przez godzinę. Po tym czasie próbki wirowałam przez 5 minut przy 4500 obr./min i usuwałam 1 ml supernatantu. Osad zawieszałam w pozostałym supernatancie i całość wysiewałam na płytce Petriego z wcześniej wylanym podłożem LA z dodatkiem 100 mM IPTG, 20 mg/ml X-Gal oraz ampicyliny o końcowym stężeniu 50 μ l/mg. Płytki umieszczałam w temperaturze w 37°C, następnego dnia płytki wyjmowałam i przechowywałam w lodówce.

5.2.6.2. Transformacja komórek chemokompetentnych *E. coli* TransforMax EPI300

Zamrożone komórki chemokompetentne *E. coli* TransforMax EPI300 (Lucigen, USA) umieszczałam w lodzie na 10 minut w celu ich wstępnego rozmrożenia. Następnie dodawałam do całej objętości reakcji Gibsona [Metody 5.2.8.2.] lub połowę objętości reakcji Golden Gate [Metody 5.2.8.3.]. Probówki pozostawiałam w lodzie na 30 minut, po czym wywoływałam szok cieplny poprzez przeniesienie probówek z lodu do 42°C na 90 sekund, a następnie z powrotem umieszczałam je w lodzie na 5 minut. Do probówek dodawałam 1 ml jałowej pożywki LB i umieszczałam je w termomikserze nagrzanym do 37°C, gdzie inkubowały się z wytrząsaniem 1000 obr./min przez godzinę. Po tym czasie próbki wirowałam przez 5 minut przy 4500 obr./min i usuwałam 1 ml supernatantu. Osad zawieszałam w pozostałym supernatancie i całość wysiewałam na płytce Petriego z wcześniej wylanym podłożem LA z dodatkiem 100 mM IPTG, 20 mg/ml X-Gal oraz chloramfenikolu o końcowym stężeniu 15 μ g/ml. Płytki umieszczałam w temperaturze w 37°C, następnego dnia płytki wyjmowałam i przechowywałam w lodówce.

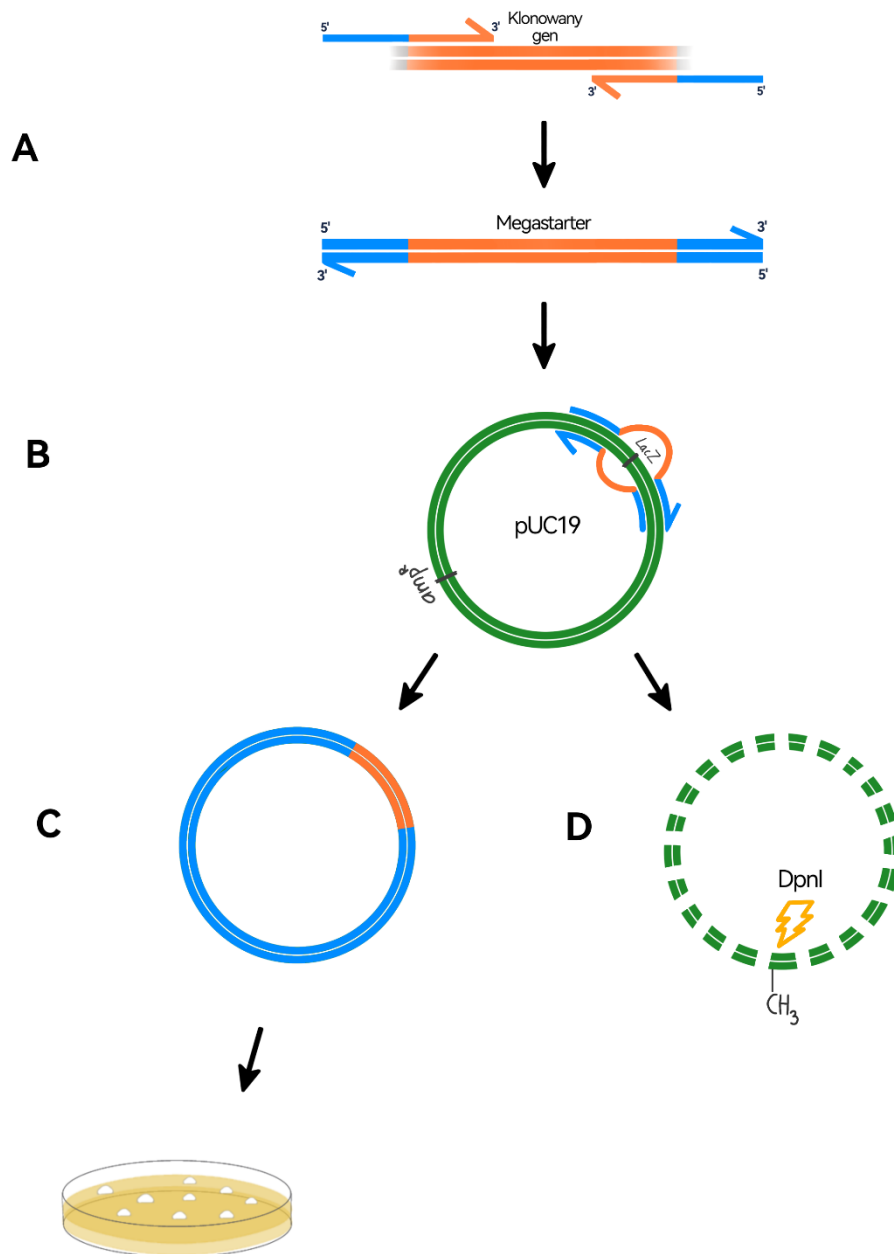
5.2.7. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

Po reakcjach enzymatycznych, takich jak trawienie restrykcyjne lub PCR, DNA oczyszczalam zestawem Nucleospin Gel and PCR CleanUp (Takara Bio, Japonia), według protokołu producenta. Elucje materiału genetycznego wykonywałam wodą wolną od nukleaz (Roth, Niemcy), przeważnie w objętości 30-70% mniejszej od początkowej objętości mieszaniny reakcyjnej.

5.2.8. Klonowanie DNA

5.2.8.1. Klonowanie metodą RF

Klonowanie RF (ang. restriction-free cloning) jest metodą umożliwiającą precyzyjne wstawienie dowolnej sekwencji DNA do wybranej lokalizacji w plazmidzie, bez użycia enzymów restrykcyjnych a więc niezależnie od miejsc restrykcyjnych, oraz bez konieczności ligacji [10]. W tej metodzie klonowany gen jest amplifikowany podczas PCR typu Touch-Down z użyciem starterów, które są komplementarne do genu oraz do docelowego plazmidu. W wyniku pierwszej PCR powstaje tzw. „megastarter”, który zawiera pełną sekwencję wstawki, czyli klonowanego genu, oraz jest oflankowany sekwencjami komplementarnymi do plazmidu. Podczas drugiej PCR, plazmid, stanowiący matrycę, jest amplifikowany w obu kierunkach a megastarter działa jak długie jednoniciowe „nawisy” (ang. overhang), co umożliwia niciom komplementarnym plazmidu hybrydyzować (ang. anneal), tworząc plazmid z klonowanym genem umieszczonym precyzyjnie w miejscu docelowym. Po drugiej PCR, enzym restrykcyjny *DpnI* zostaje użyty, aby selektywnie zdegradować metylowany, matrycowy plazmid. Natomiast niemetylowany, hybrydowy plazmid zsyntetyzowany *in vitro* zostaje wykorzystany do transformacji komórek kompetentnych. Klonowanie RF zostało schematycznie przedstawione na Rycinie 2.



Ryc. 2. Schemat metody klonowania RF. **A.** Pierwsza PCR skutkuje utworzeniem megastartera, który jest cząsteczką hybrydową zawierającą klonowany gen docelowy oraz jest oflankowany fragmentami homologicznymi do miejsca insercji w wektorze plazmidowym, które odpowiadają za prawidłowe przyłączenie megastartera i precyzyjne powielenie klonowanego genu. **B.** Podczas drugiej PCR megastarter dostarcza końce 3'-OH do liniowej reakcji amplifikacji. Megastarter integruje docelowy insert i powstaje kolista cząsteczka DNA zawierająca jednoniciowe pęknięcia (ang. nick). **C.** Nowo zsyntetyzowany kolisty plazmid nie jest metylowany, dlatego podczas trawienia enzymem DpnI nie ulega rozpadowi i może być użyty do transformacji przy użyciu komórek kompetentnych. **D.** Wektor macierzysty jest trawiony przez enzym DpnI w miejscach sekwencji GATC, które są metylowane.

5.2.8.1.1. Projektowanie starterów

Pierwszym etapem klonowania RF było zaprojektowanie starterów. Do tego celu użyto programu ze strony internetowej <http://rf-cloning.org>, wklejając w odpowiednie okna sekwencję nukleotydową docelowego plazmidu z zaznaczonym miejscem wstawienia klonowanego genu, oraz sekwencję nukleotydową wybranego genu bakteriofaga TP-84 [11]. Zaprojektowane startery hybrydowe były komplementarne do wybranego, klonowanego genu bakteriofaga TP-84, oraz posiadały około 20 nukleotydów na końcu 5', które były komplementarne do matrycy, czyli plazmidu pUC19. Użyty program wskazywał również optymalne warunki dla drugiej PCR, w tym czas wydłużania, oraz ilości megastartera i plazmidu, które należało dodać do mieszaniny reakcyjnej (Tabela 10). Szczegółowe zestawienie wszystkich starterów użytych do klonowania metodą RF znajduje się w Tabeli 3.

Tabela 10. Ilości DNA oraz długości megastartera i konstruktorów używanych do klonowania metodą RF, obliczone za pomocą programu ze strony <https://www.rf-cloning.org/>

Klonowany insert	Plazmid docelowy	Ilość plazmidu [ng]	Ilość insertu (megastartera) [ng]	Długość megastartera [ng]	Długość docelowego konstruktów [pz]	Czas wydłużania w drugiej PCR
TP-84_06	pUC19	32,2	401,5	1673	4315	4 min
TP-84_08	pUC19	32,2	501,6	2090	4732	4,5 min
TP-84_12	pUC19	32,2	248,9	1037	3679	3,5 min
TP-84_18	pUC19	32,2	144,5	602	3244	3 min
TP-84_22	pUC19	32,2	187,8	780	3424	3 min
TP-84_74	pUC19	32,2	141,6	590	3232	3 min
FLAG-N	pUC19	32,2	26,4	75	2752	3 min
FLAG-C	pUC19	32,2	26,4	75	2752	3 min
TP-84_06	pUC19-FLAG-N	33,2	400,8	1670	4390	4 min
TP-84_08	pUC19-FLAG-N	33,2	500,9	2087	4807	5 min
TP-84_12	pUC19-FLAG-N	33,2	248,2	1034	3754	3,5 min
TP-84_18	pUC19-FLAG-N	33,2	143,8	599	3319	3 min
TP-84_22	pUC19-FLAG-N	33,2	187	779	3499	3,5 min
TP-84_74	pUC19-FLAG-N	33,2	140,9	587	3307	3 min
TP-84_06	pUC19-FLAG-C	33,2	400,8	1670	4390	4 min

TP-84_08	pUC19-FLAG-C	33,2	500,9	2087	4807	5 min
TP-84_12	pUC19-FLAG-C	33,2	248,2	1034	3754	3,5 min
TP-84_18	pUC19-FLAG-C	33,2	143,8	599	3319	3 min
TP-84_22	pUC19-FLAG-C	33,2	187	779	3499	3,5 min
TP-84_74	pUC19-FLAG-C	33,2	140,9	587	3307	3 min
His-N-TP-84_06	pUC19	32,2	408	1700	4342	4 min
His-N-TP-84_08	pUC19	32,2	508,1	2117	4759	4,5 min
His-N-TP-84_12	pUC19	32,2	255,4	1064	3706	3,5 min
His-N-TP-84_18	pUC19	32,2	151	629	3271	3 min
His-N-TP-84_22	pUC19	32,2	194,2	809	3451	3 min
His-N-TP-84_74	pUC19	32,2	148,1	617	3259	3 min
TP-84_06-His-C	pUC19	32,2	408	1700	4342	4 min
TP-84_08-His-C	pUC19	32,2	508,1	2117	4759	4,5 min
TP-84_12-His-C	pUC19	32,2	255,4	1064	3706	3,5 min
TP-84_18-His-C	pUC19	32,2	151	629	3271	3 min
TP-84_22-His-C	pUC19	32,2	194,2	809	3451	3 min
TP-84_74-His-C	pUC19	32,2	148,1	617	3259	3 min

5.2.8.1.2. Pierwsza reakcja PCR

Do powielania megastarterów stosowałam PCR typu Touch Down. Jest to modyfikacja klasycznej metody PCR, w której temperatura przyłączania starterów ulega obniżeniu o 1°C z każdym cyklem. Etap przyłączania starterów rozpoczyna się od temperatury wyższej niż temperatura topnienia starterów (T_m), aż do przybliżonej temperatury przyłączania się starterów, w której amplifikacja jest kontynuowana do końca PCR. Mieszaninę reakcyjną

wykonywałam w cienkościennych probówkach do PCR, skład był następujący: 200 ng wyizolowanego materiału genetycznego bakteriofaga TP-84, 2 µl startera „forward” do klonowania metodą RF (o stężeniu 10 µM) (Tabela 3), 2 µl startera „reverse” do klonowania metodą RF (o stężeniu 10 µM) (Tabela 3), 25 µl Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher, USA), objętość uzupełniałam wodą wolną od nukleaz (Roth, Niemcy) do 50 µl. Warunki pierwszej PCR typu Touch Down przedstawione są w Tabeli 11.

Tabela 11. Profil czasowo-termiczny pierwszej PCR typu Touch Down podczas klonowania metodą RF

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	20 s	1x
Denaturacja	98°C	10 s	14x/21x
Przyłączanie starterów	68-55°C/55°C	20 s	14x/21x
Wydłużanie	72°C	30 s	14x/21x
Końcowe wydłużanie	72°C	5 min	1x

Po skończonej reakcji uzyskane megastartery były analizowane spektrofotometrycznie [Metody 5.2.4.], za pomocą elektroforezy agarozowej [Metody 5.2.5.], oraz oczyszczane [Metody 5.2.7.].

5.2.8.1.3. Druga reakcja PCR

Otrzymane megastartery zawierające w sobie gen bakteriofaga TP-84 oraz lepkie końce komplementarne do plazmidu pUC19, używałam do przeprowadzenia drugiej PCR. Temperaturę przyłączania megastarterów obliczałam za pomocą programu dostępnego na stronie internetowej <https://www.rf-cloning.org/>. Skład mieszaniny reakcyjnej w cienkościennych probówkach do PCR był następujący: dokładne ilości megastartera oraz wektora docelowego opisane w Tabeli 10, 25 µl Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher, USA), objętość uzupełniałam wodą wolną od nukleaz (Roth, Niemcy) do 50 µl. Warunki drugiej PCR przedstawione są w Tabeli 12.

Tabela 12. Profil czasowo-termiczny drugiej PCR przy klonowaniu metodą RF.

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	20 s	1x
Denaturacja	98°C	10 s	18x
Przyłączanie megastarterów	60°C	20 s	
Wydłużanie	72°C	3-5 min*	
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min	1x

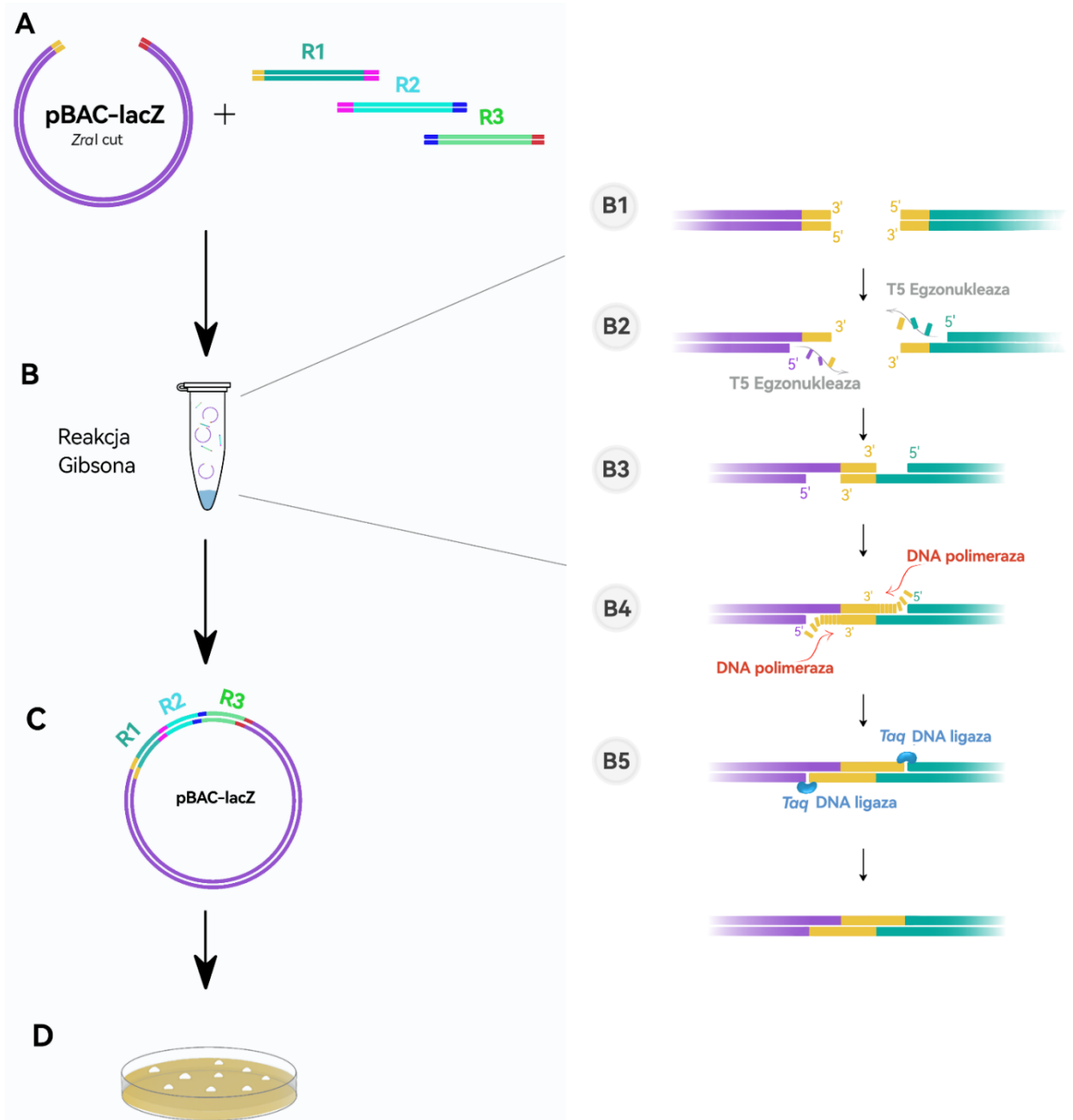
*- czas wydłużania w drugiej PCR różnił się dla poszczególnych megastarterów, dokładne wartości zostały umieszczone zbiorczo w Tabeli 10.

5.2.8.1.4. Trawienie restrykcyjne z użyciem enzymu *DpnI*

Po zakończeniu obydwu PCR i oczyszczeniu produktów [Metody 5.2.7.], do 20 μ l eluatu dodawałam 2 μ l buforu Tango [Materiały 5.1.7.] oraz 2 μ l enzymu *DpnI*. Mieszanina inkubowała się w 37°C przez 8 godzin, następnie enzym termicznie inaktywowałam poprzez umieszczenie próbek z reakcją w termobloku nagrzanym do 80°C na 20 minut.

5.2.8.2. Klonowanie metodą Gibsona

Klonowanie metodą Gibsona (ang. Gibson assembly) to wysoce efektywna metoda składania *in vitro* wielu fragmentów DNA oraz zlinearyzowanego plazmidu w jednej próbce podczas reakcji izotermalnej [12]. Metoda ta umożliwia bez-bliźnowe klonowanie dużych fragmentów DNA do dowolnego miejsca w wybranym plazmidzie. Podstawą działania reakcji Gibsona są krótkie (15-40 pz) komplementarne sekwencje pomiędzy końcami sąsiednich fragmentów DNA, które mają zostać połączone. Sekwencja komplementarna zostaje włączona do klonowanych fragmentów DNA poprzez odpowiednio zaprojektowane startery podczas PCR. Zsyntetyzowane fragmenty DNA z sekwencjami komplementarnymi oraz zlinearyzowany plazmid zostają połączone w wybranym stosunku molowym w próbce Eppendorfa (Rycina 3). W skład mieszaniny reakcyjnej podczas klonowania metodą Gibsona wchodzi trzy enzymy: 5'-3' T5 egzonukleaza, polimeraza DNA oraz ligaza DNA *Taq*.



Ryc. 3. Schemat klonowania metodą Gibsona. **A.** Poprzez PCR zostają wygenerowane fragmenty DNA zawierające 15-40 pz sekwencje komplementarne. Na rycinie przedstawione są schematycznie trzy przykładowe sekwencje, które mają zostać sklonowane do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym *ZraI*. **B1.** Dokładny przebieg reakcji Gibsona przedstawiony jest na przykładzie połączenia między wektorem plazmidowym pBAC-lacZ oraz fragmentem R1. Sekwencja komplementarna około 40 pz została oznaczona kolorem żółtym. **B2.** Końce 5' wektora oraz fragmentu DNA zostają strawione przez T5 egzonukleazę, tworząc „lepkie końce” 3'. **B3.** Końce 3' przylegają do siebie, a pomiędzy komplementarnymi parami zasad tworzą się wiązania wodorowe, które stabilizują połączenie „lepkich końców”. **B4.** Polimeraza DNA wypełnia luki, od końców 5' do 3'. **B5.** Ligaza DNA uszczelnia pozostałe przerwy. **C.** Powstała cząsteczka DNA składająca się z plazmidu oraz trzech insertów, zostaje użyta do transformacji komórek kompetentnych.

Egzonukleaza T5 usuwa nukleotydy z końców 5', tworząc od strony 3' tzw. „lepkie końce”, które łączą się ze sobą. Następnie polimeraza DNA uzupełnia powstałe przerwy w kierunku 5'-3', a *Taq* DNA ligaza łączy wolne końce DNA.

Klonowanie metodą Gibsona rozpoczęto od przygotowania 5 x stężonego buforu do reakcji izotermalnej (ang. ISO buffer) [13].

Skład buforu 5 x ISO na około 150 reakcji był następujący:

- 3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 300 µl 1 M MgCl₂
- 60 µl 100 mM dGTP
- 60 µl 100 mM dATP
- 60 µl 100 mM dTTP
- 60 µl 100 mM dCTP
- 300 µl 1 M DTT
- 1,5 g PEG 8000
- 300 µl 100 mM NAD
- ddH₂O do objętości 6 ml

Tak przygotowany bufor porcjowano po 350 µl do jałowych probówek Eppendorfa i przechowywano w -20°C. Służył on do przygotowania właściwej mieszaniny reakcyjnej do klonowania metodą Gibsona (ang. Gibson reaction mix, GRM).

Skład mieszaniny GRM na jedną reakcję:

- 40 µl buforu 5x ISO
- 0,08 µl 10 U/µl Egzonukleazy T5 (NEB, USA)
- 0,25 µl 2 U/µl Polimerazy Phusion DNA (NEB, USA)
- 2 µl 40 U/µl Ligazy *Taq* DNA (NEB, USA)
- ddH₂O do objętości 15 µl

Mieszaniny GRM przechowywano w temperaturze -20°C.

5.2.8.2.1. Trawienie restrykcyjne plazmidu pBAC-lacZ enzymem *ZraI*

Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymem restrykcyjnym *ZraI* przedstawiony jest w Tabeli 13.

Tabela 13. Mieszanina reakcyjna do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymem restrykcyjnym *ZraI*

Składnik	Ilość
Plazmid pBAC-lacZ	1000 ng
10 x CutSmart buffer	2 μ l
<i>ZraI</i> (10 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O (wolna od nukleaz)	Do 20 μ l

Trawienie plazmidu prowadziłam w bloku termicznym w 37°C przez 1-2 godziny. Następnie wykonywałam inaktywację termiczną reakcji poprzez umieszczenie próbki w 80°C na 20 minut. Po zakończeniu otrzymane produkty reakcji oczyszczałam [Metody 5.2.7] oraz analizowałam spektrofotometrycznie [Metody 5.2.4.].

5.2.8.2.2. Projektowanie starterów, amplifikacja insertów

Startery do klonowania metodą Gibsona zaprojektowano przy użyciu programu SnapGene. Podobnie jak w przypadku klonowania pojedynczych genów bakteriofaga TP-84 metodą RF, startery były hybrydowe. Posiadały one około 20 pz komplementarnych do powielanego fragmentu genomu oraz około 40 nukleotydowe fragmenty „nawisu”, które były komplementarne do plazmidu lub do sąsiadującego klonowanego fragmentu. Dodatkowo, startery „forward” do pierwszego klonowanego fragmentu genomu bakteriofaga TP-84 posiadały sekwencję rozpoznawaną przez enzymy *EheI*, *AarI* lub *BspOI*, umieszczoną pomiędzy fragmentami komplementarnymi. Lista starterów użytych do amplifikacji insertów zestawiona jest w Tabeli 3. W Tabeli 14 przedstawione są składy mieszanin reakcyjnych użytych do amplifikacji fragmentów genomu bakteriofaga TP-84.

Tabela 14. Składy mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 z użyciem trzech różnych polimeraz

Q5 High-Fidelity Polymerase (NEB, USA)		Phusion High-Fidelity Polymerase (NEB, USA)		Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher, USA)	
Składnik	Ilość	Składnik	Ilość	Składnik	Ilość
DNA bakteriofaga TP-84	300 ng	DNA bakteriofaga TP-84	300 ng	DNA bakteriofaga TP-84	300 ng
Starter Forward 10 μM	2,5 μ l	Starter Forward 10 μM	2,5 μ l	Starter Forward 10 μM	2,5 μ l
Starter Reverse 10 μM	2,5 μ l	Starter Reverse 10 μM	2,5 μ l	Starter Reverse 10 μM	2,5 μ l
dNTP 10 mM	1 μ l	dNTP 10 mM	1 μ l	2 x Phusion High-Fidelity Master Mix	25 μ l
5 x Q5 reaction buffer	10 μ l	5 x Phusion HF buffer	10 μ l		
Q5 High-Fidelity Polymerase	0,5 μ l	Phusion High-Fidelity Polymerase	1 μ l		
DMSO	-	DMSO	1,5 μ l		
ddH₂O	Do 50 μ l	ddH₂O	Do 50 μ l	ddH₂O	Do 50 μ l

Tak przygotowane mieszaniny służyły do wykonania PCR typu Touch Down, o profilu czasowo- termicznym przedstawionym w Tabeli 15.

Tabela 15. Profil czasowo-termiczny zastosowany do PCR typu Touch Down podczas klonowania metodą Gibsona

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	98°C	30 s	1x
Denaturacja	98°C	10 s	14/16x
Przyłączenie starterów	68-55°C/55°C	20 s	
Wydłużanie	72°C	3 min	
Końcowe wydłużanie	72°C	5 min	1x

Po skończonej reakcji uzyskane inserty oczyszczałam [Metody 5.2.7.], a następnie analizowałam spektrofotometrycznie [Metody 5.2.4.] oraz za pomocą elektroforezy agarozowej [Metody 5.2.5.].

5.2.8.2.3. Reakcja Gibsona

Po zlinearyzowaniu plazmidu pBAC-lacZ oraz amplifikacji fragmentów genomu bakteriofaga TP-84, przeprowadzałam reakcję Gibsona. Do tego celu rozmrażałam na lodzie potrzebną liczbę probówek z wcześniej przygotowaną mieszaniną reakcyjną GRM (jedna probówka o objętości 15 µl na jedną reakcję Gibsona). W osobnej probówce mieszałam plazmid oraz inserty tak, aby całkowita ilość DNA wynosiła około 100-200 ng, a objętość zmieszanych fragmentów nie przekraczała 5 µl. Ilości DNA poszczególnych fragmentów dodawanych do reakcji obliczałam na podstawie dwóch różnych wzorów [14]:

Wzór A

$$\text{Plazmid}_{\text{Ilość}} = \frac{\text{Plazmid}_{\text{Długość}}}{\text{Plazmid}_{\text{Długość}} + 3 * \text{Insert}_{\text{Długość}}} * \text{Ilość DNA} \quad (2)$$

$$\text{Wstawka}_{\text{Ilość}} = \frac{3 * \text{Wstawka}_{\text{Długość}}}{\text{Plazmid}_{\text{Długość}} + 3 * \text{Insert}_{\text{Długość}}} * \text{Ilość DNA} \quad (3)$$

Gdzie:

$\text{Plazmid}_{\text{Długość}}$ – Długość plazmidu używanego do klonowania metodą Gibsona (pz)

$\text{Insert}_{\text{Długość}}$ – Łączna długość wszystkich fragmentów („wstawek”) używanych w trakcie klonowania metodą Gibsona (pz)

$\text{Wstawka}_{\text{Długość}}$ – Długość pojedynczego, konkretnego fragmentu DNA używanego podczas klonowania metodą Gibsona (pz)

Ilość DNA – Całkowita ilość DNA używana podczas reakcji Gibsona (ng; zwykle 100-200 ng)

$\text{Wstawka}_{\text{Ilość}}$ – Ilość pojedynczego fragmentu DNA, jaką należało dodać do mieszaniny reakcyjnej (ng)

$\text{Plazmid}_{\text{Ilość}}$ – Ilość plazmidu, jaką należało dodać do mieszaniny reakcyjnej (ng)

Wzór B

$$v_n = \left(\frac{f_n \cdot l_n}{c_n} \right) \left(\frac{m_1}{l_1} \right), \quad \text{gdzie } m_1 = \min \left(\frac{l_1 \cdot v_{max}}{\sum_{i=1}^n \frac{f_n \cdot l_n}{c_n}}, \frac{\phi \cdot l_1 \cdot p_{max}}{\sum_{i=1}^n f_n}, m_{max} \right) \quad (4)$$

Gdzie:

n – numer fragmentu DNA używanego do reakcji Gibsona

v_n – objętość n -fragmentu DNA, jaką należy dodać do mieszaniny reakcyjnej (μl)

f_n – krotność stosunku molarnego n -fragmentu DNA

l_n – długość n -fragmentu DNA (pz)

c_n – stężenie n -fragmentu DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

m_1 – ilość plazmidu (ng)

l_1 – długość plazmidu (pz)

Φ – 0,66 $\text{ng}/\text{pmol}/\text{pz}$ (współczynnik konwersji)

v_{max} – maksymalna objętość wszystkich fragmentów DNA dodawanych do reakcji Gibsona (5 μl)

p_{max} – maksymalne stężenie molalne wszystkich fragmentów DNA dodawanych do reakcji Gibsona (optymalnie 0,5 pmol dla 2-3 fragmentów, 1 pmol dla 4+ fragmentów)

m_{max} – maksymalna ilość całkowita DNA używana podczas reakcji Gibsona (ng; 100-200 ng)

Po uprzednim zmieszaniu plazmidu, fragmentów DNA i ewentualnie wody, do probówki dodawałam 15 μl GRM. Przez 10-15 sekund probówkę trzymałam w lodzie a następnie od razu przenosiłam ją do termobloku rozgrzanego do 50°C. Po określonym czasie próbkę z GRM studziłam na lodzie i przeprowadzałam transformację komórek kompetentnych [Metody 5.2.6.2.]. Wydajność transformacji obliczałam za pomocą wzoru [15]:

$$\text{Wydajność transformacji (\%)} = \frac{\text{Liczba białych kolonii}}{\text{Liczba wszystkich koloni}} \times 100$$

(5)

5.2.8.2.4. Reakcja Gibsona stosowana do uzyskania modyfikowanego materiału genetycznego bakteriofaga TP-84

Aby uzyskać rekombinowane cząsteczki DNA bakteriofaga TP-84, którymi następnie transfekowałam protoplasty gospodarza, wykonywałam reakcję Gibsona bez użycia plazmidu. Startery były zaprojektowane w sposób opisany powyżej [Metody 5.2.8.2.2.], ale końce pierwszego i ostatniego powielanego insertu były do siebie komplementarne, aby podczas reakcji Gibsona genom bakteriofaga stworzył kolistą cząsteczkę. Poszczególne inserty powielone były podczas PCR typu Touch-Down, profil termiczno-czasowy reakcji przedstawiony jest w Tabeli 15. W celu przeprowadzenia reakcji Gibsona, rozmrażałam na lodzie mieszaninę reakcyjną 2x NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix [NEB, USA] oraz powielone inserty. Objętość reakcji dostosowywałam do objętości fragmentów DNA tak, aby połowę objętości stanowiła mieszanina reakcyjna. Stosując zalecenia producenta mieszaniny reakcyjnej wszystkie fragmenty DNA łączyłam w stosunku równomolarnym tak, aby stężenie każdego fragmentu wynosiło 0,05 pmol oraz aby całkowite stężenie wszystkich fragmentów nie przekraczało 0,8 pmol. W przypadku używania do reakcji Gibsona modyfikowanych fragmentów, z dołączonymi znacznikami molekularnymi, dodawałam je od dwóch do ośmiu razy więcej, czyli w stężeniu 0,1-0,4 pmol. Stężenia dodawanych fragmentów obliczałam za pomocą wzoru:

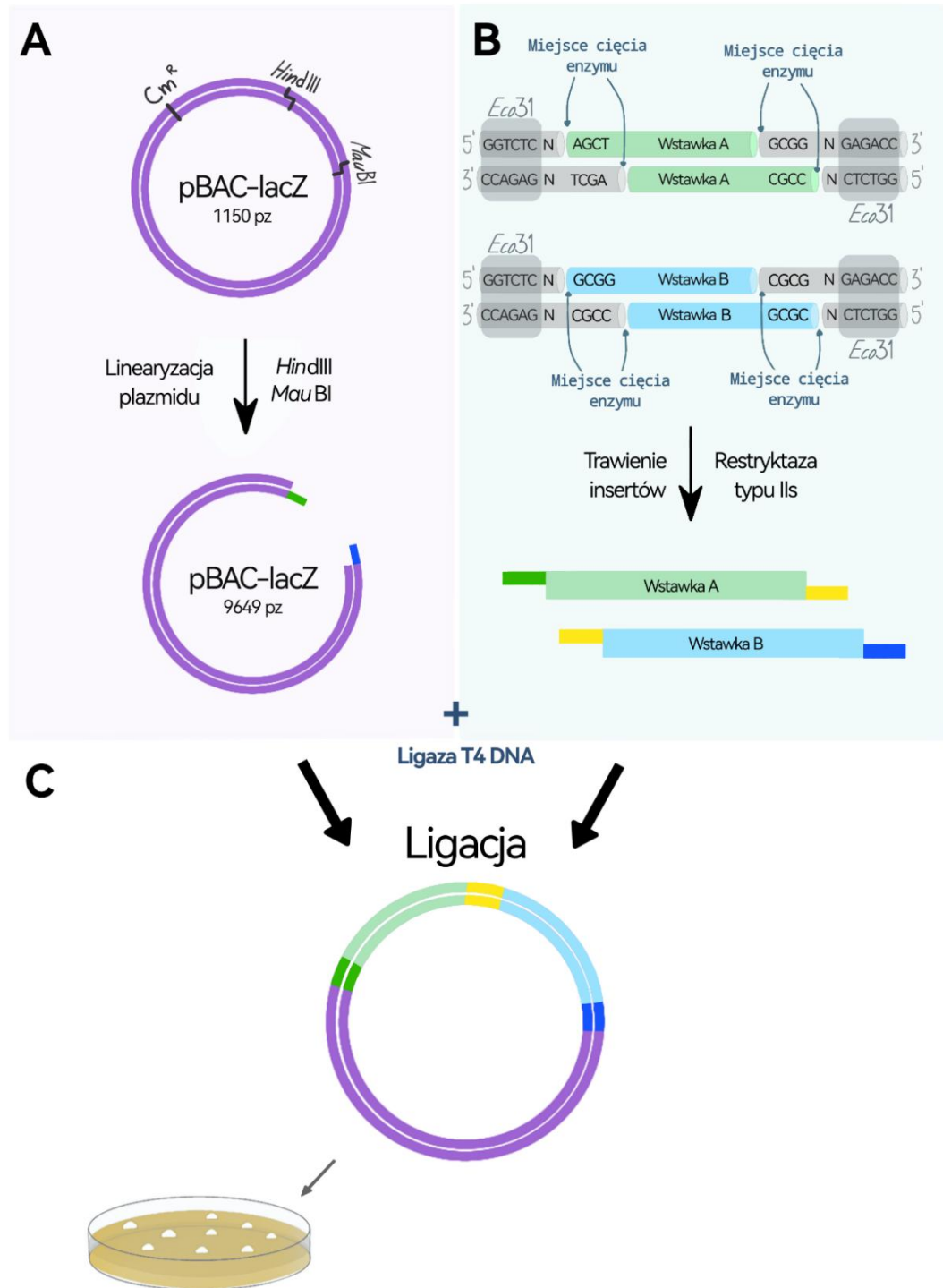
$$\text{pmol DNA} = \frac{\text{ng DNA} \times 1000}{\text{liczba nukleotydów} \times 650 \text{ Da}}$$

(6)

Po zmieszaniu wszystkich fragmentów DNA oraz ewentualnie wody, dodawałam mieszaninę reakcyjną w odpowiedniej objętości, próbki po wymieszaniu trzymałam na lodzie przez 10-15 sekund, po czym umieszczałam je w termobloku nagrzanym do 50°C na godzinę. Po skończonej reakcji próbki schładzałam na lodzie i używałam bezpośrednio do transfekcji protoplastów [Metody 5.2.2.2.] lub przechowywałam w temperaturze -20°C.

5.2.8.3. Klonowanie Golden Gate

Metoda klonowania Golden Gate, podobnie jak klonowanie metodą Gibsona, opiera się na generowaniu komplementarnych, jednoniciowych „lepkich końców” 3' oraz ligacji ich, natomiast końce te są tworzone przy użyciu restryktazy klasy IIs [16]. Enzymy restrykcyjne typu IIs tną materiał genetyczny poza rozpoznawaną sekwencją, tworząc 4-nukleotydowe „nawisy” (Rycina 4). Ponieważ otrzymywane „nawisy” nie stanowią sekwencji rozpoznawanej przez restryktazę IIs, mogą być one dowolnie zaprojektowane tak, aby umożliwiły bezpośrednie złożenie klonowanych fragmentów DNA w obrębie komplementarnych sekwencji. Dodatkowo, rozpoznawana sekwencja zostaje usunięta podczas działania restryktazy IIs, dlatego metoda Golden Gate umożliwia bez-bliznowe i precyzyjne składanie wielu fragmentów DNA w dowolnym ułożeniu. Standardowo klonowanie metodą Golden Gate odbywa się w jednym etapie, podczas którego wszystkie powielone fragmenty DNA oraz plazmid trawione są restryktazą IIS a następnie ligowane za pomocą ligazy T4. W tej pracy zastosowano jednak inną strategię – trawienie restrykcyjne i ligację prowadzono osobno. Dodatkowo, plazmid pBAC-lacZ linearyzowano dwoma różnymi enzymami restrykcyjnymi klasy II, a wstawki trawiono enzymem *Eco31I* (będącym izoschizomerem enzymu *BsaI*) [Materiały 5.1.5.1.]. Ostatnim etapem klonowania metodą Golden Gate była ligacja wszystkich fragmentów za pomocą ligazy T4.



Ryc. 4. Schemat klonowania metodą Golden Gate. **A.** Plazmid pBAC-lacZ był linearyzowany przy użyciu dwóch różnych enzymów restrykcyjnych klasy II, HindIII oraz MauBI. **B.** Wstawki do klonowania metodą Golden Gate, za pomocą PCR i odpowiednio zaprojektowanych starterów, przygotowane były tak, aby z obu stron posiadać sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny typu IIS Eco31I, oraz komplementarne do siebie 4-nukleotydowe „lepkie końce” 3'. **C.** Aby zligować klonowany konstrukt, dodawano w odpowiednich proporcjach zlinearyzowany plazmid, wstawki z komplementarnymi „nawisami” oraz ligazę T4 DNA. Po zakończonym klonowaniu otrzymane cząsteczki DNA używano do transformacji, aby móc następnie wykonać selekcję klonów.

5.2.8.3.1. Trawienie restrykcyjne plazmidu pBAC-lacZ enzymami *HindIII* i *MauBI*

Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymami restrykcyjnymi *HindIII* i *MauBI* jest przedstawiony w Tabeli 16.

Tabela 16. Mieszanina reakcyjna do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymami restrykcyjnymi *HindIII* oraz *MauBI*

Składnik	Ilość
Plazmid pBAC-lacZ	2000 ng
Bufor Green FD	5 μ l
<i>HindIII</i>	2 μ l
<i>MauBI</i>	2 μ l
H ₂ O (wolna od nukleaz)	Do 50 μ l

Probówkę z reakcją enzymatyczną umieszczałam w termobloku nagrzanym do 37°C na 30-60 minut, a następnie inaktywowałam reakcję poprzez umieszczenie probówki w termobloku nagrzanym do 65°C na 20 minut. Od razu po inaktywacji całość objętości reakcji wykorzystywałam do przeprowadzenia elektroforezy agarozowej. Po zakończeniu, prążek odpowiadający wielkością zlinearyzowanemu plazmidowi wycinałam z żelu, oczyszczałam [Metody 5.2.7.] oraz analizowałam spektrofotometrycznie jakość i ilość otrzymanego DNA [Metody 5.2.4.].

5.2.8.3.2. Amplifikacja insertów

Lista starterów użytych do amplifikacji insertów w klonowaniu metodą Golden Gate znajduje się w Tabeli 3. Skład reakcji był następujący: ok. 250 ng DNA bakteriofaga TP-84, 2,5 μ l startera „forward” (10 μ M), 2,5 μ l startera „reverse” (10 μ M), 25 μ l Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher, USA), woda wolna od nukleaz (Roth, Niemcy) do objętości 50 μ l. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną wykorzystywałam do przeprowadzenia PCR typu Touch-Down o profilu termicznym takim, jak w przypadku klonowania metodą Gibsona (Tabela 15). Po skończonej reakcji uzyskane inserty oczyszczałam

[Metody 5.2.7.], a następnie analizowałam spektrofotometrycznie [Metody 5.2.4.], oraz za pomocą elektroforezy agarozowej [Metody 5.2.5.].

5.2.8.3.3. Ligacja fragmentów

Do próbek z oczyszczonym produktem PCR dodawałam po 5 μl buforu FD oraz po 2 μl enzymu *Eco31I* (10 U/ μl). Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczałam w termobloku nagrzanym do 37°C na 30 minut, a następnie enzym inaktywowałam poprzez umieszczenie próbki z reakcją w 65°C na 20 minut. Fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 po trawieniu oraz zlinearyzowany plazmid pBAC-lacZ łączyłam w jałowej próbce i dodawałam ligazę T4 DNA (NEB). Stężenia dodawanych fragmentów DNA obliczałam za pomocą wzoru numer 6 [Metody 5.2.8.2.4.].

Tabela 17 przedstawia skład mieszaniny ligacyjnej. Reakcję ligacji początkowo prowadziłam w 16°C przez 30 minut, a następnie inaktywowałam enzym termicznie w 65°C przez 10 minut.

Tabela 17. Mieszanina reakcyjna do ligacji plazmidu pBAC-lacZ z fragmentami genomu bakteriofaga TP-84

Składnik	Ilość
Fragmenty DNA (plazmid+R1-R8)	Maksymalnie 17 μl
10 x T4 DNA ligase buffer	2 μl
T4 DNA ligase	1 μl
H ₂ O (wolna od nukleaz)	Do 20 μl

Po zakończonym klonowaniu typu Golden Gate, połowę objętości (10 μl) mieszaniny po klonowaniu dodawałam do 100 μl komórek kompetentnych TransforMax EPI300 (Lucigen, USA) i przeprowadzałam transformację [Metody 5.2.6.2.]. Wydajność transformacji obliczałam na podstawie wzoru (5) [Metody 5.2.8.2.3.].

5.2.9. Analiza transformantów

5.2.9.1. Kolonijna reakcja łańcuchowa polimerazy

Weryfikację transformantów, w celu wykrycia obecności wstawki w wektorze, przeprowadzałam przede wszystkim przy użyciu techniki kolonijnej PCR (ang. colony PCR), w której matrycę stanowi kolonia bakteryjna pobierana bezpośrednio z płytki, na której wysiewane były komórki bakteryjne po transformacji [17]. Metoda ta skraca czas testowania otrzymanych kolonii po transformacji, ponieważ nie wymaga trawienia enzymami restrykcyjnymi ani izolowania plazmidów z komórek bakteryjnych. Aby wykorzystać metodą kolonijnej PCR zaprojektowano startery w taki sposób, aby móc analizować transformanty na trzech różnych płaszczyznach (Tabela 3). Pierwszą strategią było zastosowanie pary starterów specyficznych do wstawki, które powielały krótki fragment DNA tylko jeśli badany był klon pozytywny, czyli plazmid ze wstawką. Drugą możliwością było zastosowanie pary starterów specyficznych do plazmidu, których sekwencje komplementarne były obecne obok docelowego miejsca insercji. W tym przypadku, różnica między klonem pozytywnym a negatywnym leży w wielkości powielonego produktu DNA. Jeżeli w badanym plazmidzie obecna była wstawka, to powielony fragment DNA będzie znacznie większy niż w przypadku pustego plazmidu. Trzecią możliwością sprawdzenia transformantów było dobranie pary starterów tak, aby produkt PCR powstał tylko wtedy, jeśli badany klon posiada wstawkę w prawidłowej orientacji. Schemat trzech różnych konfiguracji starterów używanych do kolonijnej PCR w tej pracy przedstawiony jest na Rycinie 5.



Ryc. 5. Możliwe konfiguracje starterów stosowanych podczas kolonijnej PCR w celu analizy transformantów. **A.** Podczas klonowania z pojedynczą wstawką, oba stosowane startery były komplementarne do tej specyficznej wstawki. Jeżeli testowany był klon pozytywny, produktem reakcji był krótki odcinek DNA widoczny podczas elektroforezy agarozowej. Plazmidy z wieloma wstawkami, sprawdzano, używając pary starterów komplementarnych do obu sąsiadujących fragmentów. Żadne produkty reakcji nie powstawały, jeżeli testowany klon był negatywny. **B.** Startery specyficzne do wektora zaprojektowane były tak, aby przyłączały się do sekwencji otaczających z obu stron miejsce insercji wstawki. W tym przypadku zarówno klony negatywne jak i pozytywne posiadają sekwencje komplementarne do użytej pary starterów, ale produkty PCR będą się od siebie różnić rozmiarem. **C.** W przypadku użycia jednego startera specyficznego do wstawki i drugiego startera specyficznego do plazmidu, możliwa była ocena, czy testowana wstawka jest w prawidłowej orientacji w plazmidzie.

Mieszaninę reakcyjną do kolonijnej PCR przygotowywałam w cienkościennych probówkach do PCR; skład tej mieszaniny był następujący: 10 µl SapphireAmp fast PCR—hot-start master mix (Takara Bio, Japonia), para starterów „forward” i „reverse” (0,4 µl każdy), objętość uzupełniłam wodą wolną od nukleaz (Roth, Niemcy) do 20 µl. Następnie do probówki dodawałam materiał DNA testowanej kolonii poprzez zamoczenie w niej końcówki do pipet, którą uprzednio dotknęłam wybraną kolonię bakteryjną. Warunki kolonijnej PCR przedstawione są w Tabeli 18.

Tabela 18. Profil czasowo-termiczny zastosowany do kolonijnej PCR

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	3 min	1x
Denaturacja	95°C	10 s	14/21x
Przyłączenie starterów	68-55°C/55°C	20 s	
Wydłużanie	72°C	20 s	
Końcowe wydłużanie	72°C	5 min	1x

Po zakończeniu całą objętość reakcji wykorzystywałam do przeprowadzenia analizy elektroforetycznej [Metody 5.2.5.].

5.2.9.2. Analiza restrykcyjna plazmidów pBAC-lacZ po klonowaniu

Analizę restrykcyjną stosowałam podczas klonowania z użyciem plazmidu pBAC-lacZ, czyli podczas klonowania metodą Gibsona [Metody 5.2.8.2.] oraz Golden Gate [Metody 5.2.8.3.]. Po wyizolowaniu plazmidów z transformowanych komórek [Metody 5.2.3.3.] wykonywałam hydrolizę enzymatyczną używając enzymu restrykcyjnego *BglI*, sporządzając mieszaninę reakcyjną jak w Tabeli 19.

Tabela 19. Mieszanka reakcyjna do przeprowadzania analizy restrykcyjnej plazmidu pBAC-lacZ po transformacji

Składnik	Ilość
pBAC-lacZ (wyizolowany po transformacji)	Maksymalnie 10 μ l (500-1000 ng)
10 x FastDigest Green buffer	2 μ l
FastDigest <i>Bg</i> II	1 μ l
H ₂ O (wolna od nukleaz)	Do 20 μ l

Probówki umieszczałam w termobloku nagrzanym do 37°C na 5 do 10 minut, a następnie przenosiłam je do termobloku nagrzanego do 65°C na 5 minut. Po zakończeniu wykonywałam analizę elektroforetyczną [Metody 5.2.5.].

5.2.10. Przygotowanie preparatów DNA do sekwencjonowania oraz analiza wyników

Zarówno w zakresie przygotowywania biblioteki genów bakteriofaga TP-84 do plazmidu pUC19, jak też klonowania genomu TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona lub Golden Gate, poprawność otrzymanych konstruktów potwierdzana była sekwencjonowaniem metodą Sanger'a za pośrednictwem firmy Macrogen. Po wyizolowaniu plazmidów stanowiących potencjalnie pozytywne klony, upewniałam się, że stężenie otrzymanego preparatu z DNA jest o stężeniu 100 ng/ μ l lub wyższym. Jeżeli stężenie było niższe, umieszczałam probówki w koncentratorze próżniowym aż do osiągnięcia pożądanego stężenia w minimalnej objętości 5 μ l. Następnie przygotowywałam próby do sekwencjonowania poprzez dodawanie do jałowej probówki Eppendorfa 5 μ l roztworu DNA oraz 5 μ l wybranego startera (o stężeniu 10 pmol/ μ l). Startery dodawane do sekwencjonowania były używane także do kolonijnej PCR, dlatego były specyficzne albo do sprawdzanego genu bakteriofaga TP-84 albo do sprawdzanego plazmidu w pobliżu miejsca insercji fragmentów. Otrzymane wyniki sekwencjonowania analizowałam z wykorzystaniem algorytmu BLASTn (ang. basic local alignment search tool) [18], stosując jako sekwencję referencyjną (ang. query) sekwencję nukleotydową pustego plazmidu (pUC19 lub pBAC-lacZ), natomiast jako sekwencję sprawdzaną (ang. subject sequence) używałam sekwencje otrzymane po

sekwencjonowaniu. Dodatkowo, za pomocą programu SnapGene analizowałam chromatogram i porównywałam otrzymane sekwencje z sekwencjami prawidłowych klonów *in silico*.

5.2.11. Immunodetekcja znakowanych białek kapsydowych modyfikowanych bakteriofagów TP-84

Aby potwierdzić obecność białek kapsydowych bakteriofaga TP-84 z dołączoną metką FLAG obecną na zewnątrz kapsydu, w pierwszej kolejności namnażałam łysinki otrzymane po transfekcji protoplastów *G. stearothermophilus* 10 rekombinowanym materiałem bakteriofaga TP-84 [Metody 5.2.8.2.4.]. Proces ten rozpoczynałam od pobrania jałową końcówką do pipet pojedynczej łysinki, a następnie zawieszałam ją w 100 µl buforu TM [Materiały 5.1.7.]. Następnie zawieszoną w buforze łysinką ponownie infekowałam odmłodzoną hodowlę gospodarza *G. stearothermophilus* 10 i zawieszałam w agarze górnym, który następnie wylewałam na podłoże stałe [Metody 5.2.1.4.]. W taki sam sposób przygotowywałam płytki bakteriofaga TP-84 dzikiego, stanowiące kontrolę negatywną eksperymentu. Do płytek zawierających powielone bakteriofagi przykładalam membrany nitrocelulozowe na 30 minut, a następnie przekładałam je na puste, jałowe płytki Petriego, do całkowitego wyschnięcia. Równolegle przygotowywałam kontrolę pozytywną eksperymentu, nakrapiając na czystą membranę nitrocelulozową umieszczoną w płytce Petriego 5 µl roztworu przeciwciał anti-FLAG (skład roztworu: 1 x bufor TBS, 1% mleko odtłuszczone, przeciwciała anti-FLAG [Materiały 5.1.5.2.] w rozcieńczeniu 1:5000), pozostawiając do całkowitego wyschnięcia. Wyschnięte membrany zalewałam roztworem blokującym (skład roztworu: 1 x bufor TBS, 5% mleko odtłuszczone), ustawiałam na kołysce laboratoryjnej, gdzie membrany delikatnie wytrząsały się przez dwie godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór mleka wylewałam z płytek Petriego, przytrzymując membrany pęsetą. Następnie membrany zalewałam roztworem przeciwciał anti-FLAG, płytki z membranami umieszczałam w temperaturze 4°C, gdzie inkubowały się z delikatnym wytrząsaniem na kołysce laboratoryjnej przez noc. Po zakończonej inkubacji, roztwór przeciwciał anti-FLAG wylewałam i przepłukiwałam membrany czterokrotnie buforem 1 x TBS. Podczas pierwszego płukania, membrany zalewałam buforem intensywnie je mieszając, po czym wylewałam bufor. Trzy kolejne płukania polegały na wytrząsaniu membran zalanych buforem 1 x TBS na kołysce

laboratoryjnej przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonym płukaniu membrany zalewałam roztworem przeciwciał II-rzędowych (skład roztworu: 1 x bufor TBS, 1% mleko odtłuszczone, przeciwciała II-rzędowe anty-królicze [Materiały 5.1.5.2.] w rozcieńczeniu 1:5000) i ustawiałam je na kołysce laboratoryjnej, gdzie membrany wytrząsały się delikatnie przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie ponownie płukałam membrany buforem 1 x TBS, w sposób opisany powyżej. Wypłukane membrany kładłam na folii i zalewałam po powierzchni substratem do chemiluminescencji SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher, USA) [Materiały 5.1.5.2.], przygotowanym według instrukcji producenta. Membrany inkubowałam w ciemnym miejscu przez 5 minut, a następnie przykrywałam je folią od góry i odciskałam nadmiar substratu spomiędzy folii. Folię z membranami umieszczałam w kasecie do kliszy, po czym w ciemni przykładalam do membran kliszę, zamykałam kasetę i naświetlałam 8 minut. Po zakończeniu naświetlania kliszę wyciągałam z kasety i zanurzałam w wywoływaczu, aż sygnał był dobrze widoczny. Następnie kliszę zanurzałam w kwasie octowym, utrwalaczu i w wodzie. Wywoływaną kliszę suszyłam i fotografowałam.

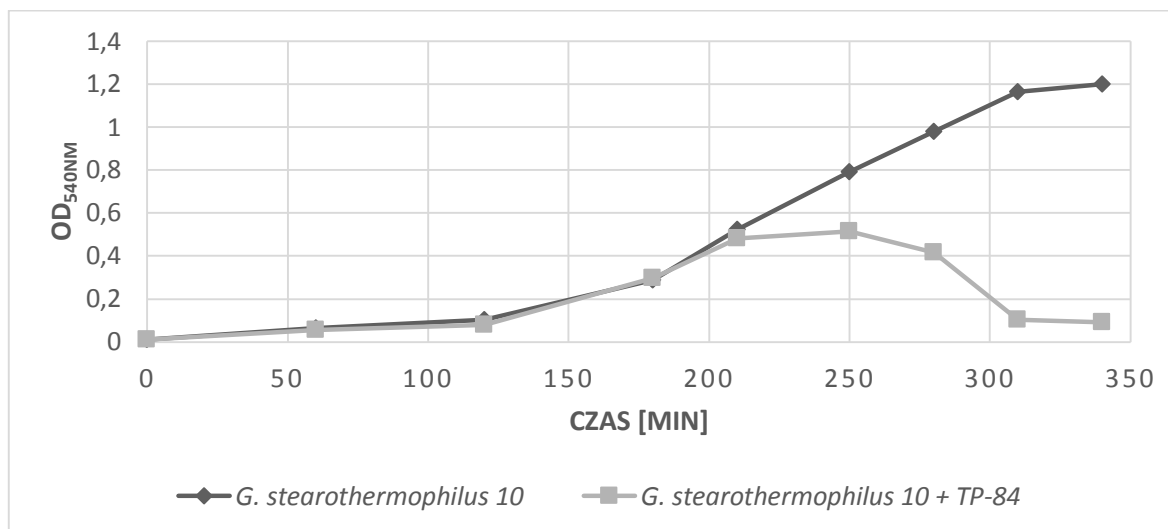
6. Wyniki i Dyskusja

Technologia prezentacji białek/peptydów na powierzchni bakteriofaga (lub w skrócie faga) została po raz pierwszy opisana przez amerykańskiego biologa George'a P. Smith'a w 1985 roku [19]. Przez pierwsze lata rozwoju nowej technologii udoskonalano prezentację peptydów [20], [21] i fragmentów przeciwciał [22], [23]. Opracowana metoda zrewolucjonizowała współczesną medycynę, otwierając drogę do tworzenia nowych farmaceutyków, szczepionek i wielu innych produktów. Z uwagi na ogrom potencjału tej technologii, panowie George P. Smith oraz Gregory P. Winter otrzymali w 2018 roku Nagrodę Nobla z dziedziny chemii za „prezentację peptydów oraz przeciwciał na powierzchni faga” [24]. Systemy prezentacji peptydów opierające się na fagach filamentujących, w tym przede wszystkim na fagu M13, oraz odmiany tych systemów, opisałam szczegółowo w rozdziale „Wstęp”. Skonstruowano również systemy prezentacji peptydów/białek/innych cząsteczek opierające się na bakteriofagach „ogonkowych”, w tym na bakteriofagu T7 [25], T4 [26] oraz λ [27], a także dwa systemy oparte na małych, ikozaedralnych fagach Q β [28] oraz MS2 [29].

Zauważyć można, że wszystkie dotychczas skonstruowane systemy prezentacji białek/peptydów na powierzchni fagów, opierają się na bakteriofagach infekujących bakterie mezofilne i posiadają one pewne ograniczenia. Zaliczyć do nich można problemy z prezentacją hydrofobowych peptydów lub formowanie się ciałek inkluzyjnych rekombinowanych białek. Termofilny system prezentacji białek/peptydów mógłby rozwiązać takie problemy. Dodatkowo, umożliwiłby on prezentację termostabilnych peptydów/białek, a także charakteryzowałby się niższym ryzykiem kontaminacji w przypadku dużych hodowli. Kandydatem do utworzenia nowej, termofilnej platformy do prezentacji białek/peptydów, został bakteriofag TP-84 infekujący bakterię Gram-pozytywną *Geobacillus stearothermophilus*. Bakteriofag ten został wyizolowany z gleby szklarniowej w 1952 roku [30]. Należy on do rodziny *Siphoviridae* (należącej do rzędu *Caudovirales* czyli fagów „ogonkowych”) i rodzaju *Tp84virus* [4].

6.1. Hodowla bakteriofaga TP-84

Pierwszym krokiem w kierunku utworzenia nowego systemu prezentowania białek na powierzchni bakteriofaga termofilnego TP-84, była hodowla gospodarza, czyli bakterii *G. stearotherophilus* 10, a następnie infekcja fagiem TP-84 (Rycina 6).



Ryc. 6. Krzywa wzrostu gospodarza *G. stearotherophilus* 10 po infekcji bakteriofagiem TP-84. Kolorem ciemno-szarym zaznaczona jest kontrolna hodowla *G. stearotherophilus* 10 bez dodatku lizatu bakteriofagowego. Kolorem jasno-szarym zaznaczona jest krzywa wzrostu *G. stearotherophilus* 10 po infekcji bakteriofagiem TP-84. W czasie T_{180} , kiedy obie hodowle osiągnęły $OD_{540} \approx 0,3$, dodawałam do nich D-fruktozę do stężenia 0,5% aby zwiększyć żywotność bakterii i ułatwić adsorpcję bakteriofaga do powierzchni komórek gospodarza w trakcie infekcji. Po upływie 30 minut, w czasie T_{210} do hodowli zaznaczonej jasno-szarym kolorem dodałam lizat bakteriofaga TP-84 do wartości M.O.I. = 0,2, a następnie mierzyłam gęstość optyczną obu hodowli do momentu, aż wartość OD_{540} hodowli zainfekowanej spadła poniżej $OD_{540}=0,1$, czyli w przypadku tej hodowli w czasie T_{340} .

Widoczny na Rycinie 6 spadek gęstości optycznej hodowli bakteryjnej wskazywał, że w próbce użytej do infekcji obecny był aktywny bakteriofag TP-84, który po dodaniu do hodowli gospodarza namnażał się i lizował większość obecnych w hodowli komórek. Miano uzyskiwane podczas miareczkowania lizatów fagowych wahało się w granicach $2,4 \times 10^9$ – $1,6 \times 10^{11}$ PFU/ml dla lizatów niezagęszczonych, oraz $1,4 \times 10^{11}$ – $1,1 \times 10^{13}$ PFU/ml dla lizatów zagęszczonych. Przykładowe płytki z agarem dwuwarstwowym po miareczkowaniu przedstawione są na Rycinie 7.



Ryc. 7. Przykładowe płytki z widocznymi lysinkami bakteriofaga TP-84. Płytki były przygotowane do miareczkowania lizatu bakteriofaga TP-84, rozcieńczenia od lewej: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

Następnym etapem moich badań była izolacja wirusowego DNA z oczyszczonych i zagęszczonych lizatów [Metody 5.2.3.1.]. Przykładowe wartości stężenia i współczynników czystości wyizolowanego materiału genetycznego bakteriofaga TP-84, mierzone za pomocą spektrofotometru Nanodrop [Metody 5.2.4.], były następujące:

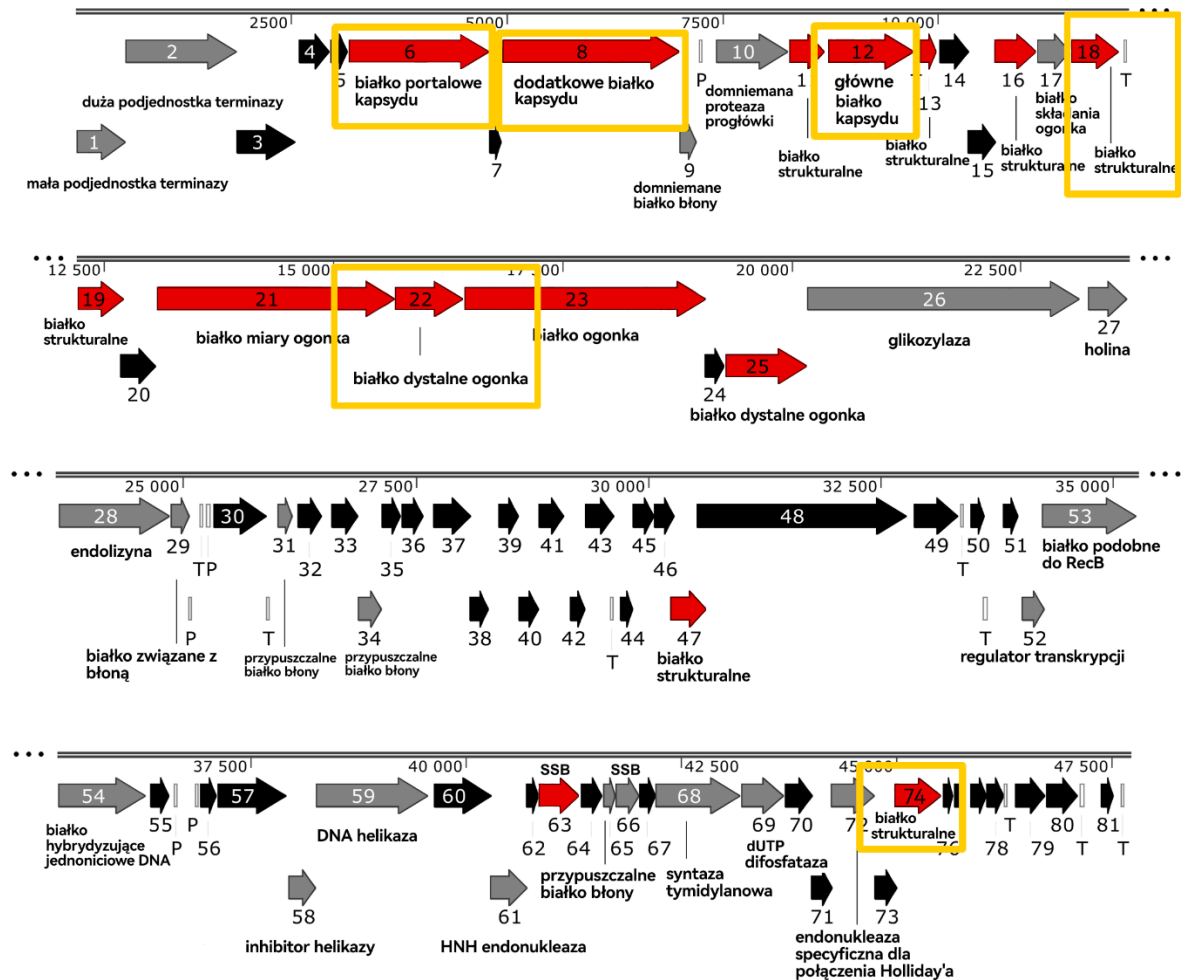
DNA TP-84 = 862,2 ng/μl, $A_{260/280} = 1,85$, $A_{260/230} = 2,01$.

Powyższe parametry wskazywały na wysokie stężenie oraz czystość preparatów DNA bakteriofaga TP-84.

6.2. Przygotowanie biblioteki genów bakteriofaga TP-84

Jak przedstawiłam we Wstępie, wszystkie dotychczas skonstruowane systemy prezentacji białek/peptydów na powierzchni fagów polegają na fuzji sekwencji docelowych (obcych) polipeptydów z końcem C-lub N-terminalnym białka strukturalnego bakteriofaga. Najczęściej są to białka kapsydowe, natomiast w systemie opartym na fagu λ skutecznie prezentowano polipeptydy poprzez fuzję z C-terminalnym końcem białka ogonka gpV, ale z niższą wydajnością w porównaniu do prezentacji z zastosowaniem dużego białka kapsydowego gpD [27], [31]. Dlatego też taką strategię obrano podczas wybierania genów-kandydatów do nowego systemu termofilnego prezentacji białek/peptydów na powierzchni

TP-84. Zdecydowano się wybrać potwierdzone analizą proteomiczną białka kodowane przez geny strukturalne bakteriofaga TP-84, zaznaczone na Rycinie 8 żółtymi ramkami.



Ryc. 8. Organizacja genomu bakteriofaga TP-84. Kolorem żółtym zaznaczone są geny kodujące białka strukturalne, których używano do stworzenia bibliotek genowych w niniejszej pracy. Geny z przypisaną funkcją ich produktów potwierdzoną za pomocą analizy proteomicznej zaznaczone są kolorem czerwonym. Geny z przypisaną przypuszczalną funkcją biologiczną zaznaczone są kolorem szarym. Geny bez przypisanej funkcji biologicznej zaznaczone są kolorem czarnym. P – przypuszczalny promotor zależny od gospodarza; T – terminator Rho-zależny; SSB – białko wiążące jednoniciowe DNA. Adaptacja ryciny pochodzącej z publikacji [4].

Do sporządzenia biblioteki wybrano sześć genów bakteriofaga TP-84 (Rycina 8, Tabela 20). Były to przede wszystkim geny kodujące białka kapsydowe (TP-84_06, TP-84_08, TP-84_12), ale też gen kodujący białko dystalne ogonka (TP-84_22) oraz dwa geny kodujące inne białka strukturalne (TP-84_18, TP-84_74).

Tabela 20. Geny bakteriofaga TP-84 sklonowane do plazmidu pUC19 [4]

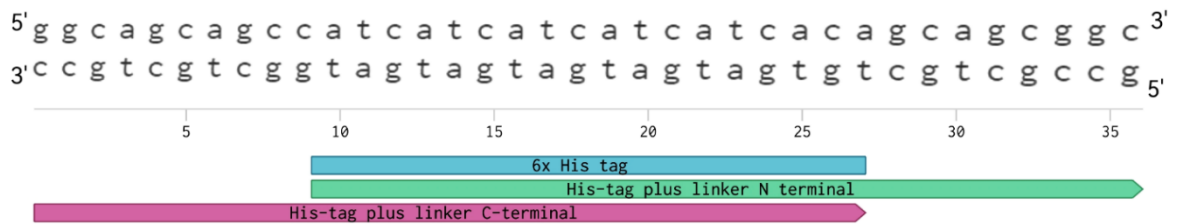
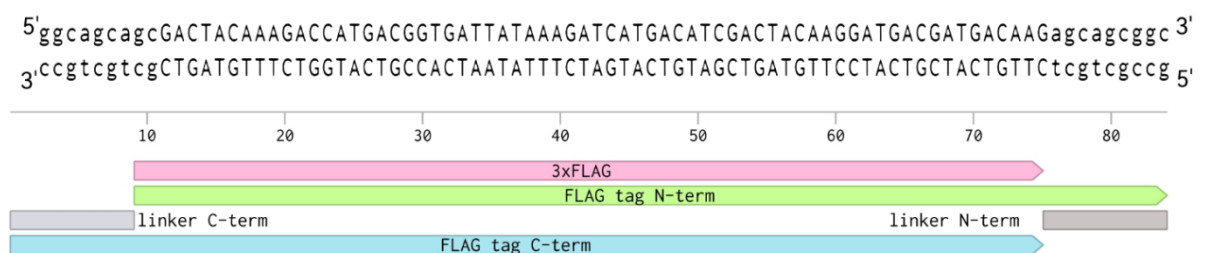
Symbol genu	Funkcja	Długość kodowanego polipeptydu (aa, aminokwasy; ang. amino acids)	Lokalizacja genu w genomie (pary zasad, pz)
TP84_06	Białko portalowe kapsydu (ang. portal capsid protein)	542	3174-4802
TP84_08	Dodatkowe białko kapsydu (ang. minor capsid protein)	681	4962-7007
TP84_12	Główne białko kapsydu (ang. major capsid protein)	330	8736-9728
TP84_18	Białko strukturalne, nieznana funkcja (ang. structural protein)	185	11554-12111
TP84_22	Białko dystalne ogonka (ang. distal tail protein)	245	15684-16421
TP84_74	Białko strukturalne, nieznana funkcja (ang. structural protein)	181	44984-45529

Zaplanowano skonstruowanie trzech wersji bibliotek genów:

1. Bibliotekę natywną, zawierającą sześć plazmidów rekombinowanych pUC19 z wklonowanymi wybranymi (Tabela 20) genami bakteriofaga TP-84;
2. Bibliotekę zawierającą dwanaście plazmidów rekombinowanych pUC19 z wklonowanymi wybranymi (Tabela 20) genami bakteriofaga TP-84 z dodatkiem sekwencji kodującej metkę histydynową (His6-tag; sześć reszt histydyny) z dołączonym 9 nukleotym linkerem, na końcu 5' i 3' klonowanego genu;
3. Bibliotekę zawierającą dwanaście plazmidów rekombinowanych pUC19 z wklonowanymi wybranymi (Tabela 20) genami bakteriofaga TP-84 z dodatkiem sekwencji kodującej metkę FLAG (FLAG-tag), czyli kodującej peptyd rozpoznawany

przez przeciwciała anty-FLAG, w trzech powtórzeniach z dodanym linkerem o długości 9 pz; ten znacznik również planowano umieścić na końcu 5' i 3' klonowanego genu;

Znaczniki peptydowe stanowią ważny element w funkcjonalnym systemie prezentacji białek/peptydów lub innych cząsteczek na powierzchni faga. Fuzje znaczników molekularnych do białek kapsydowych, innych niż używane do prezentacji (na przykład w systemie fagemidowym), mogą służyć zarówno do immobilizacji i separacji, jak również do oczyszczania i detekcji znakowanych bakteriofagów [32]. Znaczniki takie używa się również, aby określić położenie przestrzenne białka kapsydowego w docelowym systemie prezentacji białek. Gao ze współpracownikami (1999) wykorzystali taką strategię do określenia orientacji białek pVII i pIX faga filamentującego [33]. Wykonali oni fuzje znacznika FLAG z C- oraz N-końcami obu białek, a konstrukty odpowiednich genów wstawili do wektora fagemidowego pCGMT [33]. Następnie za pomocą testu ELISA przetestowali możliwość związania się fagów do przeciwciał monoklonalnych anty-Flag M2, które rozpoznają metkę FLAG [33]. Test ten wykazał, że detekcji podlegały tylko konstrukty zawierające metkę FLAG dołączoną do N-końca zarówno białka pVII oraz pIX, co wykazało, że tylko koniec N badanych białek kapsydowych jest ekspozycyjny na zewnątrz kapsydu, a co za tym idzie, fuzje z docelowymi białkami/peptydami powinny być wykonywane tylko na N-końcu tych białek kapsydu [33]. Metka histydynowa znajduje zastosowanie zwłaszcza podczas konstrukcji bibliotek polipeptydów lub fragmentów przeciwciał, z uwagi na jej użyteczność podczas selekcji fagów z bibliotek w procesie przeszukiwania, czyli biopanningu [34]. Linker 9-nukleotydowy (kodujący aminokwasy Ser-Ser-Gly) umieszczany na końcu 5' lub 3' klonowanego DNA kodującego znacznik molekularny (Rycina 9), umożliwia tworzenie elastycznego oraz hydrofilowego elementu dystansowego pomiędzy znacznikiem oraz białkiem strukturalnym. Taka separacja zapewnia niezależne składanie się białek fuzyjnych, a sam linker nie blokuje prawidłowych funkcji domeny głównej białek połączonych ze sobą [35]. Sekwencje znaczników molekularnych użytych do konstrukcji biblioteki genów bakteriofaga TP-84 przedstawia Rycina 9.

A**B**

Ryc. 9. Sekwencje metek użytych podczas klonowania metodą RF wybranych genów bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pUC19. A. Sekwencja metki histydynowej, składającej się z sześciu reszt histydyny oraz 9-nukleotydowego linkera. **B.** Sekwencja metki FLAG, w której skład wchodziła sekwencja kodująca metkę 3xFLAG oraz 9-nukleotydowy linker. Rycinę wykonałam korzystając z programu Benchling.

Uzyskanie bibliotek rozpoczęto od skonstruowania odpowiednich starterów specyficznych dla techniki klonowania RF [Metody 5.2.8.1.], używając oprogramowania ze strony internetowej <https://rf-cloning.org>. Metoda ta umożliwia wstawianie dużych fragmentów obcego DNA do dowolnego miejsca w kolistym plazmidzie bez żadnych dodatkowych kroków, takich jak trawienie enzymami restrykcyjnymi lub ligacja [10], [36], [37]. Dodatkowo, metoda ta w porównaniu do innych metod klonowania niezależnych od ligacji (ang. Ligation-Independent Cloning, LIC), takich jak system Gateway firmy Invitrogen lub system In-Fusion firmy Clontech, nie bazuje na drogich komercyjnych zestawach oraz nie wymaga przystosowywania wektora docelowego [37]. Klonowanie RF posiada również bardzo pomocne oprogramowanie do projektowania starterów oraz obliczania optymalnego czasu wydłużania podczas obu PCR, które są kluczowymi etapami tej metody [11]. Na Rycinie 10 widoczny jest przykładowy wynik projektowania pary starterów, dla genu 6 bakteriofaga TP-84.

Restriction Free Cloning

Construct Name
pUC19-12

Forward Primer

Plasmid annealing = 60°C Target annealing = 54°C Length = 47

◀▶ CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCATGCCTTTACATTTAGAACAATTC ▶▶

Reverse Primer

Plasmid annealing = 61°C Target annealing = 55°C Length = 47

◀▶ GACGGCCAGTGAATTTCGAGCTCTTAGGATTGTGCAACGATTAAATGA ▶▶

1° PCR Size	New Plasmid Size	Insert Sites	Insert Size
1037bps	3679bps	◀▶ 277-277 ▶▶	◀▶ 993bps ▶▶

2° PCR conditions

Extension Time ng of insert ng of plasmid

1:12 mins 248.9 32.2

New construct

◻ = Original plasmid sequence. ◻ = Inserted sequence.

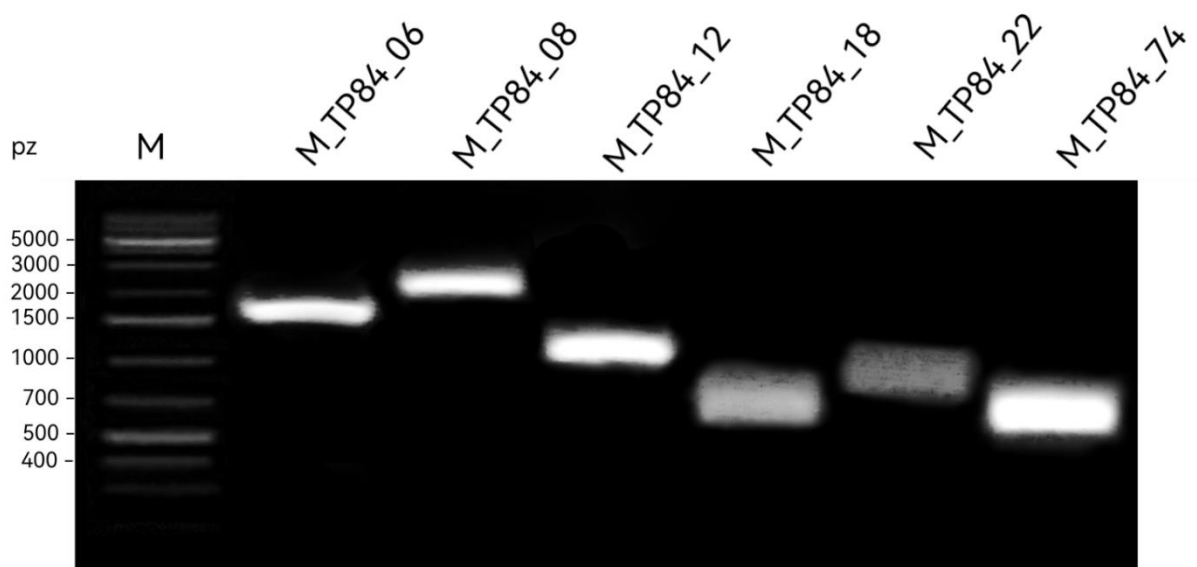
```

GCGCCATA CGCAAAACCG CTCTCCCCCG SCGTTGCGCG ATTCATTAAT GCGCTGCGCA CGACAGTGTT CCGGACTGGA AAGCGGCGAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT CACTGATTAG
GCACCCACAG GTTTACACTTI TAPGCTTCGG GCTCGTATGT TSTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG CCAAGCTTSC ATGCTGCGAG GTCGACTTA
GAGGATCCCG GGGTACCATG CCCTTACATT TAGAACAAAT CCAACGTGAA GCATTCCAGG GGTACGTTGA AAACGTGCGC CCAAAACGTG AATATGCACT GGCAAAATTC ATGCGGAATC AGCCACTTA
TGACATTGAA TTCACATACA ACATCATCAA TGCGGATATG GSACAAATGG CATCCATCAC CGCATGGGAT TCTGGCGCGC CGTTGCGTGA CAAGAATGTG ATTCACGCTC TGACAGCGCA AATCGCCAAA
GTGCAACACG CATATCGCCT TACTGAAAAA GAACGTGTTA TGTTCACCG GCGCAGTATG GATGAAGAAC AGCAACAAGT CATTCAGCGC ATCTACAACA ACACAGACAA GCTTGTCTGG GGTGTCCAA
ACCGTGAAGA ATGGTTGCGC GCTAAAGCTG TTTATGTCGG ACAATTACAA TACAGCGAAA ACGATGTGCA ATTGAACATC GACTTCTTGA TTCCGCGCAGA AACAATTTG ACTGCCGATG TCGACTGGT
TGATCGCACT GCGCCAGTGA TCCACACTT ACRAAGCGCA GTGCAACGAT TCAAGAAGAC AAACAACCGC GAAAGCCAG TGAAATGCA TATGCTTAGC CGGTAGAAA CATGTTATT ACRAAACGAG
CAAGTGAAG CACACATCTA TGGAACACG ACTGATCCGC GCATCGTAC AAGCGAACAA TTACAACAT TATTGAGCGC GTTGTCTTG CCGCCATATC GTGTATCGA TGAACAAGT ATTGGCGAAA
ACGGCGCGGA AGCACTCATG CCAGAAAGTC GTGTGCTTT ACTTGTGAA GAACCTGGAC ACACAATGGA AGGACCGACA GTCGAAAAA ACTACAAGCC TGGCATTTAT TGCATTCAG AATTCAAA
AACAAATCCA CCACGCCAGG AAGTATATGT CGGAAAATCT GTATTTCCGG CATTAGAAGC GCGCAGAGCA GTCGTTCAAT TAATCGTTGC ACAATCTTAA GAGCTGGAAT TCACTGGCGC TCGTTTAC
ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCACTTAAT CGGCTTGCAG CACATCCCCC TTTCGCGAGC TGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACGGAT CGGCCCTCC AACAGTTGCG CAGGCTGAT
GGCGAATGGC SCCTGATCGG GIATTTTCTC CTTAAGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATATGTTGCA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCGCGAT AGTTAAGCCA GCGCGGACAC CCGCCACAC
CGGCTGAAGC GCGCTGACGG GCTTGTCTGC TCCCGCATC CGCTTACAGA CAAGCTGTGA CCGTCTCCGG GAGCTGCATG TGTGAGAGGT TTTCACGCTC ATCGCGGAAA GCGCGGAGAC GAAAGGGCT
CGGTATAAGC CTAITTTTTAT AGTTAATGT CATGATAATA ATGTTTTCTT AGAGCTCAGG TGCGACTTTT CCGGAAAATG TGCGCGGAAAC CCCTAITTTT TTAITTTTTCT AAATACATTC AATATGAT
CGGTCATGA GACATAAACC CPGATAAATG CTTCAAGATT ATGAAAAAG GAGAGATAG AGTAFTCAAC ATTTCCGTTG CCGCCTTATP CCGTITTTT GCGGCTGTTT CCTTCTCAGC
CACTTTTTAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATATCCCGST ATTAGCGCGS GCGCAGAGCA ACTCGGTCCG CCGTACACT ATCTCGAGAA TGACTTGGT GAGTACTGAC CAGTCCAGA AAGCATCTT
ACGATGTAAC TCGCCTTGAAT CGTTSAGAAC CPGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAAAGCAC ACGCTGACAC CAGAGTGGCT TGAGCAATGG CACACACTTT GCGCAACTA TTAAGTGGG AACTACTTAC
CTAGCTTCC CGCAACAAAT TAATAGACTG GAGGAGGCG GATAAAGTGT CAGGACACT TCTGCGCTCG CTGGCTGGGT TATTCTGAT AATCTGAG GCGGTCAGC TGGGTTCCG
GGTATCATG CAGCACTGGG CCGCATGGT AAGCCCTCCG GTATCGTAGT TACTACAGC ACGGGAGTCC AGGCACAT ATGATGACGA AATGACAGA GGATGAGAT AGTGGCTCA CTGATTAAGC
ATGGTAAGT GTACAGACAA GTTACTCAT ATATACTTGA GATTGATTA AAAGTCTGAT TTTAATTTAA AAGATCTAG GTGAAGTCC TTTTGTAA TCTCATGACC AAATTCCTCT ACGTGAAT
TTCGTTCCAC TGAGCGTACG ACCCGTAGA AAGATCAA GATCTCTCT GAGATCTTCT TTTTGGGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAC AAAAARCCA CCGCATCCAG CGGTTGTTG TTTGCGGAT
CTAGGCTTAC CACTCTTTT TCGAAGGTA ACTGGCTTCA CAGAGCGCA GATACAAAT AATGTTCTTC TAGTGTAGCC GTAGTATGGC CACCACTTCA AGAATCTGT AGCAGCCCT AATCACTCG
CTCTGTAAAT CCGTTTACCA GTGGCTGCTG CCAAGTGGGA TAAGTGTGT CTTACCGGGT TGACTCAG ACGATAGTTA CCGGATAAG CCGCAGCGCT GCGCTGAAG GGGGTTCT GACACAGCC
CAGCTTGGAG CGAACGACT ACACCGAACT GAGATCTTCA CAGCTGAGC TATGAGAAG CCGCAGCTTT CCGGAGGGA GAAAGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGA GGGTGGAA CAGGAGCGC
ACGAGGAGC TTCAGGGGG AAGCGCCTGG TATCTTATA GTCTCTGCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTG AGCTGTGAT TTTGTATG TCGTCAAGGG GCGGAGCCT ATGAAAAAC CCGCAGCAG
CGGCTTTT ACGGTTCCTG SCCTTTTGT GGCCTTTGCT TCACATGTC TTTCTGCTT TATCCCTGA TTCTGTGAT AACCSTATA CCGGCTTTGA GTGAGTGT ACCGCTCGC GCGCGGAGC
GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAG

```

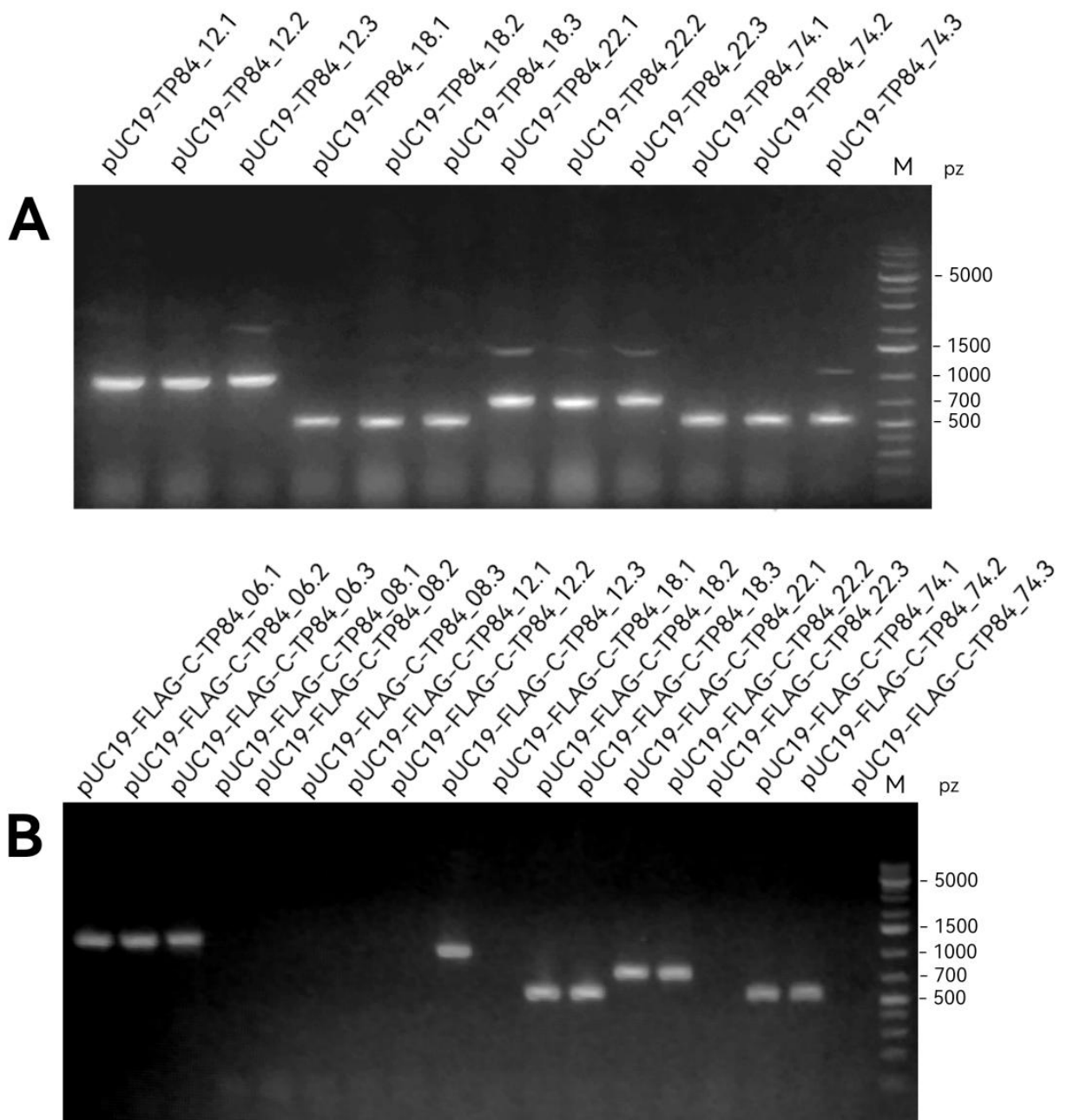
Ryc. 10. Projektowanie pary starterów hybrydowych dla genu 12 bakteriofaga TP-84 do plazmidu pUC19 podczas klonowania metodą RF. Kolorem zielonym zaznaczona jest sekwencja komplementarna do insertu, kolorem niebieskim – sekwencja komplementarna do wektora. Od góry widoczna jest sekwencja startera „forward” wraz z temperaturami hybrydyzacji dla sekwencji komplementarnej do plazmidu (ang. plasmid annealing) oraz do wstawki (ang. target annealing). Następnie te same parametry podane są dla startera „reverse”. Poniżej widoczne są kolejno: wielkość produktu pierwszej PCR (czyli megastartera), wielkość plazmidu rekombinowanego, miejsce insercji wstawki, wielkość wstawki. Podane są również warunki drugiej PCR (ang. 2° PCR conditions), takie jak rekomendowany czas wydłużania, ilość megastartera oraz plazmidu. Na dole widoczny jest schemat konstruktu. Źródło: <https://www.rf-cloning.org/>

Zaprojektowane startery w parach używano podczas PCR typu Touch-Down do wygenerowania megastarterów, nazwanych kolejno M_TP84_06 (1673 pz), M_TP84_08 (2090 pz), M_TP84_12 (1037 pz), M_TP84_18 (602 pz), M_TP84_22 (780 pz), M_TP84_74 (590 pz), M_His-N-TP84_06 (1700 pz), M_His-N-TP84_08 (2117 pz), M_His-N-TP84_12 (1064 pz), M_His-N-TP84_18 (629 pz), M_His-N-TP84_22 (809 pz), M_His-N-TP84_74 (617 pz), M_TP84_06-His-C (1700 pz), M_TP84_08-His-C (2117 pz), M_TP84_12-His-C (1064 pz), M_TP84_18-His-C (629 pz), M_TP84_22-His-C (809 pz), M_TP84_74-His-C (617 pz). Wśród wymienionych powyżej brakuje megastarterów z dołączoną metką FLAG, ponieważ metkę tę klonowano osobno do plazmidu pUC19, i tak przygotowane plazmidy używano do klonowania RF według wyżej opisanego protokołu [Metody 5.2.8.1.]. Dlatego w przypadku klonowania z sekwencją kodującą metkę FLAG można było używać tych samych megastarterów, jak dla genów natywnych. Metka histydynowa była stosunkowo mniejsza (Rycina 9), dlatego sekwencję ją kodującą dołączono bezpośrednio do starterów używanych do wygenerowania megastarterów (Tabela 3). Prawidłowość powielonych megastarterów potwierdzano za pomocą rozdziału elektroforetycznego, oceniając wielkość otrzymanych produktów PCR (Rycina 11).



Ryc. 11. Analiza elektroforetyczna megastarterów M_TP84_06 (1673 pz), M_TP84_08 (2090 pz), M_TP84_12 (1073 pz), M_TP84_18 (602 pz), M_TP84_22 (780 pz), M_TP84_74 (590 pz). M – marker masy cząsteczkowej.

Otrzymane megastartery odpowiadały oczekiwanej wielkości. Przeprowadzono drugą PCR w ramach metody klonowania RF, podczas której otrzymane megastartery przyłączały się do matrycy, tworząc nową kolista cząstkę zawierającą insert (Rycina 2). Matrycę stanowiły wektory plazmidowe pUC19 lub wektory pUC19 z dołączoną sekwencją kodującą znacznik FLAG-C/FLAG-N. Uzyskane produkty drugiej PCR używano do transformacji komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α [Metody 5.2.6.1.]. Prawidłowość sekwencji uzyskanych klonów sprawdzano wstępnie za pomocą kolonijnej PCR [Metody 5.2.9.1.], a następnie za pomocą sekwencjonowania [Metody 5.2.10.]. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów kolonijnej PCR przedstawione są na Rycinie 12. Widoczne na Rycinie 12 produkty kolonijnej PCR zostały powielone poprzez użycie startera „forward” specyficznego do wektora plazmidowego oraz startera „reverse” specyficznego do klonowanego genu bakteriofaga TP-84. Rozmiary przykładowych produktów PCR uwidocznionych na żelu agarozowym odpowiadały wielkościom obliczonym *in silico*, które były następujące: pUC19-TP84_12: 1014 pz, pUC19-TP84_18: 556 pz, pUC19-TP84_22: 740 pz, pUC19-TP84_74: 536 pz, pUC19-FLAG-C-TP84_6: 1252 pz, pUC19-FLAG-C-TP84_12: 1014 pz, pUC19-FLAG-C-TP84_18: 556 pz, pUC19-FLAG-C-TP84_22: 740 pz, pUC19-FLAG-C-TP84_74: 536 pz.



Ryc. 12. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR - transformantów otrzymanych po klonowaniu metodą RF. A. Przykłady transformantów pUC19 z wstawionymi genami 12, 18, 22, 74 bakteriofaga TP-84. **B.** Przykłady pozytywnych klonów pUC19-FLAG-C z wstawionymi genami 6, 12, 18, 22, 74 bakteriofaga TP-84.

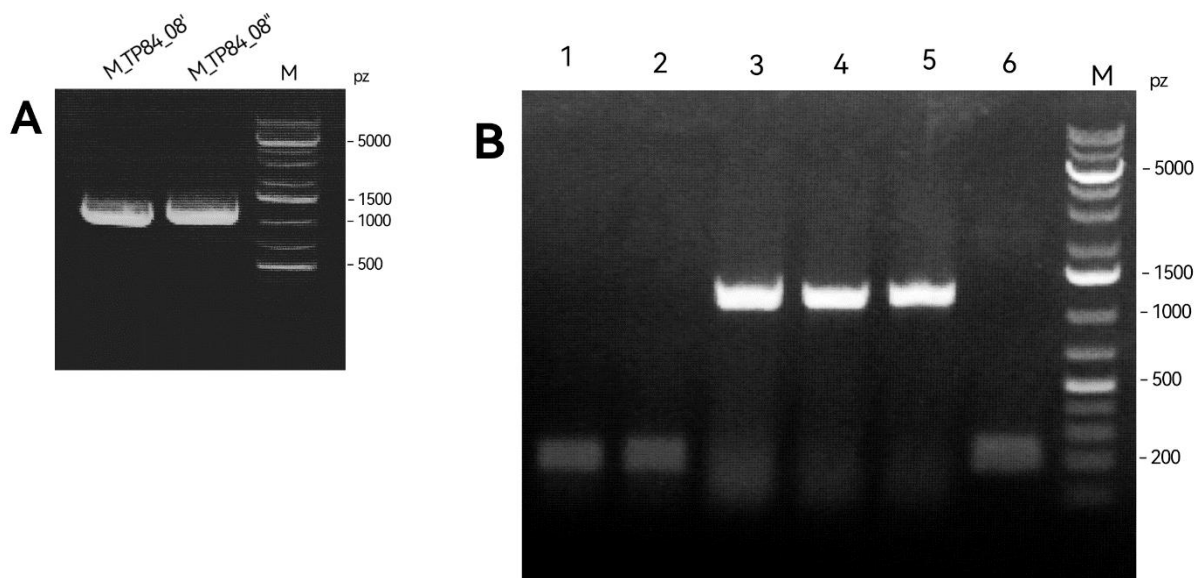
Pozytywne klony potwierdzano ostatecznie zlecając sekwencjonowanie metodą Sanger, z użyciem starterów do sekwencjonowania (Tabela 3). Analizowano przede wszystkim zgodność sekwencji w obrębie wstawki, miejsca insercji oraz znaczników molekularnych. Na Rycinie 13 przedstawione są mapy wszystkich uzyskanych klonów podczas tego etapu badań.



Ryc. 13. Plazmidy rekombinowane uzyskane podczas klonowania genów 6,12,18,22,74 bakteriofaga TP-84 do wektora pUC19, w formie natywnej oraz z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG na końcach 5' oraz 3' klonowanego genu. AmpR – gen oporności na ampicylinę; ori- miejsce inicjacji replikacji; Plac – promotor, *lacZα* – gen kodujący enzym β -galaktozydazę; MCS – polilinker, 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; 3xFLAG – sekwencja kodująca metkę FLAG. Rycinę wykonałam korzystając z programu Benchling.

6.2.1. Klonowanie tandemowe genu 8 bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pUC19

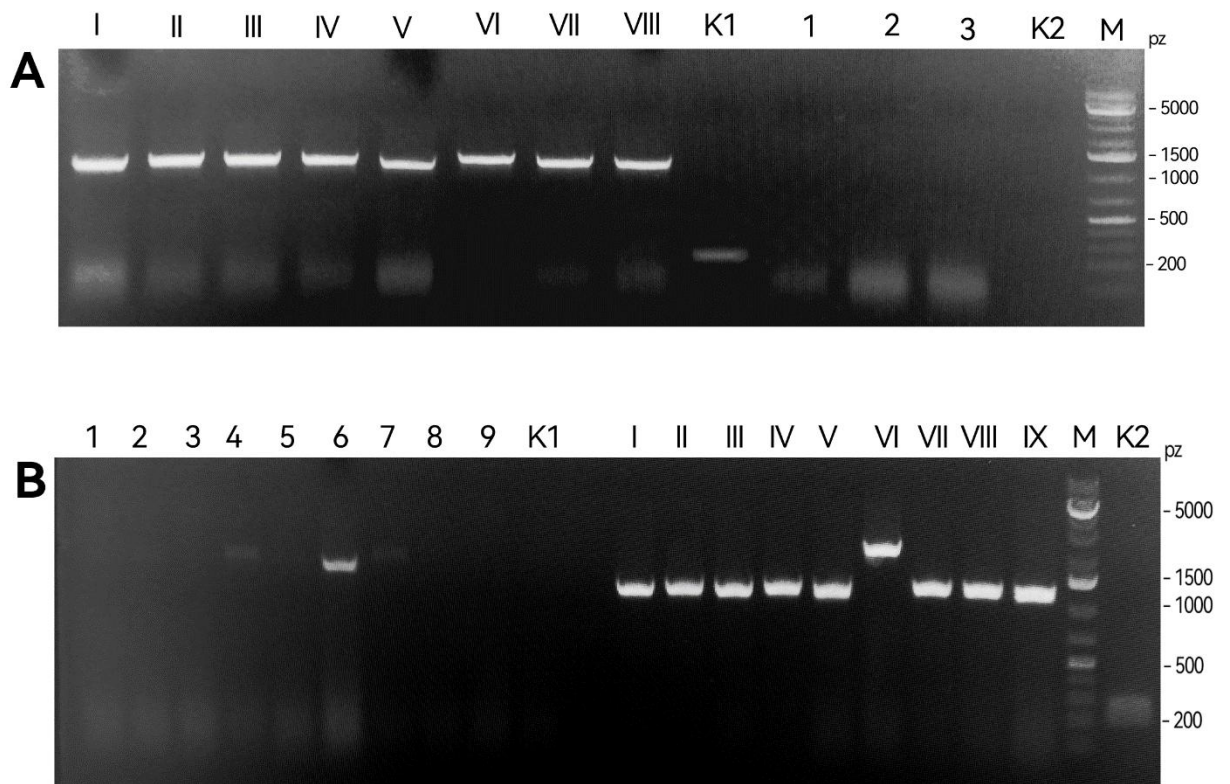
W wyniku zastosowania standardowego protokołu klonowania RF [Metody 5.2.8.1.] udało się wygenerować jedynie megastarter genu 8 bakteriofaga TP-84, czyli gen oflankowany sekwencjami komplementarnymi do wektora plazmidowego pUC19 (Rycina 11), nie udało się natomiast uzyskać ani jednego pozytywnego klonu podczas analizy transformantów po zakończonym klonowaniu metodą RF, pomimo sprawdzenia za pomocą kolonijnej PCR wielu kolonii. Postanowiłam przyjąć inną taktykę na umieszczenie tego genu w wektorze plazmidowym pUC19, zarówno w formie natywnej, jak i z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne. Zaprojektowałam od nowa startery do namnożenia megastartera w taki sposób, aby móc sklonować gen 8 w dwóch częściach. Pierwszy fragment genu o długości 1000 pz nazwałam 8', natomiast drugi fragment o długości 1046 pz nazwałam 8''. Podczas pierwszej PCR typu Touch-Down w ramach metody RF powieliłam dwa megastartery, nazwane kolejno M_TP84_08' (1023 pz) oraz M_TP84_08'' (1090 pz), których rozmiar potwierdzony został rozdziałem elektroforetycznym (Rycina 14A). Drugą PCR, w ramach klonowania metodą RF, przeprowadziłam zgodnie z protokołem [Metody 5.2.8.1.3.], używając plazmidu pUC19 oraz megastartera M_TP84_08'. Podczas analizy transformantów otrzymanych po przeprowadzeniu wyżej opisanej reakcji, udało się potwierdzić obecność pozytywnych klonów pUC19-TP84_08', co widoczne jest na Rycinie 14B. Podczas analizy transformantów za pomocą kolonijnej PCR, użyłam pary starterów specyficznych do wektora. Długość produktu PCR, jaki powinien powstać po powieleniu pozytywnego transformanta pUC19-TP84_08', to 1188 pz. Prążki na takiej wysokości były widoczne w przypadku transformantów oznaczonych cyframi 3, 4, 5 (Ryc. 14B). Prawidłowość jednego z otrzymanych klonów pUC19-TP84_08' potwierdzona została sekwencjonowaniem. Widoczne prążki w dołkach 1, 2, 6 (Ryc. 14B) o wielkości około 200 pz, świadczą o tym, że sprawdzane transformanty zawierały wyjściowy plazmid pUC19 i dlatego powstał bardzo mały produkt kolonijnej PCR.



Ryc. 14. A. Rozdział elektroforetyczny megastarterów M_TP84_08' oraz M_TP84_08'' powielonych za pomocą PCR typu Touch-Down podczas klonowania tandemowego genu 8 bakteriofaga TP-84. **B.** Rozdział elektroforetyczny transformantów po klonowaniu metodą RF z użyciem megastarterów 8'. Ścieżki: 1,2,6 – transformanty zawierające wyjściowy plazmid pUC19; ścieżki: 3,4,5 – transformanty z prawidłowo wstawionym fragmentem 8' (pUC19-TP84_08'). M – marker masy cząsteczkowej.

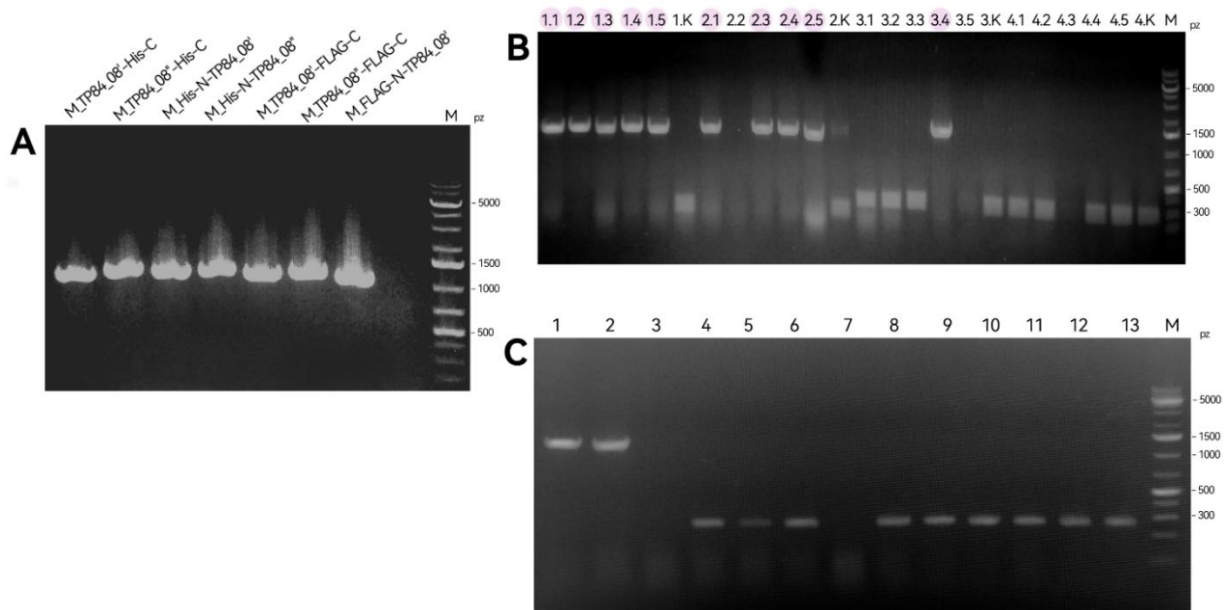
Potwierdzony sekwencjonowaniem, pozytywny klon pUC19-TP84_08', użyłam do wstawienia fragmentu 8''. Stosując protokół dotyczący drugiej PCR w ramach klonowania RF [Metody 5.2.8.1.3.], użyłam plazmid pUC19-TP84_08' oraz megastarter M_TP84_08''. Po zakończonej transformacji i sprawdzeniu wielu kolonii za pomocą kolonijnej PCR nie udało się znaleźć pozytywnego transformanta. Kroki, jakie podjęłam, aby otrzymać klon z wstawionym fragmentem genu 8'' obejmowały: I. Wydłużenie trawienia produktów PCR enzymem *DpnI* do 15 godzin, aby zmniejszyć liczbę transformantów z plazmidami pUC19-TP84_08', które stanowiły tło reakcji (Rycina 15A); II. Zwiększyłam czas etapu wydłużania podczas drugiej PCR z 3-5 do 7 minut. Dodatkowo, czas przyłączania starterów wydłużyłam do 1 minuty, zamiast 20 sekund stosowanych podczas klonowania innych genów; III. Zastosowałam dodanie megastartera do plazmidu w stosunku molowym 15:1. Po zastosowaniu wyżej wymienionych modyfikacji metody, oraz sprawdzeniu za pomocą kolonijnej PCR wielu transformantów, udało mi się uzyskać pozytywny klon pUC19-TP84_08'+08'', którego sekwencja została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie, chociaż wydajność klonowania była niska (Rycina 15B). Podczas klonowania drugiego fragmentu genu 8, czyli 8'' mogłam zastosować dwie różne konfiguracje starterów, podczas

analizy transformantów metodą kolonijnej PCR. Pierwszą konfiguracją była para starterów specyficznych do wektora. W tym przypadku, produkt PCR klonów negatywnych powinien mieć wielkość 1188 pz, natomiast produkt PCR klonów pozytywnych powinien być wielkości 2234 pz. W drugiej konfiguracji, czyli jeden starter specyficzny do wektora, a drugi specyficzny do wstawki, prążki o wielkości 1794 pz powinny być widoczne tylko, jeśli klon był pozytywny. Wynikało to z faktu, że sekwencje starterów specyficznych do genu 8 (Tabela 3) były umieszczone w obrębie fragmentu 8^{''}. Na Rycinie 15B prążki przy dołkach 6 oraz VI podwójnie potwierdziły obecność pozytywnego transformanta pUC19-TP84_08'+08^{''}.



Ryc. 15. Analiza elektroforetyczna transformantów po klonowaniu fragmentu 8^{''} genu 8 bakteriofaga TP-84 do plazmidu rekombinowanego pUC19-TP84_08[']. **A. Rozdział produktów kolonijnej PCR, obecne same klony negatywne.** Ścieżki: I-VIII, K1 – użyto parę starterów specyficznych do wektora plazmidowego. Ścieżki: 1, 2, 3, K2 – użyto starter „forward” specyficzny do wektora plazmidowego oraz starter „reverse” specyficzny do fragmentu 8^{''}. **B. Rozdział produktów kolonijnej PCR, widoczny klon pozytywny pUC19-TP84_08'+08^{''} (dolki 6 i VI).** Ścieżki: 1-9, K1 - użyto starter „forward” specyficzny do wektora plazmidowego oraz starter „reverse” specyficzny do fragmentu 8^{''}. Ścieżki: I-IX, K2 - użyto parę starterów specyficznych do wektora plazmidowego. K1, K2 – kontrola negatywna (plazmid pUC19). M – marker masy cząsteczkowej.

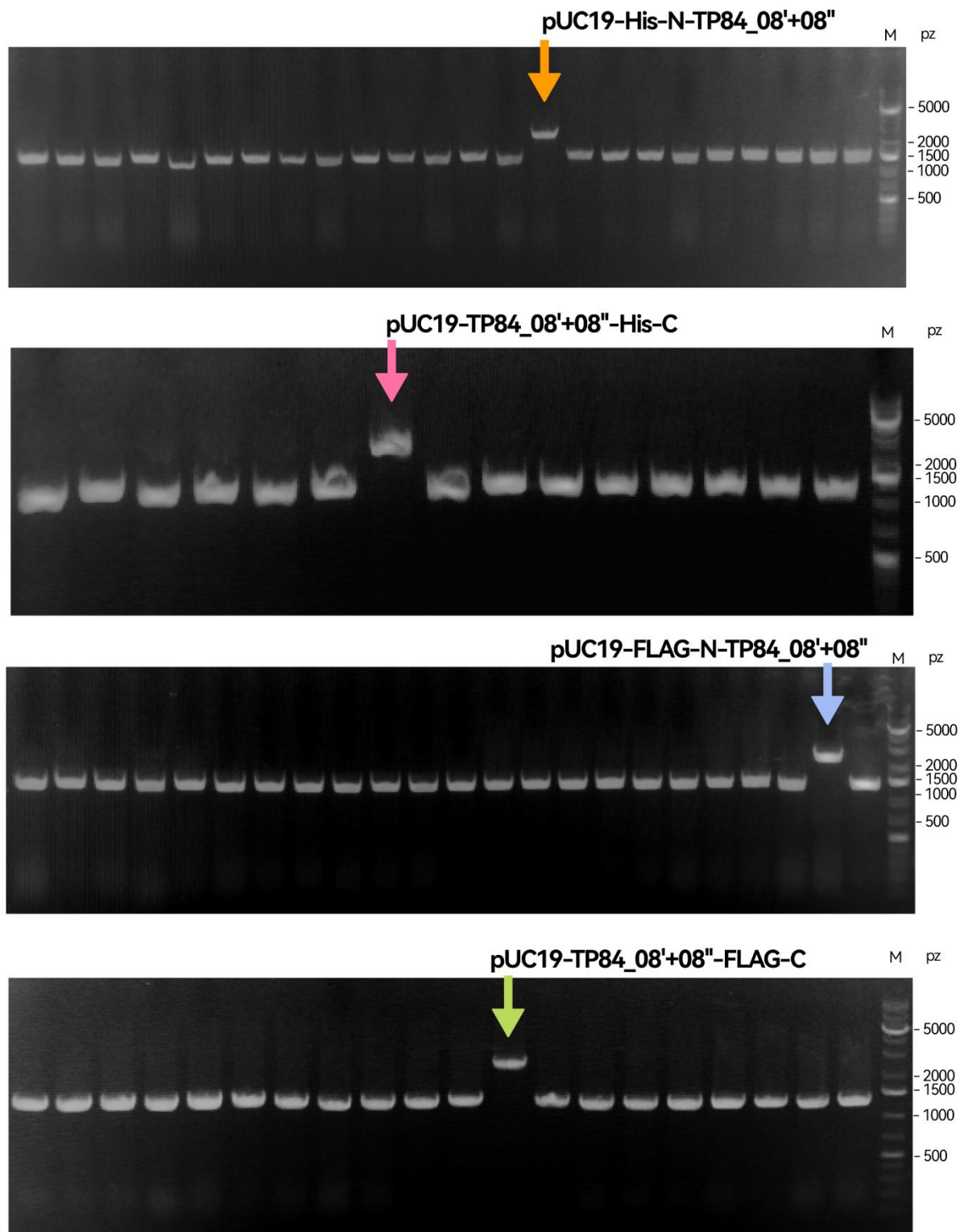
W następnym etapie moich badań przystąpiłam do uzyskania pozostałych klonów genu 8 bakteriofaga TP-84 metodą tandemową RF, czyli z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne 3xFLAG oraz 6xHis na N- i C-końcu peptydu kodowanego przez rekombinowany gen. Wszystkie kroki były analogiczne jak przy klonowaniu genu natywnego. Najpierw powieliłam megastartery w ramach pierwszej PCR typu Touch-Down (Rycina 16A).



Ryc. 16. A. Rozdział elektroforetyczny megastarterów M_TP84_08' oraz M_TP86_08'' z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG, na obu końcach genu, powielonych za pomocą PCR typu Touch-Down podczas klonowania tandemowego genu 8 bakteriofaga TP-84. **B. Rozdział produktów kolonijnej PCR.** Do powielenia fragmentów DNA użyto parę starterów specyficznych do wektora plazmidowego. Rozdział elektroforetyczny dotyczy transformantów po klonowaniu metodą RF z użyciem megastarterów 8', klony pozytywne zaznaczone są kolorem. Ścieżki: 1.1-1.K – pUC19-His-N-TP84_08'; Ścieżki: 2.1-2.K – pUC19-TP84_08'-His-C; Ścieżki: 3.1-3.K – pUC19-FLAG-N-TP84_08'; Ścieżki: 4.1-4.K – pUC19-TP84_08'-FLAG-C. K1, K2, K3 – kontrole negatywne stanowiły niebieskie kolonie pobrane z płytek po transformacji. M – marker masy cząsteczkowej. **C. Rozdział produktów kolonijnej PCR.** Do powielenia fragmentów DNA użyto parę starterów specyficznych do wektora plazmidowego. Rozdział elektroforetyczny dotyczy transformantów po klonowaniu metodą RF z użyciem megastarterów 8'. W ścieżkach 1 i 2 znajdowały się pozytywne klony pUC19-TP84_08'-FLAG-C. M – marker masy cząsteczkowej.

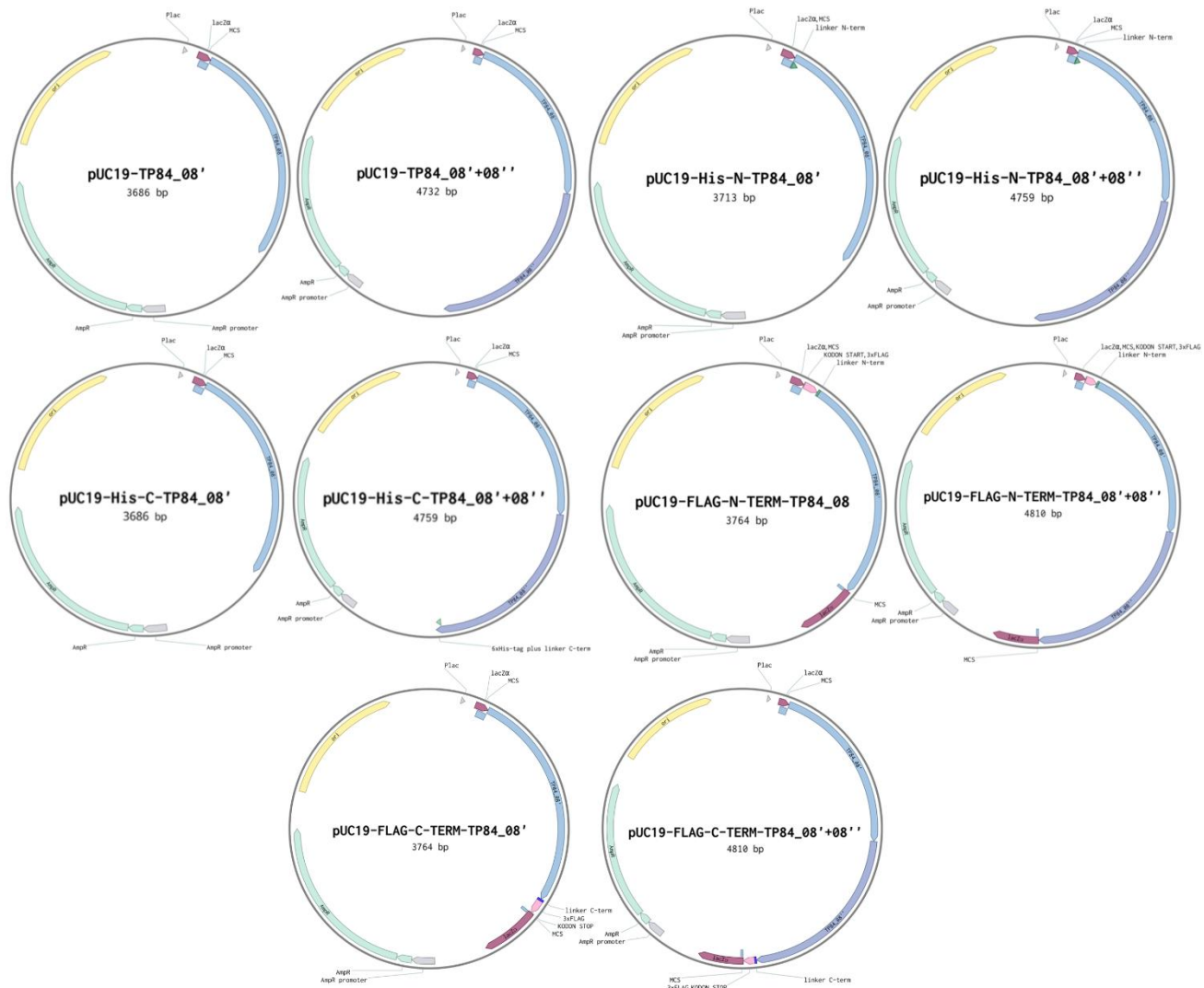
Krok ten powinienem zredukować do namnożenia tylko M_His-N-TP84_08' (1070 pz) oraz M_TP84_08''-His-C (1117 pz), ponieważ reszta megastarterów miała sekwencje identyczne

do wcześniej używanych megastarterów dla genu natywnego, czyli M_TP84_08' (1023 pz) oraz M_TP84_08'' (1090 pz), więc mogły być używane zamiennie. Następnie, podczas drugiej PCR, użyłam jak matrycy plazmidu pUC19 (podczas klonowania fragmentów z sekwencjami kodującymi znacznik histydynowy) lub pUC19-FLAG-N/pUC19-FLAG-C, oraz powielonych megastarterów. Podczas analizy za pomocą kolonijnej PCR transformantów otrzymanych po przeprowadzeniu wyżej opisanej reakcji, na Rycinie 16B oraz 16C widoczne są prążki potwierdzające obecność transformantów pozytywnych pUC19-His-N-TP84_08' (1266 pz), pUC19-TP84_08'-His-C (1188 pz), pUC19-FLAG-N-TP84_08' (1266 pz), pUC19-TP84_08'-FLAG-C (1266 pz). Pozytywne klony potwierdzone zostały sekwencjonowaniem przed przystąpieniem do klonowania fragmentu 8''. Klonowanie fragmentu 8'' do plazmidów pUC19-His-N-TP84_08', pUC19-TP84_08'-His-C, pUC19-FLAG-N-TP84_08', pUC19-TP84_08'-FLAG-C przeprowadziłam analogicznie jak w przypadku klonowania fragmentu 8'' w wersji natywnej. Wydajność tego klonowania dalej była bardzo niska, dlatego podczas analizy transformantów kolonijną PCR sprawdzałam bardzo dużo kolonii z płytek po transformacji, aby znaleźć klony pozytywne. Z tego też powodu stosowałam tylko parę starterów specyficznych do plazmidu, analizując jedynie rozmiary produktów PCR (Rycina 17). Po wielu kolonijnych PCR, na Rycinie 17 widoczne są klony pozytywne pUC19-His-N-TP84_08'+08'', pUC19-TP84_08'+08''-His-C, pUC19-FLAG-N-TP84_08'+08'', pUC19-TP84_08'+08''-FLAG-C. Wszystkie te klony zostały potwierdzone sekwencjonowaniem.



Ryc. 17. Analiza elektroforetyczna transformantów po tandemowym klonowaniu RF fragmentu 8'' genu 8 bakteriofaga TP-84, z dołączonymi znacznikami molekularnymi. Używano pary starterów specyficznych do wektora. Strzałkami zaznaczono pozytywne klonu pUC19-His-N-TP84_08'+08'', pUC19-TP84_08'+08''-His-C, pUC19-FLAG-N-TP84_08'+08'', pUC19-TP84_08'+08''-FLAG-C. M- marker masy cząsteczkowej.

Na Rycinie 18 przedstawione są mapy klonów uzyskanych podczas tandemowego klonowania metodą RF genu 8 bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pUC-19.



Ryc. 18. Plazmidy rekombinowane uzyskane podczas tandemowego klonowania genu 8 bakteriofaga TP-84 do wektora pUC19, w formie natywnej oraz z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG na końcach 5' oraz 3' klonowanego genu. AmpR – gen oporności na ampicylinę; ori – miejsce inicjacji replikacji; Plac – promotor, lacZα – gen kodujący enzym β-galaktozydazę; MCS – polilinker, 6xHis – sekwencja kodująca znacznik histydynowy; 3xFLAG – sekwencja kodująca metkę FLAG. Rycinę wykonałam korzystając z programu Benchling.

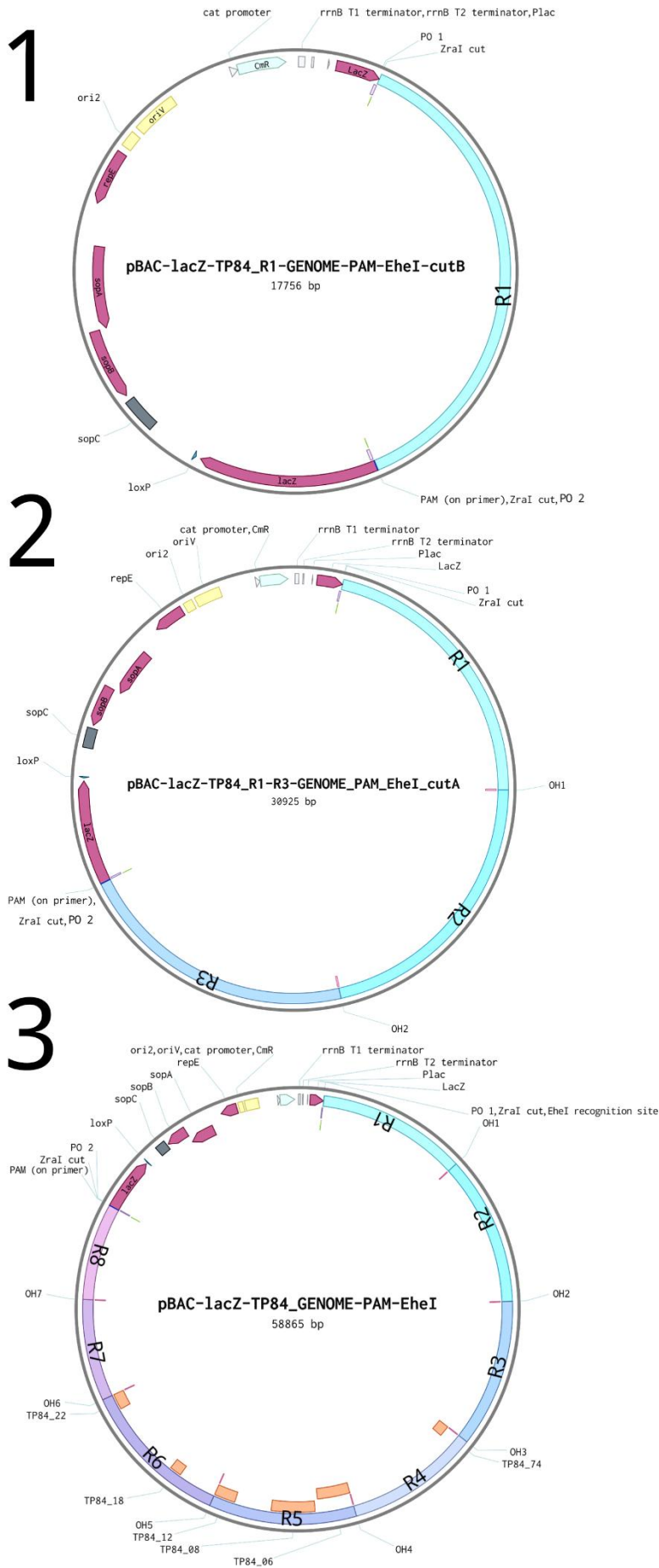
Podsumowując, ten etap pracy zakończył się skonstruowaniem w plazmidzie pUC19 biblioteki genów bakteriofaga TP-84 6, 8, 12, 18, 22, 74 w formie natywnej oraz z dołączonymi sekwencjami kodującymi metkę histydynową oraz FLAG, C- i N-końcu

peptydu kodowanego przez rekombinowany gen. Gen 8 faga TP-84, kodujący ważne białko w aspekcie systemu prezentacji białek/peptydów, czyli dodatkowe białko kapsydowe, okazał się bardzo problematyczny. Nawet pomimo pozytywnego wyniku po zastosowanej optymalizacji metody RF, czyli tandemowego klonowania tego genu, wydajność transformacji pozostawała na bardzo niskim poziomie. Mogło to wynikać z toksyczności produktu tego genu dla komórek *E. coli*. Być może zastosowanie organizmów termofilnych, na przykład naturalnie kompetentnych bakterii *Thermus thermophilus*, pozwoliłoby osiągnąć lepsze wyniki klonowania genu kodującego dodatkowe białko kapsydu TP-84 [38]. Innym sposobem mogłoby być zastosowanie wektorów wahadłowych z plazmidów *Geobacillus*, skonstruowanych specjalnie do celów inżynierii genetycznej w warunkach optymalnych dla organizmów termofilnych [39]. Cechą charakterystyczną wektorów wahadłowych, w tym przypadku wektorów opierających się na *Geobacillus*, takich jak pG1K, jest możliwość powielania ich w dwóch różnych bakteriach, w *E. coli*, która jest mezofilem oraz w różnych gatunkach *Geobacillus*, które są termofilami [39].

6.3. Klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona

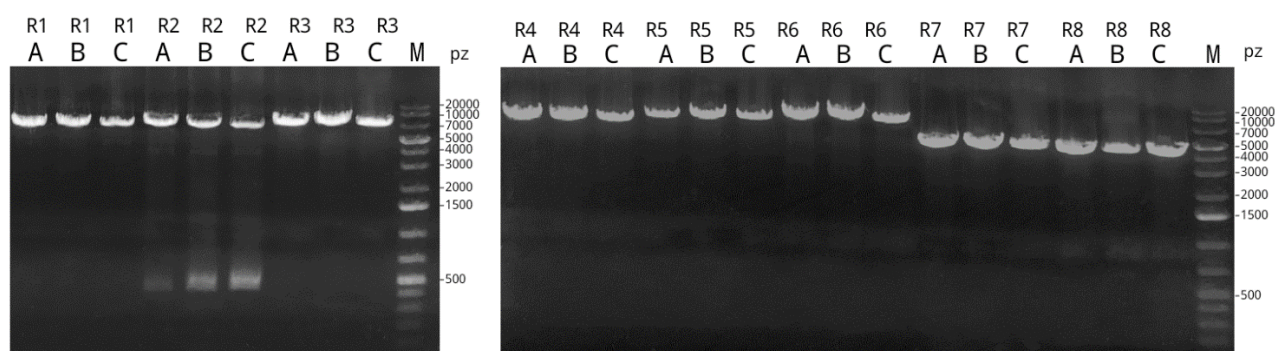
Umożliwienie wprowadzania modyfikacji w obrębie całego genu faga TP-84 było kolejnym etapem w tworzeniu funkcjonalnego systemu prezentacji białek/peptydów na powierzchni faga. Aby sklonować cały genom bakteriofaga TP-84 zdecydowano się na użycie wektora typu BAC (ang. bacterial artificial chromosome) oraz metody Gibsona. Sztuczny chromosom bakteryjny (BAC) jest wektorem bazującym na DNA bakteryjnego czynnika F, który warunkuje replikację konstruktów w komórkach *E. coli* [40]. Wektory te stosowane są często do klonowania genomów z uwagi na możliwość wstawiania fragmentów DNA o wielkości 150-350 kbp [41]. Wektor zastosowany w niniejszej pracy, czyli pBAC-lacZ, zawiera dodatkową ważną cechę, a mianowicie indukowalny system kontroli liczby kopii [6]. Łączy on zalety wektorów jedno-kopijnych, czyli stabilność dużych konstruktów oraz niski poziom ewentualnej toksyczności dla komórek *E. coli*, oraz zalety wektorów wysoko-kopijnych, czyli dużą wydajność odzyskiwania DNA po celowej indukcji [42]. Bakteriofag TP-84 posiada stosunkowo duży genom, zawierający ponad 80 otwartych ramek odczytu (ang. Open Reading Frame, ORF), z czego wiele z niezdefiniowaną funkcją,

dlatego użycie wektora indukowalnego mogłoby ograniczyć ewentualne negatywne oddziaływania wstawionego genomu na komórki *E. coli* [4]. Klonowanie Gibsona jest metodą bazującą na homologii sekwencji, wykorzystującą długie, nakładające się regiony między składanymi fragmentami [43]. Metoda ta umożliwia składanie wielu fragmentów DNA podczas jednej reakcji, niezależnie od dostępności miejsc restrykcyjnych, co było jednym z głównych powodów wybrania tej metody do klonowania genomu faga TP-84. W 2008 roku za pomocą klonowania metodą Gibsona, złożono *in vitro* syntetyczny genom *Mycoplasma genitalium* o wielkości 589,9 kbp, czyli ponad dziesięciokrotnie większy od genomu faga TP-84 [44]. Standardowe protokoły dotyczące klonowania Gibsona wskazują na możliwość jednoczesnego składania 12 fragmentów DNA o długości 0,4 kbp, zalecając jednak używanie pięciu insertów lub mniej, z uwagi na spadek wydajności i wierności reakcji w przypadku większej liczby insertów lub też większych ich rozmiarów. Biorąc pod uwagę możliwą niską wydajność, klonowanie metodą Gibsona zaplanowano w trzech wariantach (Rycina 19): klonowanie całego genomu bakteriofaga TP-84 podzielonego na 8 części o rozmiarach od 4200 do 6700 pz (R1-R8) do plazmidu pBAC-lacZ (wielkość konstruktów 58865 pz), klonowanie trzech fragmentów genomu bakteriofaga o łącznej wielkości około 15000 pz (R1-R3cutA) (wielkość konstruktów 30925 pz), oraz klonowanie jednego fragmentu genomu bakteriofaga o wielkości około 5000 pz (R1cutB) (wielkość konstruktów 17756 pz). Struktura plazmidu po klonowaniu obejmowała na końcu 3' (plazmidu) jedno z trzech miejsc restrykcyjnych, rozpoznawanych przez enzymy *AarI*, *BspOI* lub *EheI*, na końcu 5' (plazmidu) sekwencję PAM (ang. protospacer adjacent motif). Sekwencja PAM była umieszczona w starterze „reverse” ostatniego klonowanego fragmentu genomu TP-84 (R1, R3 lub R8). Dodanie tej sekwencji do rekombinowanych plazmidów umożliwiłoby w późniejszym czasie użycie systemu CRISPR/Cas9 typu II do cięcia DNA w wyznaczonym przez sekwencję PAM miejscu. Miejsce restrykcyjne dla enzymu *ZraI*, którym linearyzowano plazmid pBAC-lacZ, oraz jednocześnie miejsce insercji fragmentów genomu bakteriofaga, znajdowało się w obrębie genu *lacZ*, aby umożliwić selekcję białoniebieską po klonowaniu.



Ryc. 19. Zaprojektowane *in silico* trzy warianty klonowania metodą Gibsona genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ. 1. Jeden fragment genomu bakteriofaga TP-84 (R1cutB) wstawiony do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymem *ZraI*. 2. Trzy fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R3cutA) wstawione do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymem *ZraI*. 3. Cały genom bakteriofaga TP-84 podzielony na 8 fragmentów (R1-R8) wstawiony do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymem *ZraI*. CmR – gen oporności na chloramfenikol; ori- miejsce inicjacji replikacji; Plac – promotor, lacZa – gen kodujący enzym β -galaktozydazę; repE – gen kodujący białko inicjacji replikacji; sopA, sopB, sopC – sekwencje kodujące genów związanych z czynnikiem płciowym F; loxP – sekwencja rozpoznawana w systemie Cre-lox; OH – miejsca 40 pz „nawisów” między fragmentami genomu TP-84; PO – miejsca 40 pz „nawisów” między genomem TP-84 a plazmidem pBAC-lacZ; ZraI cut – miejsce cięcia enzymem *ZraI*; Rycina wykonana korzystając z programu Benchling.

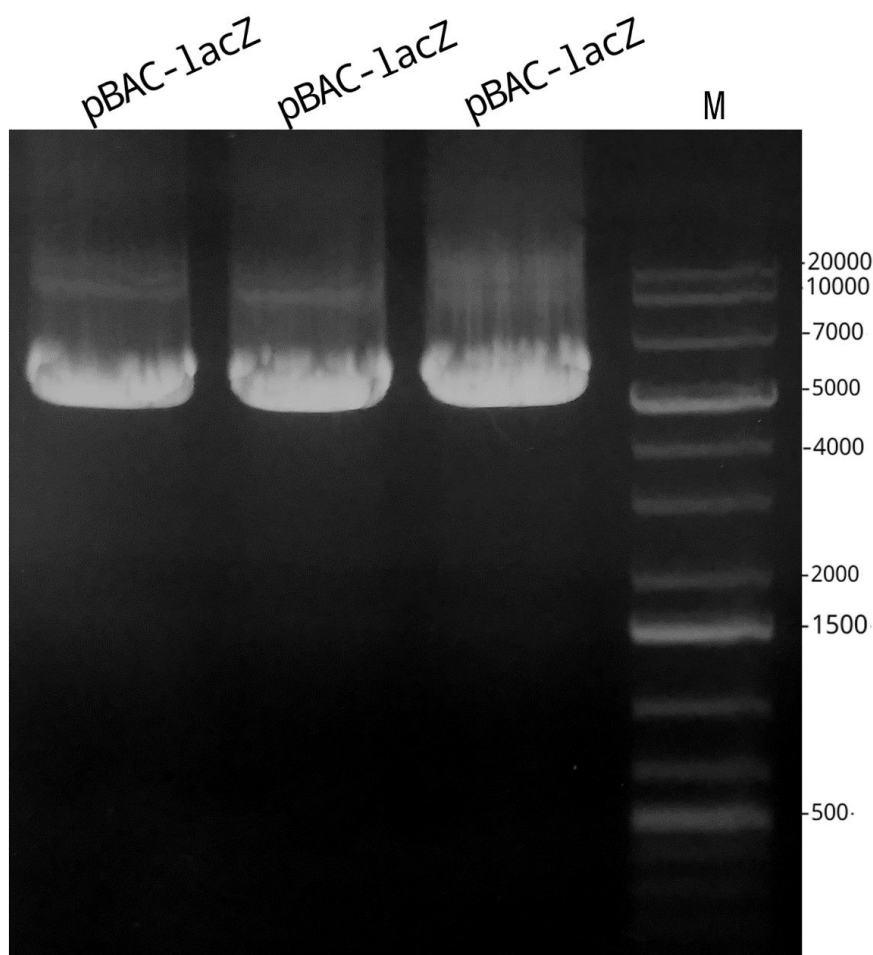
Pierwszym krokiem klonowania metodą Gibsona było powielenie fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 za pomocą Touch-Down PCR, używając trzech różnych polimeraz (Metody 5.2.8.2.2.; Tabela 14). Po zakończeniu reakcji i wykonaniu elektroforezy agarozowej, stwierdziłam, że wszystkie fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 były odpowiedniej wielkości oraz jakości (Rycina 20). Wielkości otrzymanych fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 były następujące: R1EheI 6600 pz, R2 6600 pz, R3 6569 pz, R4 5893 pz, R5 6555 pz, R6, 6693 pz, R7 4500 pz, R8 4293 pz. Nie zauważyłam istotnych różnic między używanymi polimerazami DNA, dlatego do dalszych doświadczeń używałam Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher, USA), ze względu na najkorzystniejszy stosunek jakości oraz dostępności do ceny.



Ryc. 20. Analiza elektroforetyczna ośmiu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R8), używanych podczas klonowania metodą Gibsona. W ścieżkach oznaczonych literą A widoczne są produkty reakcji z zastosowaniem polimerazy Q5 High-Fidelity Polymerase (NEB, USA); w ścieżkach oznaczonych literą B widoczne są produkty reakcji z zastosowaniem polimerazy Phusion High-Fidelity Polymerase (NEB, USA); w ścieżkach oznaczonych literą C widoczne są produkty reakcji z zastosowaniem polimerazy Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher, USA). M – marker masy cząsteczkowej.

Dodatkowo, za pomocą elektroforezy agarozowej oceniłam jakość powielonego i wyizolowanego plazmidu pBAC-lacZ [Metody 5.2.3.3.]. Wielkość plazmidu to 11151 pz, jednak podczas elektroforezy agarozowej niezlinearyzowanego plazmidu, uzyskany główny prążek ulokowany był na wysokości 5000 pz (Rycina 21). Prążek ten odpowiadał najprawdopodobniej formie super zwiniętej plazmidu, która migruje w żelu agarozowym szybciej niż inne formy konformacji przestrzennej plazmidu. Prążek widoczny na wysokości około 10000 pz, odpowiadający wielkością plazmidowi pBAC-lacZ, reprezentował formę liniową plazmidu. Natomiast prążek na wysokości 20000 pz był prawdopodobnie formą kolistą częściowo naciętą (ang. open circular, nicked). Używany zestaw do izolacji

plazmidowego DNA został skonstruowany tak, aby izolować najwięcej formy superzwiniętej plazmidu, ponieważ forma ta cechuje się najwyższą wydajnością podczas transformacji komórek *E. coli* [9].



Ryc. 21. Analiza elektroforetyczna plazmidu pBAC-lacZ.

M – marker masy cząsteczkowej.

6.3.1. Klonowanie całego genomu TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona

Klonowanie metodą Gibsona rozpoczęłam od prób wstawienia całego genomu bakteriofaga TP-84 podzielonego na osiem części (R1-R8) do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego wcześniej enzymem restrykcyjnym *ZraI*, podczas jednej reakcji, według podstawowego protokołu [Metody 5.2.8.2.]. Stosunek molowy podczas opisywanych, początkowych reakcji Gibsona wynosił 3:1, co oznaczało, że w mieszaninie reakcyjnej do

klonowania, stężenie (pmol) wszystkich dodawanych fragmentów genomu TP-84 było trzykrotnie wyższe niż stężenie zlinearyzowanego plazmidu pBAC-lacZ. Fragmenty genomu TP-84 były dodawane w stosunku równomolarnym. Stężenia insertów i plazmidu obliczałam za pomocą wzoru A [Metody 5.2.8.2.2.]. Po zakończeniu reakcji Gibsona i transformacji komórek kompetentnych, wykonywałam kolonijną PCR ze wszystkich białych kolonii uzyskanych na płytkach [Metody 5.2.9.1.]. Wydajność transformacji na tym etapie była niska.



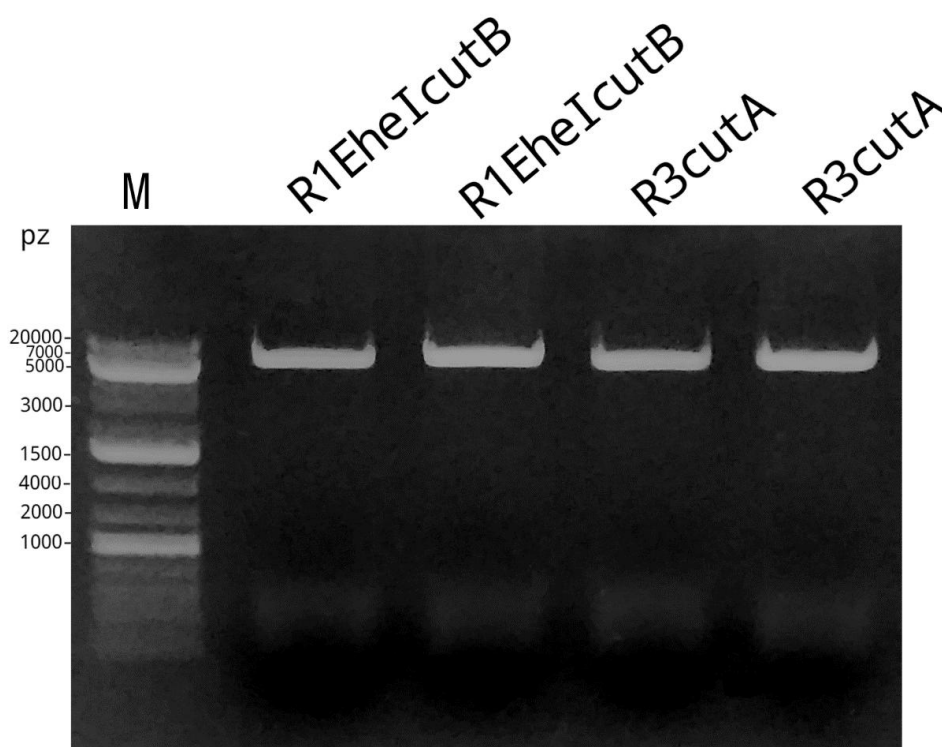
Ryc. 22. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R8. 1-4 oznaczenie kolonii bakteryjnych; K – kontrola negatywna, kolonia niebieska. pp – para starterów specyficznych do plazmidu; pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp – starter „forward” specyficzny do wstawki (R8), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

Na Rycinie 22 widoczny jest rozdział elektroforetyczny produktów kolonijnej PCR podczas sprawdzania transformantów po klonowaniu Gibsona. Produkty wszystkich par starterów używanych do sprawdzania transformantów charakteryzowały się wielkością 340-350 pz. Prążki widoczne tylko przy parze starterów specyficznych do wektora plazmidowego wskazywały jednoznacznie, że wszystkie sprawdzane kolonie posiadały wyjściowy plazmid pBAC-lacZ. Kilukrotnie powtórzyłam reakcję Gibsona z wszystkimi fragmentami genomu bakteriofaga TP-84. Podczas prób klonowania metodą Gibsona, wykonywałam kontrolę negatywną poprzez dodawanie zlinearyzowanego plazmidu pBAC-lacZ do mieszaniny reakcyjnej. Na płytkach z kontrolą negatywną zwykle było tyle samo lub więcej kolonii, niż na płytkach z właściwą reakcją, co świadczyło o niskiej wydajności trawienia restrykcyjnego plazmidu, lub o jego ponownej cyrkularyzacji. Zmiany, jakie wprowadzałam to ponowna izolacja i wydłużony czas cięcia restrykcyjnego plazmidu pBAC-lacZ enzymem *ZraI*, użycie różnych stosunków molowych, w tym 4:1, 2,5:1, 2:1

(wstawki do wektora), podczas gdy fragmenty genomu były nadal dodawane w stosunku równomolarnym. Mimo zastosowanych modyfikacji, wydajność transformacji dalej była niska, a sprawdzane kolonie były negatywne.

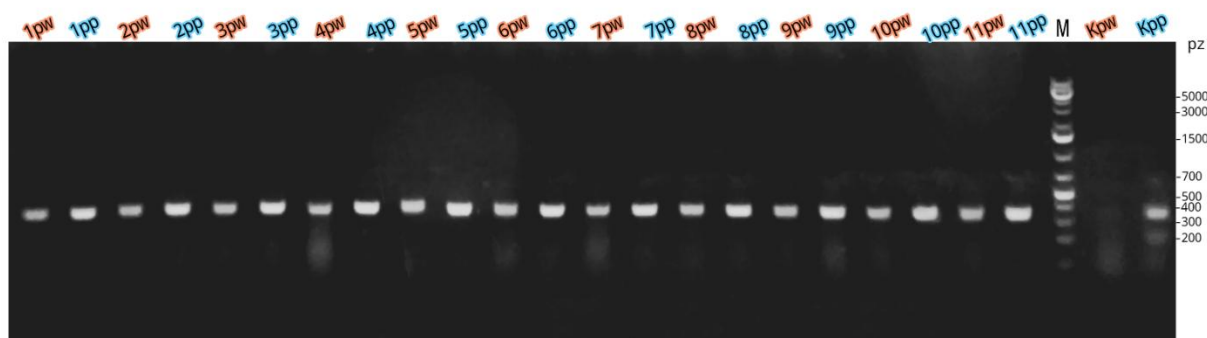
6.3.2. Klonowanie jednego fragmentu genomu bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 pz do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona

Ze względu na niepowodzenie w sklonowaniu pełnego genomu TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ, zdecydowałam się na wykonanie jednego z zaprojektowanych wariantów klonowania, czyli wstawienia pojedynczego fragmentu genomu, R1EheIcutB. Klonowanie to miało na celu sprawdzenie, czy doświadczenie zostało zaplanowane prawidłowo oraz czy mieszanina reakcyjna do reakcji Gibsona jest prawidłowo przygotowana.



Ryc. 23. Analiza elektroforetyczna powielonych fragmentów genomu bakteriofaga TP-84, R1EheIcutB umożliwiające przeprowadzenie klonowania metodą Gibsona z jednym fragmentem R1EheI, R3cutA umożliwiające przeprowadzenie klonowania metoda Gibsona z trzema fragmentami R1EheI-R3. M – marker masy cząsteczkowej.

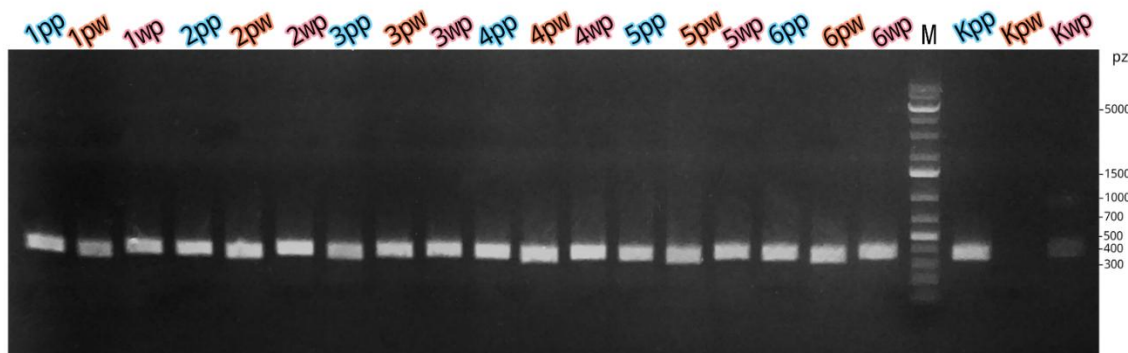
W pierwszym kroku, podczas PCR typu Touch-Down, powielone zostały fragmenty R1EheIcutB, oraz R3cutA (do użycia w kolejnych etapach badań) (Rycina 23). Rozmiary powielonych wstawek były następujące: R1EheIcutB 6600 pz, R3cutA 6569, co zostało potwierdzone podczas analizy elektroforetycznej. Wstawki te różniły się od wstawek R1 oraz R3 powielonych we wcześniejszym etapie badań (Rycina 20) sekwencją „nawisu” na końcu 3'. Posiadały one dodaną sekwencję PAM oraz były komplementarne do plazmidu. Reakcję Gibsona z fragmentem R1EheIcutB oraz zlinearyzowanym plazmidem pBAC-lacZ wykonałam w stosunkach molowych 4,6:1 oraz 8,5:1. Podczas obliczeń wykorzystałam wzór B [Metody 5.2.8.2.2.]. Większy stosunek molowy możliwy był z powodu znacznie mniejszej liczby fragmentów używanych do reakcji, biorąc pod uwagę ograniczenie objętości dodawanych fragmentów DNA do 5 μ l. Wydajność transformacji po zakończonej reakcji Gibsona była znacznie wyższa w porównaniu do wcześniejszych prób. Wykonałam kolonijną PCR 11 białych kolonii (Rycina 24).



Ryc. 24. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheIcutB. 1-11 oznaczenie kolonii bakteryjnych; K – kontrola negatywna, wyjściowy plazmid pBAC-lacZ. pp – para starterów specyficznych do plazmidu; pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); M – marker masy cząsteczkowej.

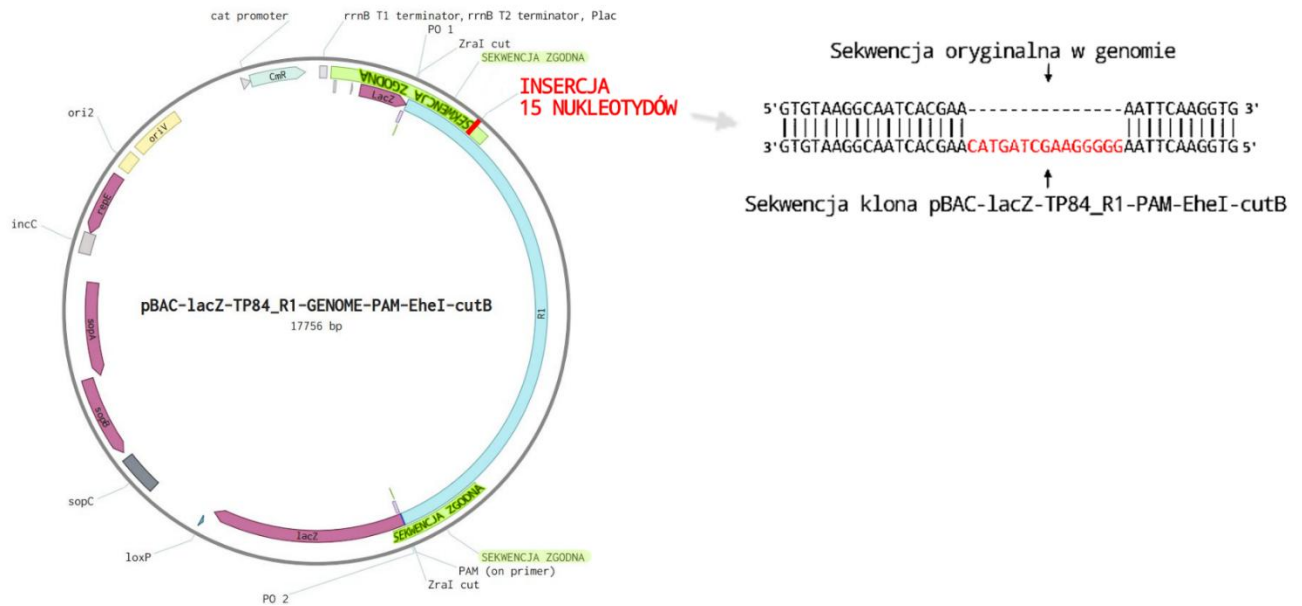
Podczas klonowania jednej wstawki, para starterów specyficznych do wektora powinna powielić fragment DNA o wielkości około 7000 pz w przypadku transformanta pozytywnego, oraz fragment o wielkości około 340 pz w przypadku transformanta negatywnego. Natomiast para starterów, z której jeden był specyficzny do wektora, a drugi do wstawki, powinna powielić fragment DNA o wielkości około 350 pz tylko w przypadku użycia jako matrycy transformanta pozytywnego. Na Rycinie 24, prążki obecne są w

przypadku obu par starterów. Kontrola negatywna wykazała wyniki negatywne, co świadczyło o tym, że startery były prawidłowe. Aby zweryfikować te wyniki, wyizolowałam plazmidy z sześciu sprawdzanych kolonii i powtórzyłam kolonijną PCR (Rycina 25).



Ryc. 25. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR plazmidów wyizolowanych z kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheIcutB. 1-6 oznaczenie kolonii bakteryjnych; K – kontrola negatywna, wyjściowy plazmid pBAC-lacZ. pp – para starterów specyficznych do plazmidu; pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R1), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

Nieprawidłowe wyniki kolonijnej PCR powtórzyły się. Podczas tej reakcji zastosowałam dodatkową parę starterów, z której jeden był specyficzny do wstawki, a drugi do wektora, ale w odwrotnej orientacji. Przy kontroli negatywnej pojawił się słaby prążek przy tej parze starterów. Aby określić, czy powtarzające się błędne wyniki były fałszywie negatywne czy fałszywie pozytywne, wysłałam jeden z wyizolowanych plazmidów do sekwencjonowania. Na Rycinie 26 zaznaczyłam kolorem zielonym, które sekwencje były sprawdzane podczas sekwencjonowania. Były to okolice miejsc insercji fragmentu genomu TP-84, czyli w kontekście wybranego rodzaju klonowania, miejsca strategicznie najważniejsze. Sekwencjonowanie wykonywano za pomocą starterów używanych do kolonijnej PCR. Otrzymane wyniki sekwencjonowania potwierdziły, że wysłany plazmid pBAC-lacZ posiadał wstawiony fragment R1EheIcutB, w prawidłowej orientacji. W obrębie fragmentu genomu bakteriofaga TP-84 stwierdzono insercję 15 nukleotydów, co mogło wynikać z naturalnej zmienności genetycznej bakteriofaga TP-84. Insercja ta nie była powodem fałszywie negatywnych wyników podczas używania pary starterów specyficznych do plazmidu w czasie kolonijnej PCR. Natomiast cały wstawiony fragment genomu TP-84 nie został zsekwencjonowany, nie można było więc wykluczyć innych różnic w sekwencji DNA w obrębie wstawki, co mogło skutkować w niespecyficznym przyłączeniu się starterów.



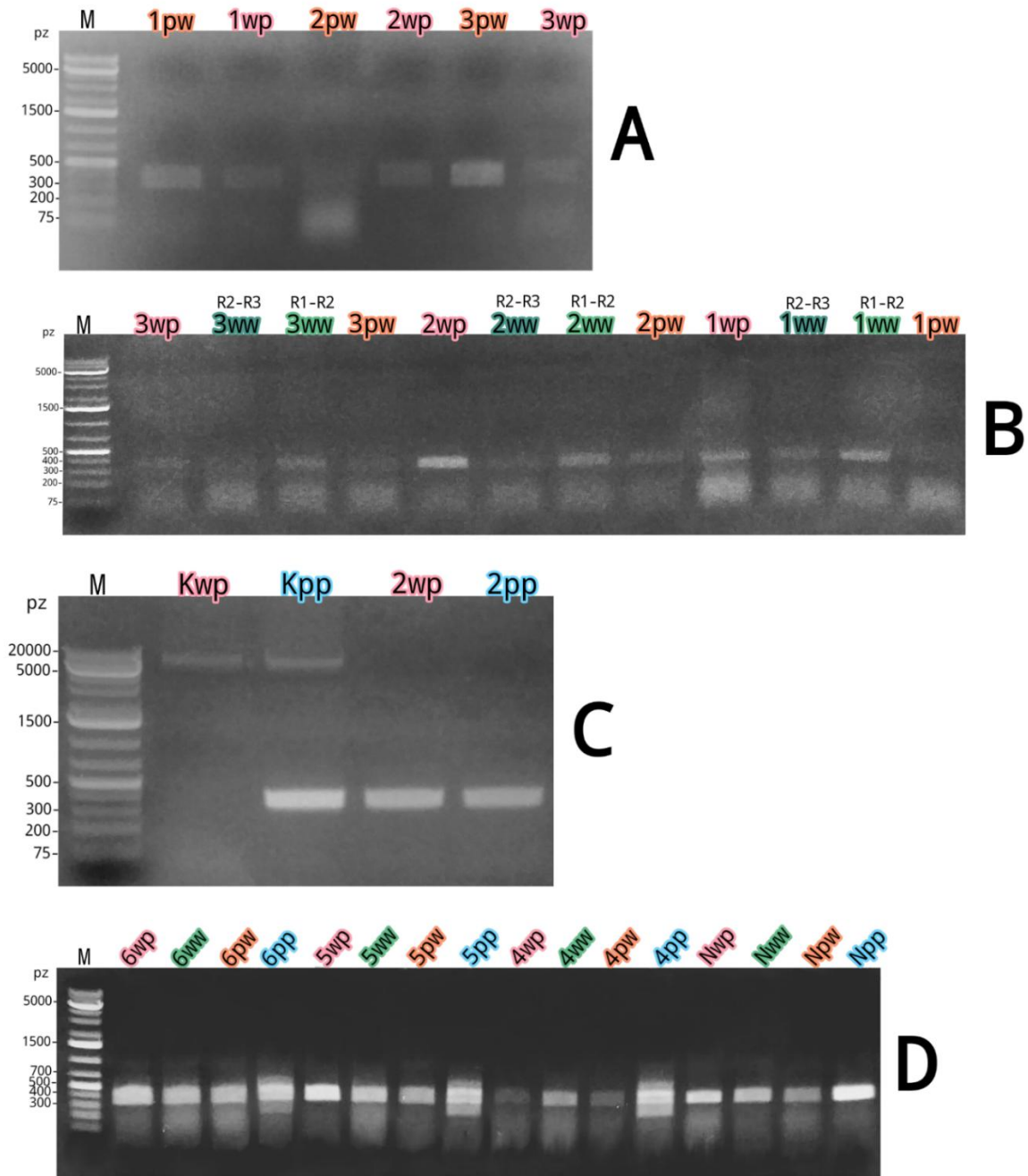
Ryc. 26. Schemat wyników sekwencjonowania klonu pBAC-lacZ-TP84_R1-PAM-EheI-cutB. Kolorem zielonym zaznaczone są sprawdzane sekwencje; kolorem czerwonym zaznaczone jest miejsce insercji 15 pz.

Mimo wszystko, wynik klonowania fragmentu genomu bakteriofaga TP-84 R1EheIcutB do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona był pozytywny, co pozwoliło potwierdzić prawidłowość zaprojektowanych sekwencji „nawisowych” oraz skuteczność wykonanej mieszaniny reakcyjnej.

6.3.3. Klonowanie trzech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ

Po sukcesie w sklonowaniu jednego fragmentu genomu TP-84, przystąpiłam do prób wstawienia trzech fragmentów genomu (R1EheI-R3cutA). Sugerując się poprzednimi wynikami, zastosowałam możliwie większe stosunki molowe wstawek do plazmidu, od 4:1 do 6:1. Fragmenty genomu były dodawane w stosunku równomolarnym. Po zakończeniu reakcji i transformacji, wykonywałam kolonijną PCR uzyskanych kolonii (Rycina 27), rezygnując początkowo z pary starterów specyficznych do plazmidu, które poprzednio skutkowały fałszywie negatywnymi wynikami. Na Rycinie 27A widoczna jest analiza elektroforetyczna przykładowych trzech białych kolonii po klonowaniu Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA. Słabe prążki na wysokości około 350 pz były widoczne w prawie wszystkich dołkach, czyli fragmenty DNA zostały powielone podczas kolonijnej PCR w

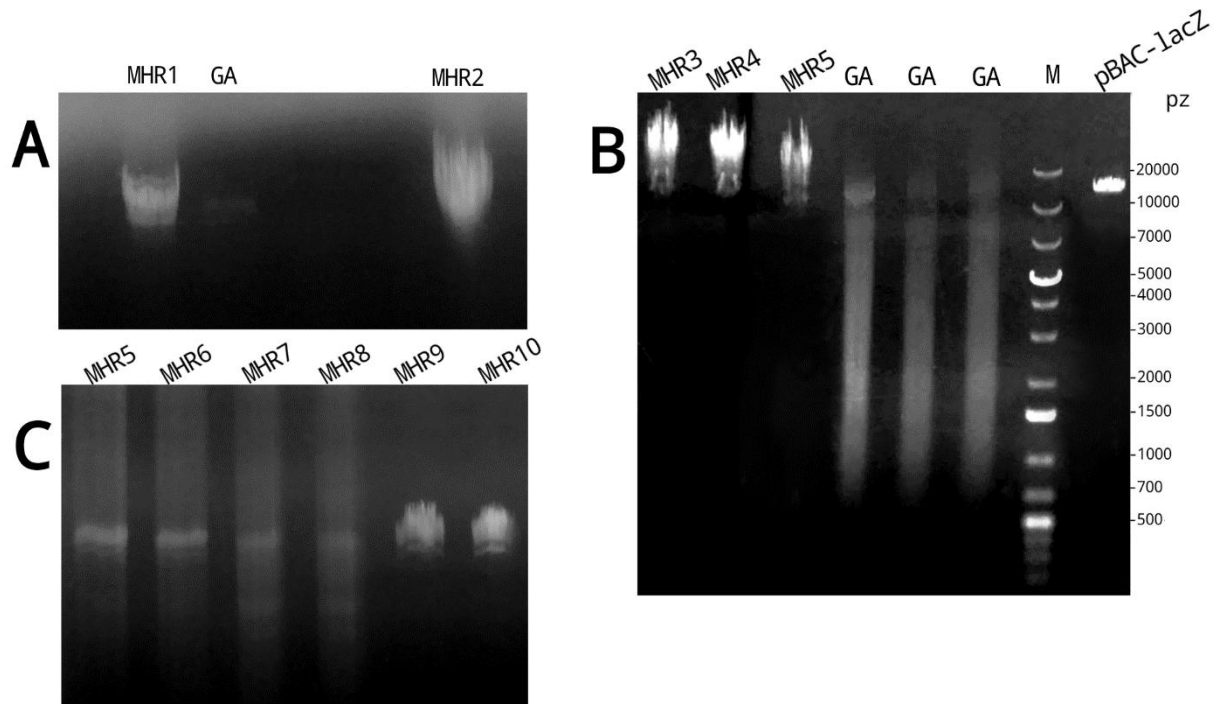
przypadku użycia jednego startera specyficznego do plazmidu oraz drugiego startera specyficznego do wstawki, w obu orientacjach. Aby zweryfikować, czy sprawdzane transformanty były pozytywne, powtórzyłam kolonijną PCR z wszystkimi dostępnymi parami starterów, oprócz pary specyficznego do plazmidu (Rycina 27B). Otrzymane podczas rozdziłu elektroforetycznego prążki na wysokości około 350 pz mogły wskazywać na pozytywne klony, jednak prążki te były bardzo mało intensywne. Wyizolowałam plazmid z jednej ze sprawdzanych kolonii i po raz kolejny wykonałam kolonijną PCR (wyizolowanego plazmidu 2 oraz plazmidu pBAC-lacZ) z parą starterów specyficznego do plazmidu oraz parą specyficzną do plazmidu i wstawki (Rycina 27C). Wyniki tej reakcji były analogiczne jak w przypadku klonowania z jedną wstawką, dlatego wysłałam plazmid 2 do sekwencjonowania. Plazmid okazał się pozbawiony wstawki, więc fałszywe wyniki kolonijnej PCR w tym przypadku nie wynikały z niespecyficznego przyłączania starterów do fragmentu genomu bakteriofaga TP-84. Nie wynikały również z zanieczyszczonych roztworów starterów, ponieważ wyjściowy plazmid pBAC-lacZ po kolonijnej PCR skutkował prawidłowo negatywnym wzorem prążków. Na Rycinie 27C przy dołkach dotyczących sprawdzania wyjściowego plazmidu pBAC-lacZ (Kwp, Kpp) widoczne są mało intensywne prążki na wysokości około 10000 pz. Są to prawdopodobnie liniowe formy plazmidu, które pozostały w mieszaninie reakcyjnej po kolonijnej PCR. Po sprawdzeniu za pomocą kolonijnej PCR kolejnych białych i niebieskich kolonii z płytek po reakcji Gibsona (Rycina 27B) i uzyskaniu w dalszym ciągu fałszywie pozytywnych wyników, zdecydowałam, że przed dalszymi próbami klonowania genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ, należało metodę tą zoptymalizować, zwłaszcza w kontekście analizy transformantów.



Ryc. 27. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA. **A.** Kolonijna PCR trzech kolonii po reakcji Gibsona, widoczne są mało intensywne prążki. **B.** Kolonijna PCR trzech kolonii (z panelu A) ze wszystkimi dostępnymi parami starterów. **C.** Kolonijna PCR plazmidu wyizolowanego z kolonii 2 z A, B oraz wyjściowego plazmidu pBAC-lacZ. **D.** Kolonijna PCR kolejnych trzech kolonii po reakcji Gibsona, oraz jednej niebieskiej. 1-6 - oznaczenie kolonii bakteryjnych; K – kontrola negatywna, wyjściowy plazmid pBAC-lacZ; N – kolonia niebieska; pp – para starterów specyficznych do plazmidu; ww – para starterów specyficznych do sąsiadujących wstawek (np. R1+R2); pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R3), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

6.3.4. Optymalizacja metody klonowania Gibsona

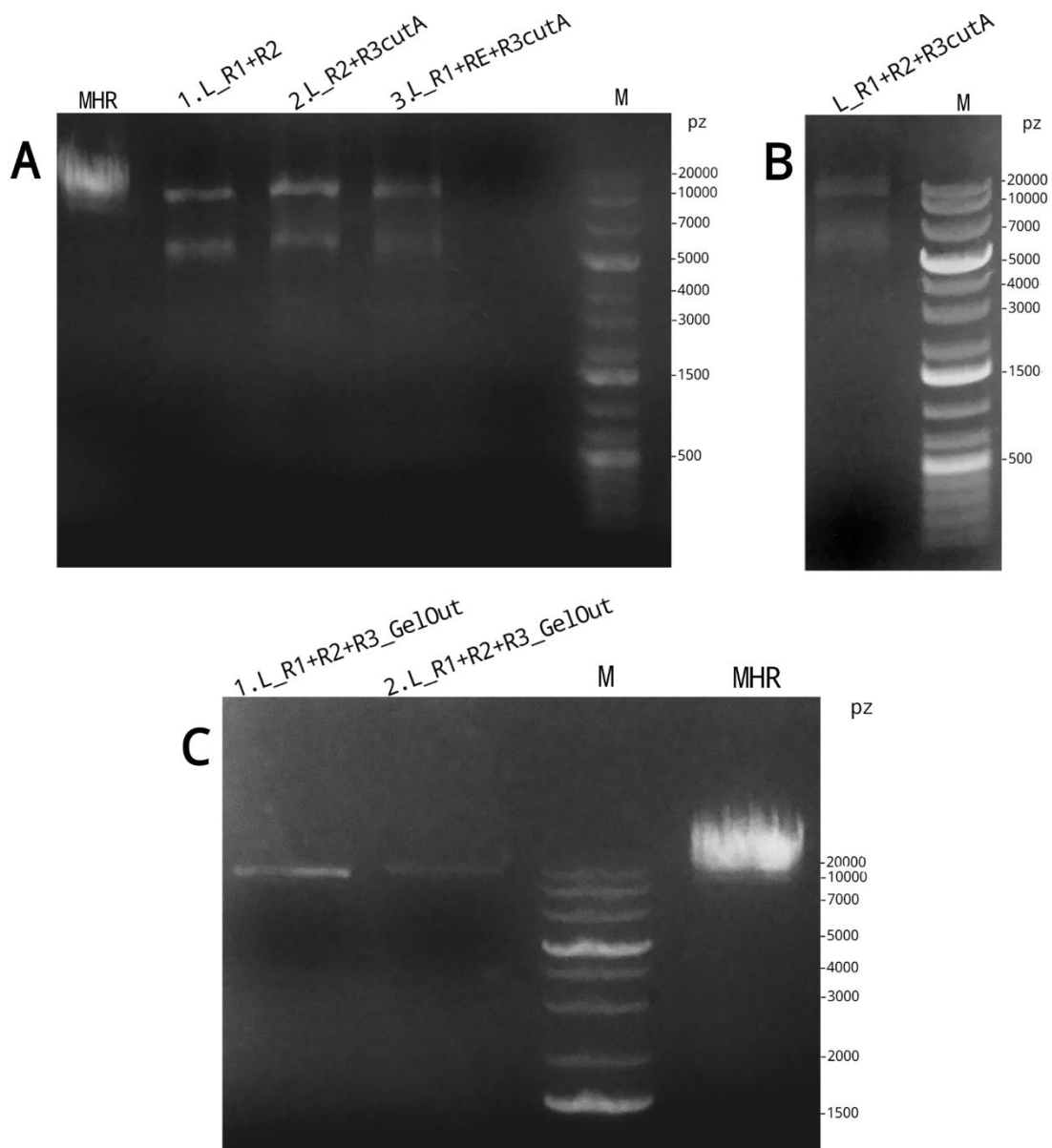
Pierwszą z alternatywnych metod analizy transformantów, jaką próbowałam wdrożyć było użycie podczas analizy elektroforetycznej markera masy cząsteczkowej wysokiej rozdzielczości GeneRuler High Range DNA Ladder (ThermoFisher, USA), umożliwiającego określenie wielkości dużych fragmentów DNA. Marker ten, według producenta, powinien umożliwić w 0,4-0,5% żelu agarozowym widoczny rozdział fragmentów DNA o wielkości od 10171 pz do 48502 pz. Przy uzyskaniu rozdziału tak dużych fragmentów DNA podczas elektroforezy agarozowej, byłaby możliwość oceny wielkości produktów obecnych w mieszaninie reakcyjnej bezpośrednio po reakcji Gibsona, lub ocenę wielkości plazmidów izolowanych z transformantów po reakcji Gibsona. Niestety, pomimo wielu prób i dokładnego naśladowania protokołu producenta, nie udało się rozdzielić markera masy cząsteczkowej (Rycina 28). Testowałam różne stężenia żelu agarozowego w zakresie od 0,4-0,9%, bufor TAE stężony 1 x oraz 0,5 x. Dodatkowo, użyłam również wersję markera masy cząsteczkowej w formie „ready-to-go”, czyli gotowego roztworu, aby sprawdzić, czy problemem nie jest wadliwa wersja drabinki (Rycina 28B). Okazało się, że obie wersje zachowują się tak samo podczas rozdziału elektroforetycznego. Ostatnią próbą „rozwinęcia” drabinki było potraktowanie roztworów markera masy cząsteczkowej temperaturą 95°C przez 5 minut (Rycina 28C). Po tym czasie połowę testowanych markerów pozostawiłam do renaturacji w temperaturze pokojowej, drugą połowę umieściłam natychmiast w lodzie, aby pozostały zdenaturowane. Denaturacja drabinek poprawiła lekko ich widoczność na żelu, ale widoczność prążków była znikoma, przez co zrezygnowałam z dalszych prób używania markera masy cząsteczkowej High Range.



Ryc. 28. Analiza elektroforetyczna mieszanin reakcyjnych po reakcji Gibsona. Rozdział markera masy molekularnej High-Range (od 10000 pz do 50000 pz). A. GA – mieszanina reakcyjna po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA; MHR1, MHR2 – markery masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów DNA. B. GA – mieszanina reakcyjna po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA; pBAC-lacZ – wektor plazmidowy zlinearyzowany enzymem *ZraI*; MHR3 – marker masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów DNA. MHR4, MHR5 - markery masy cząsteczkowej „ready-to-go” o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów DNA. M – marker masy cząsteczkowej. C. Próby rozwinięcia markera masy cząsteczkowej, poprzez traktowanie go temperaturą 95°C a następnie inkubację w lodzie lub temperaturze pokojowej. MHR5 - marker masy cząsteczkowej „ready-to-go” o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów, inkubacja w lodzie; MHR6 - marker masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów, inkubacja w lodzie; MHR7 - marker masy cząsteczkowej „ready-to-go” o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów, inkubacja w temperaturze pokojowej; MHR8 - marker masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów, inkubacja w temperaturze pokojowej. MHR9, MHR10 - markery masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów DNA, nietraktowane temperaturą 95°C.

Druga alternatywna metoda dotyczyła optymalizacji reakcji Gibsona z użyciem trzech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84. Polegała ona na pre-ligacji samych fragmentów genomu podczas reakcji Gibsona, a następnie użycia ich do właściwej reakcji Gibsona ze zlinearyzowanym plazmidem. Na Rycinie 29A widoczny jest rozdział elektroforetyczny wszystkich przetestowanych pre-ligacji, nałożonych na żel bezpośrednio po reakcji Gibsona. Teoretyczne wielkości produktów, jakie powinny powstać to: R1EheI+R2 13200 pz, R2+R3cutA 13169 pz, R1EheI+R2+R3cutA 19769 pz. Wielkości

otrzymanych prążków na żelu odpowiadały rozmiarom teoretycznym preligowanych fragmentów genomu, dlatego uznałam, że ligacja samych fragmentów zaszła poprawnie.

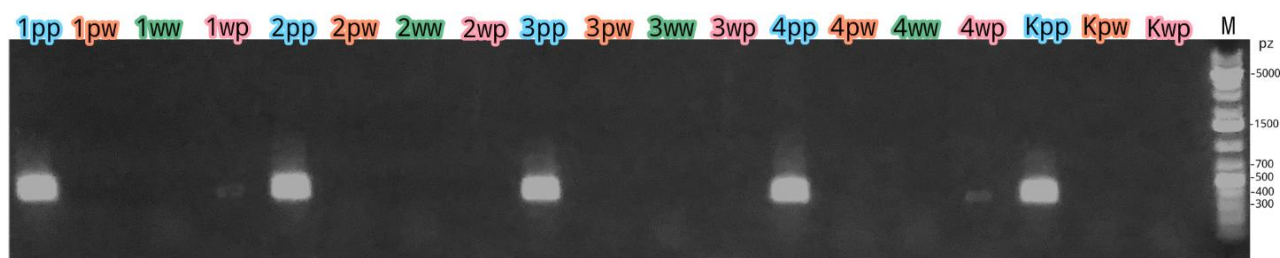


Ryc. 29. Analiza elektroforetyczna preligowanych fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 przed reakcją Gibsona. A. 1-3 - preligowane fragmenty R1EheI oraz R2. B. Preligowany fragment R1EheI+R2+R3cutA. C. Preligowany fragment R1EheI+R2+R3cutA z panelu B, wycięty z żelu i ponownie rozdzielony elektroforetycznie. M – marker masy cząsteczkowej; MHR - marker masy cząsteczkowej o dużej rozdzielczości dla dużych fragmentów DNA.

Prążki widoczne w okolicach 5000 pz to prawdopodobnie niezligowane fragmenty, co wskazywało na to, że ligacja nie zaszła ze 100% wydajnością. Z tego powodu, przed użyciem preligowanych fragmentów genomu TP-84 do reakcji Gibsona, powtórzyłam preligację R1EheI+R2+R3cutA (Rycina 29B) i wycięłam z żelu oraz oczyściłam większy

prążek (widoczny powyżej 20000 pz). Rozdział elektroforetyczny oczyszczonego prążka potwierdził otrzymanie fragmentu DNA o jednym rozmiarze, około 20000 pz, bez żadnych dodatkowych prążków, stanowiących ewentualne tło podczas reakcji Gibsona (Rycina 29C). Otrzymany, preligowany fragment DNA R1EheI+R2+R3cutA, użyłam jako pojedynczą wstawkę w kolejnych reakcjach Gibsona. Stosunki molowe preligatu do plazmidu, jakie przetestowałam, to 1:1, 3:1 oraz 4,5:1. Po przetestowaniu podczas kolonijnej PCR około 50 kolonii bakteryjnych, w tym wysłaniu wyizolowanego plazmidu do sekwencjonowania, nie udało mi się wyszukać ani jednego klonu pozytywnego. Dodatkowo, testowałam różne czasy trawienia i różne ilości enzymu *ZraI* i plazmidu pBAC-lacZ, aby uzyskać jak najwyższe stężenie i czystość linearyzowanego plazmidu. Ciągłym problemem były również niejednoznaczne wyniki podczas testowania transformantów kolonijną PCR.

Ostatnią próbą optymalizacji metody klonowania Gibsona w celu uzyskania klonów pozytywnych pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA lub pBAC-lacZ+R1EheI-R8 było dodanie do mieszaniny reakcyjnej Gibsona białka ET SSB. Z publikacji Rabe i Cepko (2020) wynika, że dodanie białka ET SSB, które wiąże się do jednoniciowego DNA, istotnie zwiększa precyzyjność i efektywność klonowania metodą Gibsona, zwłaszcza w przypadku składania wielu fragmentów DNA jednocześnie, lub gdy wydajność reakcji jest bardzo niska. [45].



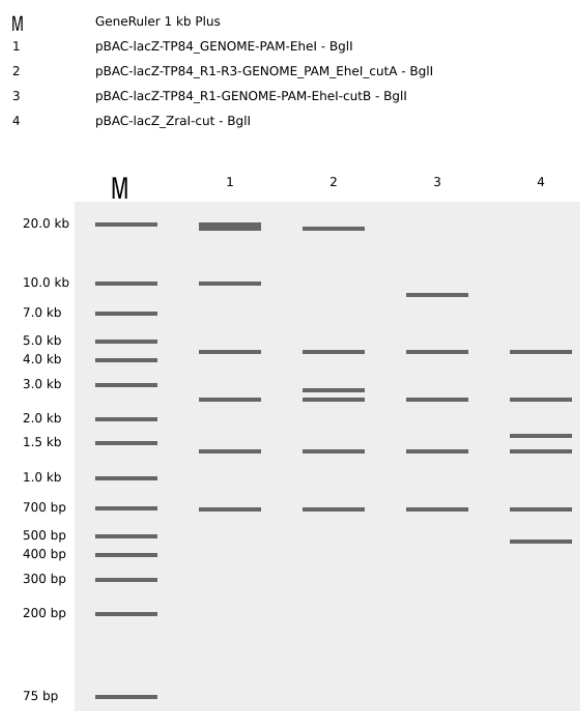
Ryc. 30. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA z dodatkiem białka SSB. 1-4 oznaczenie kolonii bakteryjnych; K – kontrola negatywna, wyjściowy plazmid pBAC-lacZ; pp – para starterów specyficznych do plazmidu; pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R3), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; ww – para starterów specyficznych do sąsiadujących wstawek (np. R1+R2); M – marker masy cząsteczkowej.

Białko ET SSB dodałam do mieszaniny reakcyjnej Gibsona bezpośrednio przed reakcją, w ilości 0,125 μ l na 15 μ l mieszaniny reakcyjnej, tak jak w publikacji źródłowej. Wydajność transformacji była podobna jak we wcześniejszych próbach, ale podczas analizy elektroforetycznej produktów kolonijnej PCR okazało się, że wyniki są prawidłowo

negatywne dla testowanych kolonii. Jednak nie udało mi się znaleźć pozytywnych transformantów (Rycina 30).

Ponowne próby klonowania metodą Gibsona z dodatkiem białka ET SSB obejmowały dodatek większej ilości białka, różne stosunki molowe wektora do wstawek, dodawanie etapowe fragmentów DNA podczas reakcji Gibsona (czyli na przykład dodanie do mieszaniny reakcyjnej samych fragmentów genomu bakteriofaga TP-85, i po inkubacji w 50°C przez 15 minut, dodatek zlinearyzowanego plazmidu i inkubacja kolejnych 60 minut). Wszystkie te próby skutkowały wykonywaniem kolonijnej PCR kilkunastu-kilkudziesięciu kolonii bakteryjnych, w poszukiwaniu pozytywnych transformantów. W trakcie wyżej opisanych prób wrócił problem fałszywie negatywnych/pozytywnych wyników po kolonijnej PCR.

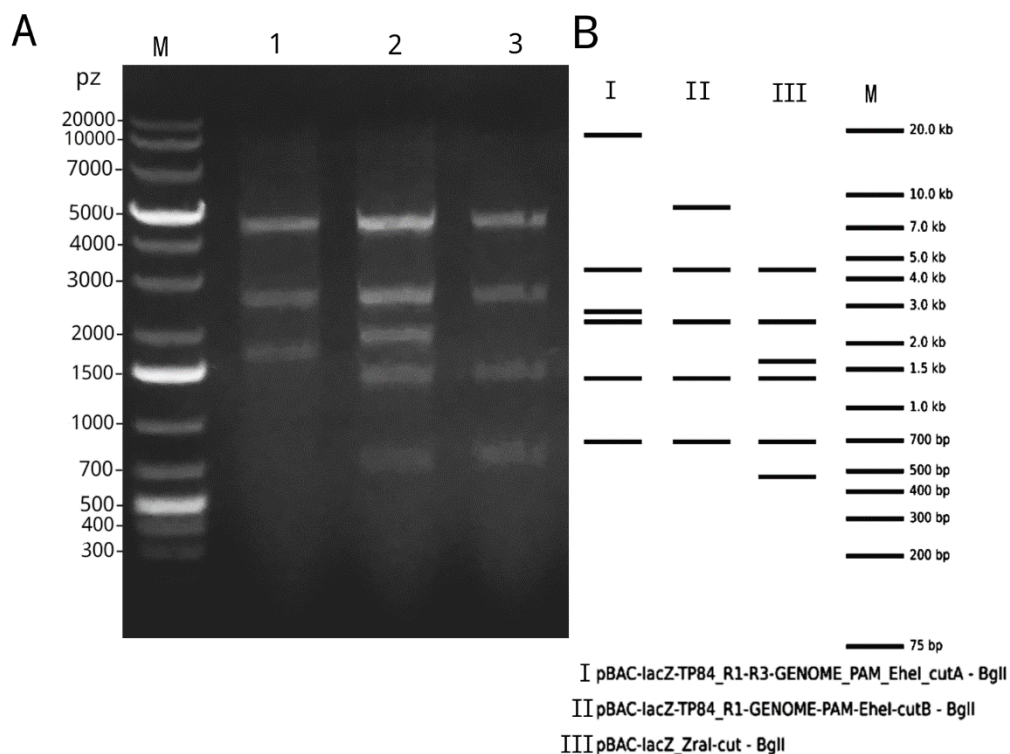
Wprowadziłam więc drugą alternatywną metodę analizy transformantów, czyli analizę restrykcyjną izolowanych plazmidów. Do mapowania restrykcyjnego został wybrany enzym restrykcyjny *Bgl*I, ponieważ *in silico* wzór restrykcyjny był różny dla każdego z wariantów klonowania fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Gibsona, jak też dla wyjściowego plazmidu pBAC-lacZ.



Ryc. 31. Schemat rozdziału *in silico* fragmentów powstałych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym *Bgl*I: pBAC-lacZ-Z+TP84_R1EheI-R8 (1), pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA (2), pBAC-lacZ+R1cutB (3), pBAC-lacZ_ZraI (4). M – marker masy cząsteczkowej.

Teoretycznie analiza restrykcyjna powinna umożliwić skuteczną weryfikację transformantów, jednak kosztem wydłużenia całego procesu o izolację plazmidów z kolonii bakteryjnych (Rycina 31). Wydłużenie procesu sprawdzania transformantów było znaczne, ponieważ pBAC-lacZ jest plazmidem indukowalnym, dlatego niezbędna była 12-15 godzinna indukcja hodowli nocnych L-arabinozą, żeby plazmid został powielony i możliwa byłaby jego dalsza weryfikacja.

Enzymem *Bgl*I wykonałam analizę restrykcyjną trzech plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA z dodatkiem białka ET SSB (Rycina 32).



Ryc. 32. Analiza elektroforetyczna wielkości fragmentów restrykcyjnych plazmidów pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gibsona z dodatkiem białka ET SSB. A. Wzór restrykcyjny trzech różnych plazmidów (1-3) po trawieniu enzymem *Bgl*I. B. Schemat *in silico* wzorów restrykcyjnych po trawieniu enzymem *Bgl*I plazmidu z wstawionymi fragmentami R1EheI-R3cutA (I), z jednym fragmentem R1EheI (II), wyjściowego plazmidu (III). M – marker masy cząsteczkowej.

Tabela 21. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem *Bgl*I plazmidów pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gibsona z dodatkiem białka ET SSB. 1-3: fragmenty restrykcyjne obserwowanych plazmidów (Rycina 30); I: rozkład fragmentów *in silico* plazmidu z wstawionymi R1EheI-R3cutA; II: rozkład fragmentów *in silico* plazmidu z wstawionym R1EheI; III – rozkład fragmentów *in silico* wyjściowego plazmidu. Prz. – wielkość przewidywana, Obs. – wielkość obserwowana.

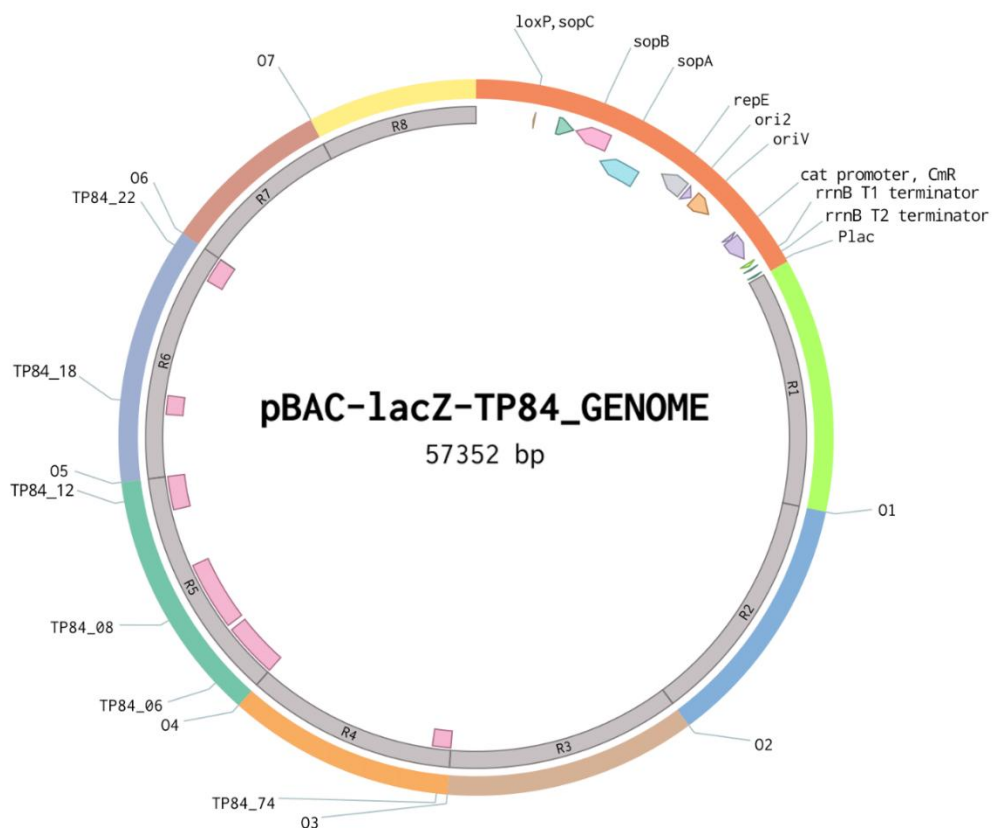
Prz. I	Wielkość fragmentu (pz) (po trawieniu <i>Bgl</i> I)				
	Prz. II	Prz. III	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3
19062	-	-	-	-	-
-	8727	-	-	-	-
4449	4449	4449	~4500	~4500	~4500
2834	-	-	-	-	-
2520	2520	2520	>2500	>2500	>2500
-	-	1652	>1500	~2000	-
1368	1368	1368	-	~1400	~1400
692	692	692	-	~700	~700
-	-	469	-	-	-

Pomimo, że rozkłady wielkości fragmentów restrykcyjnych nie zgadzały się z tymi przewidywanymi *in silico* (Tabela 21), brak dużego prążka w okolicach 10000-20000 pz powinien wskazywać, że badane plazmidy nie zawierały wstawek.

Podsumowując, stosując metodę Gibsona udało się wstawić fragment genomu bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 pz do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymem restrykcyjnym *Zra*I. Nie udało się natomiast wstawić fragmentu o wielkości 19072 pz ani całego genomu bakteriofaga TP-84. Dodatkowo, wprowadziłam alternatywną metodę sprawdzania transformantów, czyli analizę restrykcyjną za pomocą enzymu *Bgl*I, którą stosowałam również w następnej metodzie klonowania, czyli Golden Gate. Powodów niepowodzenia mogło być wiele, być może sam wektor BAC lub produkty genów TP-84 były toksyczne dla komórek *E. coli*. Inną przyczyną mogła być niepełna linearyzacja lub samoczynna recykularyzacja wektora pBAC-lacZ, co wraz z możliwą niską wydajnością klonowania z uwagi na duże rozmiary poszczególnych wstawek, skutkowało brakiem pozytywnych transformantów na płytkach.

6.4. Klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do plazmidu pBAC-lacZ metodą Golden Gate

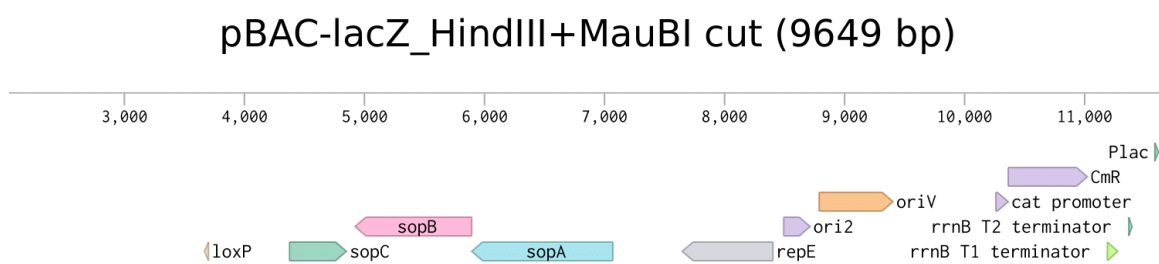
Z uwagi na brak powodzeń z klonowaniem Gibsona, zdecydowałam się na dalsze próby wstawienia genomu faga TP-84 do wektora pBAC-lacZ, ale za pomocą klonowania Golden Gate. Klonowanie Golden Gate jest metodą opierającą się na tradycyjnym schemacie trawienia restrykcyjnego oraz ligacji, ale z zastosowaniem restryktaz typu IIs [16]. W tej metodzie klonowania genom bakteriofaga TP-84 również był podzielony na 8 części (R1-R8), a wektorem docelowym był plazmid pBAC-lacZ. Plazmid był linearyzowany enzymami *Hind*III oraz *Mau*BI, aby zminimalizować możliwość recykularyzacji plazmidu.



Ryc. 33. Zaprojektowane *in silico* klonowanie metodą Golden Gate genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ. Cały genom bakteriofaga TP-84 podzielony na 8 fragmentów (R1-R8) wstawiony do plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymami *Hind*III i *Mau*BI (57352 pz). CmR – gen oporności na chloramfenikol; ori- miejsce inicjacji replikacji; Plac – promotor, lacZ α – gen kodujący enzym β -galaktozydazę; repE – gen kodujący białko inicjacji replikacji; sopA, sopB, sopC – geny związane z czynnikiem płciowym F; loxP – sekwencja rozpoznawana w systemie Cre-lox; O1-O7 – miejsca lepkich końców między fragmentami genomu TP-84; Rycinę wykonałam korzystając z programu Benchling.

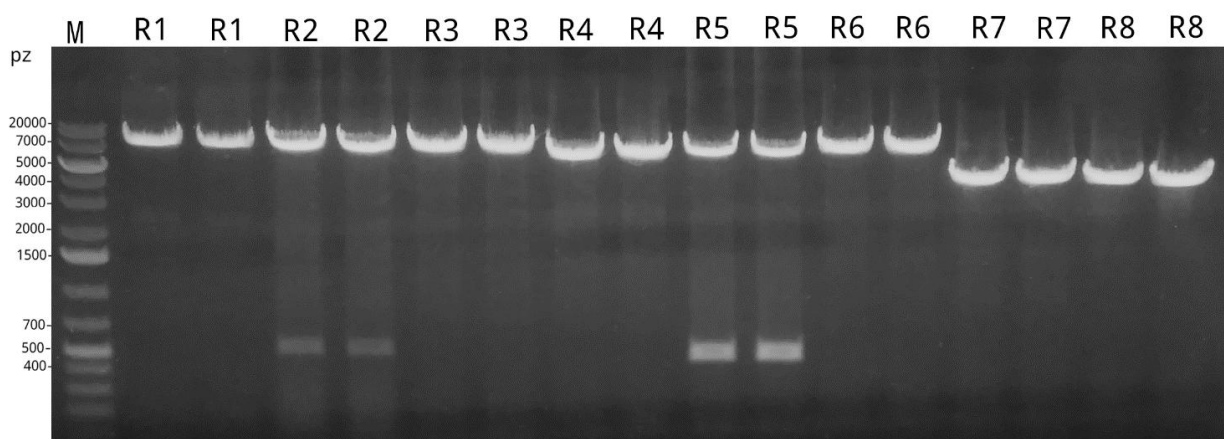
Fragmenty genomu TP-84, powielone podczas PCR typu Touch-Down z użyciem specjalnie zaprojektowanych starterów (Tabela 3), posiadały na końcu 5' miejsca rozpoznawane przez enzym restrykcyjny klasy IIs *Eco31I* (będącym izoschizomerem enzymu *BsaI*). Po powieleniu, fragmenty te były trawione enzymem, tworząc „lepkie końce”. Ponieważ enzymy restrykcyjne klasy IIs tną DNA poza rozpoznawanym miejscem [Metody 5.2.8.3.], to możliwe było zaprojektowanie i dodanie za pomocą odpowiednich starterów dowolnej sekwencji, która miała utworzyć „lepkie końce”, dzięki czemu klonowanie metodą Golden Gate było bez-bliznowe, a „lepkie końce” sąsiadujących fragmentów były komplementarne do siebie. Po przeprowadzeniu *in silico* klonowania Golden Gate, otrzymany konstrukt pBAC-lacZ-TP84_GENOME powinien mieć rozmiar 57352 pz (Rycina 33).

Plazmid pBAC-lacZ po zlinearyzowaniu za pomocą dwóch różnych enzymów restrykcyjnych *MauBI* oraz *HindIII*, używany do klonowania metoda golden Gate, był wielkości 9649 pz (Rycina 34).



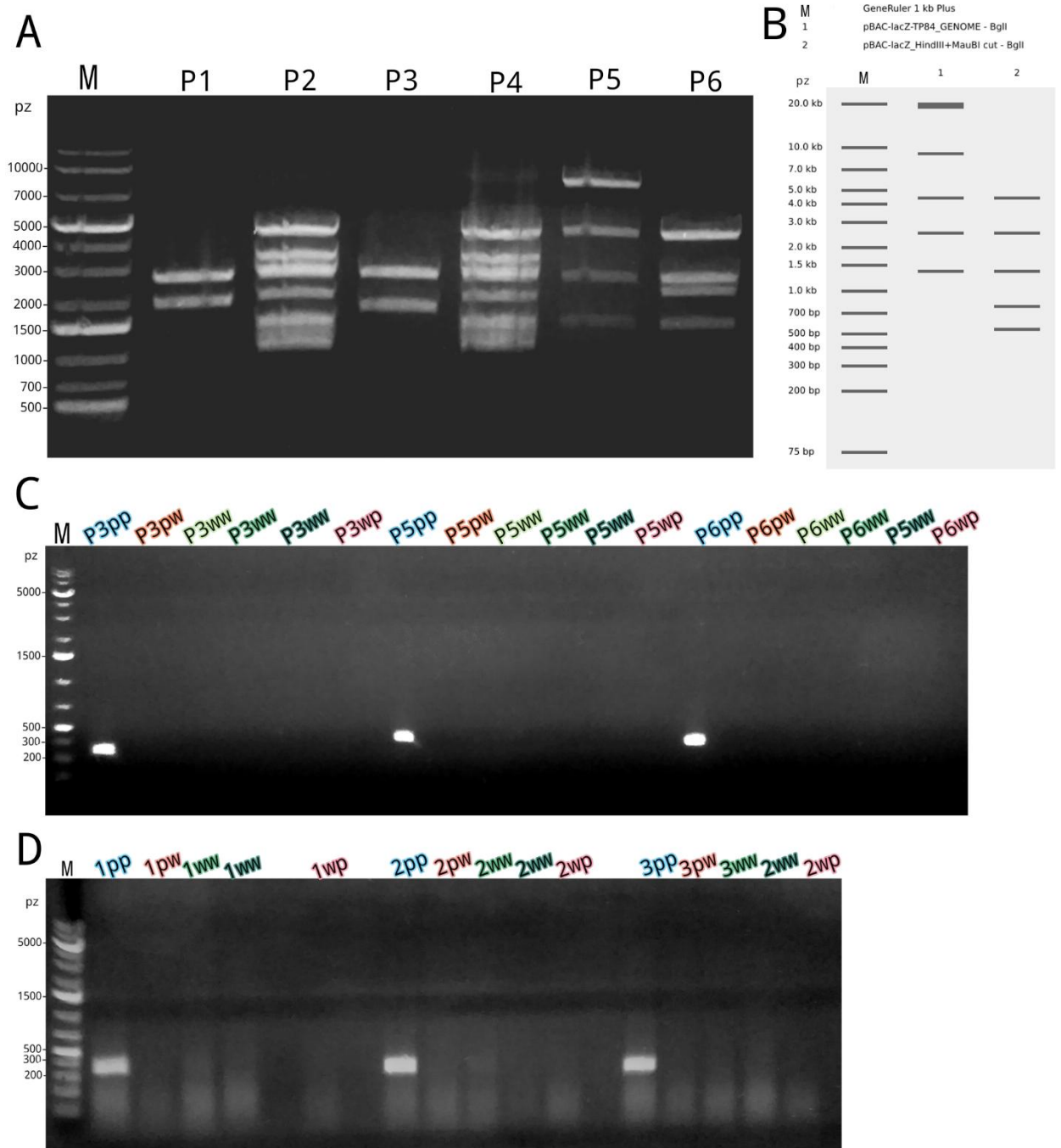
Ryc. 34. Schemat plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymami *MauBI* i *HindIII*. CmR – gen oporności na chloramfenikol; ori- miejsce inicjacji replikacji; Plac – promotor genu *lacZ α* , kodującego enzym β -galaktozydazę; repE – gen kodujący białko inicjacji replikacji; sopA, sopB, sopC – geny związane z czynnikiem płciowym F; loxP – sekwencja rozpoznawana w systemie Cre-lox; Rycinę wykonałam korzystając z programu Benchling.

Powielone podczas PCR typu Touch-Down fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 były następującej wielkości: R1 6632 pz, R2 6635 pz, R3 6586 pz, R4 5921 pz, R5 6587 pz, R6 6721 pz, R7 4432 pz, R8 4418 pz. Produkty PCR rozdzielone na żelu agarozowym odpowiadały wielkością prawidłowo powielonym fragmentom genomu (Rycina 35).



Ryc. 35. Analiza elektroforetyczna ośmiu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R8) w dwóch powtórzeniach, używanych, jako wstawki podczas klonowania metodą Golden Gate. M – marker masy cząsteczkowej.

W przypadku fragmentu R2 oraz R5 powstały krótkie, około 500 nukleotydowe, produkty PCR, które mogły świadczyć na przykład o zanieczyszczeniu próbek. Na żel nakładałam produkty bezpośrednio po PCR, po potwierdzeniu obecności odpowiedniego produktu, mieszaniny reakcyjne były oczyszczane zestawem Gen and PCR Clean-Up (Takara Bio, Japonia), więc prążki te nie powinny stanowić problemu w dalszych etapach klonowania. Podczas klonowania metodą Golden Gate, według protokołu [Metody 5.2.8.3.3.] używałam stężeń równomolarnych zarówno plazmidu i fragmentów genomu bakteriofaga, oraz stosunku molowego plazmidu do insertów 1:3. Wydajność reakcji była dosyć niska, pomimo obecności dużej liczby kolonii na płytkach po transformacji, łącznie białych kolonii było tylko 6. Ze wszystkich sześciu wyizolowałam plazmidy i wykonałam trawienie restrykcyjne enzymem *Bgl*I (Rycina 36A). Warto zaznaczyć, że mapa restrykcyjna stworzona *in silico* (Rycina 36B) była nieznacznie inna niż w przypadku klonowania metoda Gibsona. W tym przypadku pozytywny klon powinien wykazać dwa duże fragmenty restrykcyjne na wysokości 20000 pz i 10000 pz, których nie ma podczas trawienia wyjściowego plazmidu pBAC-lacZ.



Ryc. 36. Analiza elektroforetyczna plazmidów i fragmentów DNA po klonowaniu metodą Golden Gate. A. Wzór restrykcyjny wyizolowanych plazmidów (P1-P6) po trawieniu enzymem *Bgl*I. **B.** Schemat *in silico* wzorów restrykcyjnych po trawieniu enzymem *Bgl*I plazmidu z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 (1) oraz wyjściowego plazmidu (2). **C.** Kolonijna PCR plazmidów P3, P5, P6 z sekcji A. **D.** Kolonijna PCR z kolonii (1-3) po klonowaniu Golden Gate. pp – para starterów specyficznych do plazmidu; ww – para starterów specyficznych do sąsiadujących wstawek (R1+R2, R3+R4, R5+R6); pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R8), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

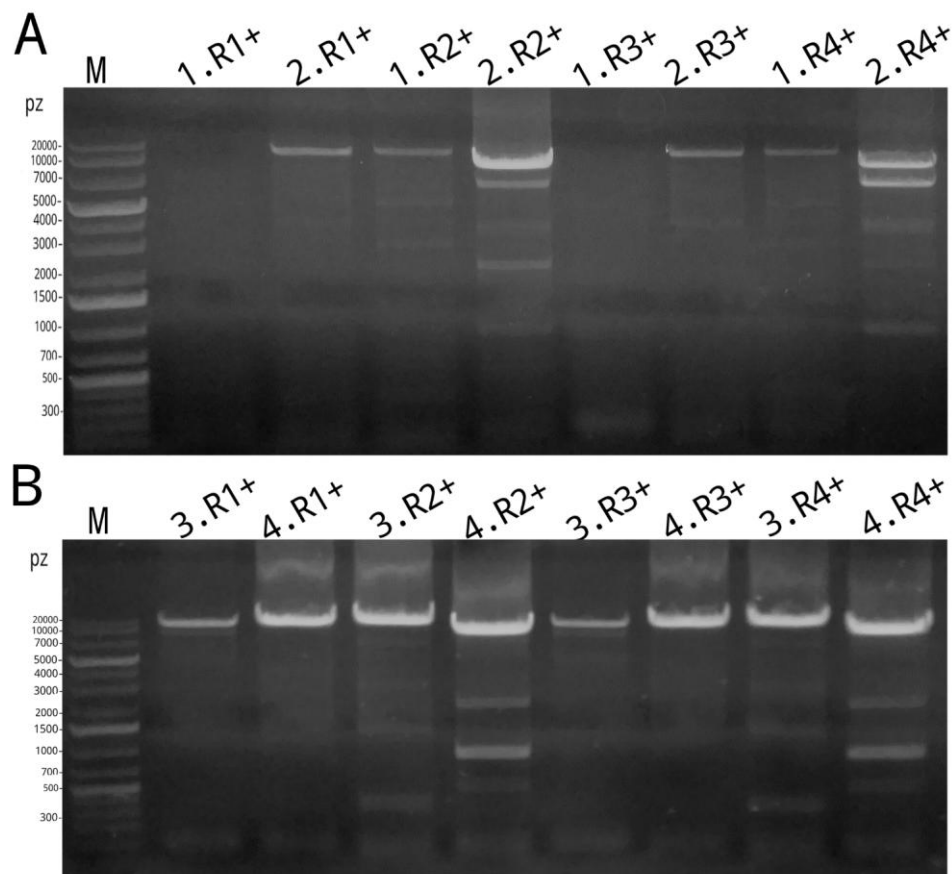
Tabela 22. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem *BglI* plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Golden Gate. P1-P6: fragmenty restrykcyjne obserwowanych plazmidów (Rycina 34); 1: rozkład fragmentów *in silico* plazmidu z wstawionym całym genomem bakteriofaga TP-84; 2: rozkład fragmentów *in silico* wyjściowego plazmidu. Prz. – wielkość przewidywana, Obs. – wielkość obserwowana.

		Wielkość fragmentu (pz) (po trawieniu <i>BglI</i>)					
Prz. 1	Prz. 2	Obs. P1	Obs. P2	Obs. P3	Obs. P4	Obs. P5	Obs. P6
20857	-	-	-	-	-	-	-
19130	-	-	-	-	-	-	-
9028	-	-	-	-	~10000	10000	-
-	-	-	5000	-	5000	5000	5000
4449	4449	-	~4000	-	~4000	-	-
-	-	~3000	~3000	3000	~3000	3000	<3000
2520	2520	-	~2500	-	~2500	-	~2500
-	-	~2000	~1500	~2000	~1500	1500	1500
1368	1368	-	>1000	-	>1000	-	-
-	775	-	-	-	-	-	-
-	537	-	-	-	-	-	-

Analiza restrykcyjna plazmidów 2 i 4 (Rycina 36A, Tabela 22) wykazała, że były to najprawdopodobniej wyjściowe, niezlinearyzowane plazmidy pBAC-lacZ. Mapy restrykcyjne dla plazmidów 1, 3, 5 i 6 nie były prawidłowe ani dla klonu pozytywnego ani dla wyjściowego plazmidu, zwłaszcza, że w przypadku plazmidu 5 widoczny był prążek o wielkości około 10000 pz. Wykonałam więc kolonijną PCR wyizolowanych plazmidów z różnymi parami starterów (Rycina 36C). Obecność krótkich fragmentów DNA o wielkości około 250 pz tylko przy parze starterów specyficznych dla plazmidu, świadczyła o tym, że sprawdzane plazmidy były negatywne. Aby upewnić się, czy plazmid numer 5 jest wyjściową formą, wysłałam go do sekwencjonowania, które potwierdziło, że nie zawierał on wstawki. Wykonałam kolejne reakcje klonowania Golden Gate, zmieniając warunki reakcji, wydłużając inkubację mieszaniny reakcyjnej w 16°C oraz w 37°C nawet do 16 godzin. Wydajność reakcji dalej pozostawała na bardzo niskim poziomie, zwłaszcza pod względem liczby białych kolonii uzyskiwanych po transformacji. Łącznie otrzymałam kolejne trzy białe kolonie, które sprawdziłam za pomocą kolonijnej PCR (Rycina 36D) i okazały się one negatywne.

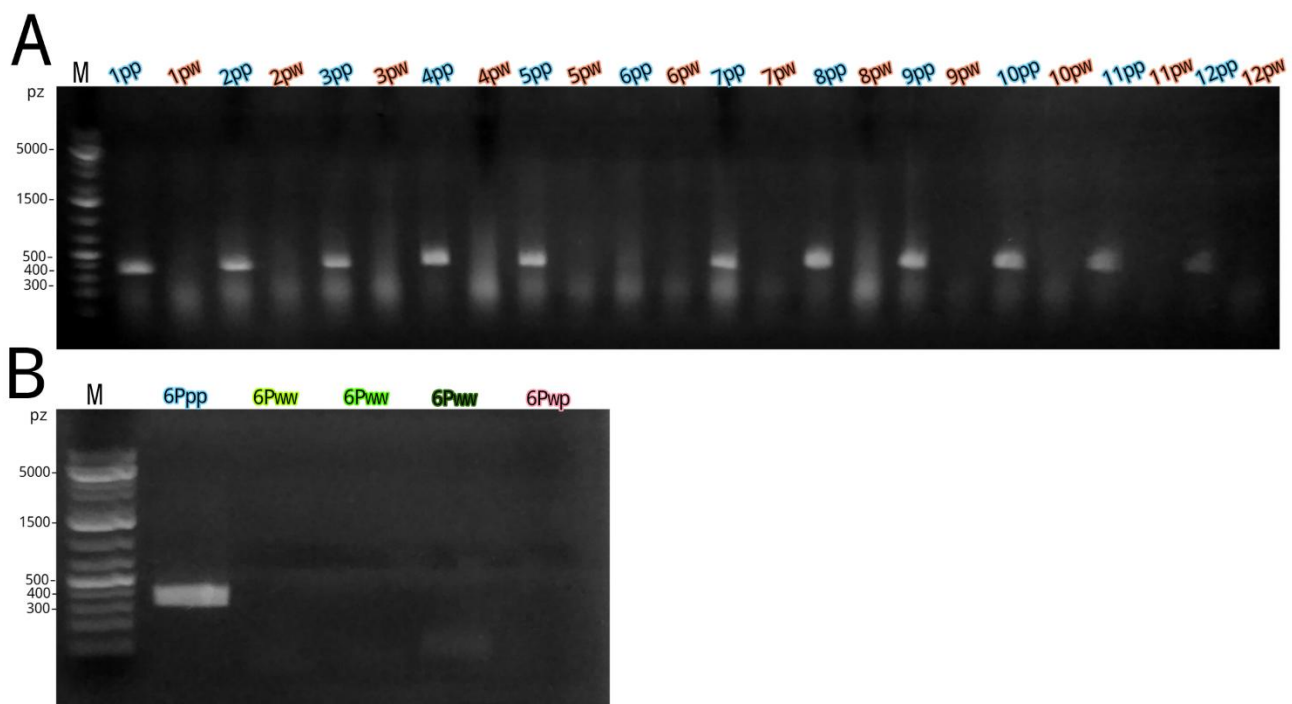
6.4.1. Optymalizacja metody klonowania Golden Gate

Pierwszym podjętym krokiem w celu optymalizacji metody klonowania Golden Gate i uzyskania pozytywnych klonów pBAC-lacZ_TP84R1-R8, była redukcja liczby fragmentów używanych podczas klonowania. Powieliłam cztery większe fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 podczas PCR typu Touch-Down używając co drugich starterów, czyli na przykład do powielenia fragmentu R1+ użyłam startera „forward” dla R1 oraz startera „reverse” dla R2. Tym sposobem powieliłam cztery fragmenty genomu bakteriofaga TP-84 o następujących wielkościach: R1+ 13203 pz, R2+ 12443 pz, R3+ 13244 pz, R4+ 8785 pz. Podczas pierwszej PCR powielone fragmenty DNA charakteryzowały się niskim stężeniem (Rycina 37A). Dodatkowo, widocznych było wiele dodatkowych prążków poniżej właściwie powielonych insertów. Dlatego powtórzyłam PCR typu Touch-Down (Rycina 37B), otrzymując wyższe stężenia fragmentów, które dodatkowo oczyściłam z żelu.



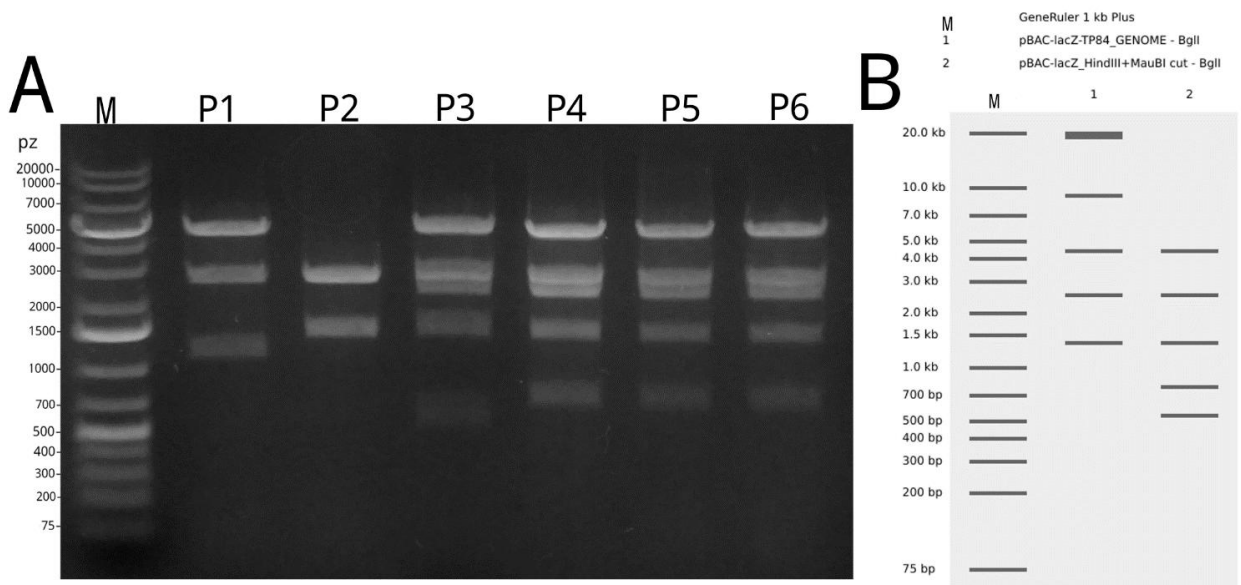
Ryc. 37. Analiza elektroforetyczna czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1+ - R4+) powstałych po ligacji fragmentów R1-R8. A. Rozdzielone fragmenty: R1+ (ligacja R1+R2), R2+ (ligacja R3+R4), R3+ (ligacja R5+R6), R4+ (ligacja R7+R8). B. Powtórzona ligacja fragmentów R1+ - R4+, w celu izolacji ich z żelu agarozowego. M – marker masy cząsteczkowej.

Przystąpiłam do klonowania Golden Gate z powielonymi czterema fragmentami genomu TP-84 oraz powtórnie wyizolowanym i zlinearyzowanym plazmidem pBAC-lacZ. Testowałam różne profile temperaturowo-czasowe reakcji Golden Gate, w tym 37°C, 5 min i 16°C 5 min x 99, 37°C, 1 min i 16°C 1 min x 30, 37°C, 1,5 min i 16°C 3 min x 50. W dalszym ciągu po transformacji na płytkach obecne były przede wszystkim kolonie niebieskie i pojedyncze białe. Wszystkie białe kolonie sprawdzałam podczas kolonijnej PCR używając par starterów specyficznych dla plazmidu oraz pary starterów, która przyłączała się w okolicach miejsca „styku” plazmidu oraz fragmentu genomu TP-84 (Rycina 38). Wszystkie wyniki były negatywne, z wyjątkiem jednego transformanta (6 na Rycinie 38A), w przypadku którego nie było widocznego prążka przy starterach specyficznych do plazmidu. Wyizolowałam z tej kolonii bakteryjnej plazmid oraz powtórzyłam kolonijną PCR, która wykazała wyniki jednoznacznie negatywne, czyli obecność krótkiego fragmentu DNA tylko przy parze starterów specyficznych dla plazmidu (Rycina 38B).



Ryc. 38. Analiza elektroforetyczna fragmentów DNA i plazmidu po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+. A. Kolonijna PCR z kolonii (1-12) po klonowaniu Golden Gate. B. Kolonijna PCR plazmidu 6P wyizolowanego z kolonii 6 z sekcji A. pp – para starterów specyficznych do plazmidu; ww – para starterów specyficznych do sąsiadujących wstawek (R1+R2, R3+R4, R5+R6); pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R8), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

Kolejne uzyskane białe kolonie po klonowaniu metodą Golden Gate pBAC-lacZ+R1+-R4+, sprawdziłam za pomocą analizy restrykcyjnej przy użyciu enzymu *Bgl*I (Rycina 39). Wzór trawienia plazmidów P3-P6 wskazywał na to, że były to wyjściowe, ale prawidłowo zlinearyzowane plazmidy pBAC-lacZ. Plazmidy P1 oraz P2 po trawieniu restrykcyjnym również nie wykazywały wzorów trawienia charakterystycznych dla klonu pozytywnego (Tabela 23). Z uwagi na kontynuację negatywnych wyników, podjęłam próbę dalszej redukcji liczby fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 używanych podczas klonowania Golden Gate, poprzez ligację wcześniej powielonych czterech dużych fragmentów. Używając ligazy T4 DNA oraz najwyższych stężeń molowych poszczególnych fragmentów (względem dopuszczalnej objętość mieszaniny reakcyjnej), połączyłam ze sobą fragmenty R1+ oraz R2+ (które powinny skutkować powstaniem fragmentu R1++ o wielkości 25646 pz) i fragmenty R3+ oraz R4+ (które powinny skutkować powstaniem fragmentu R2++ o wielkości 22029 pz).

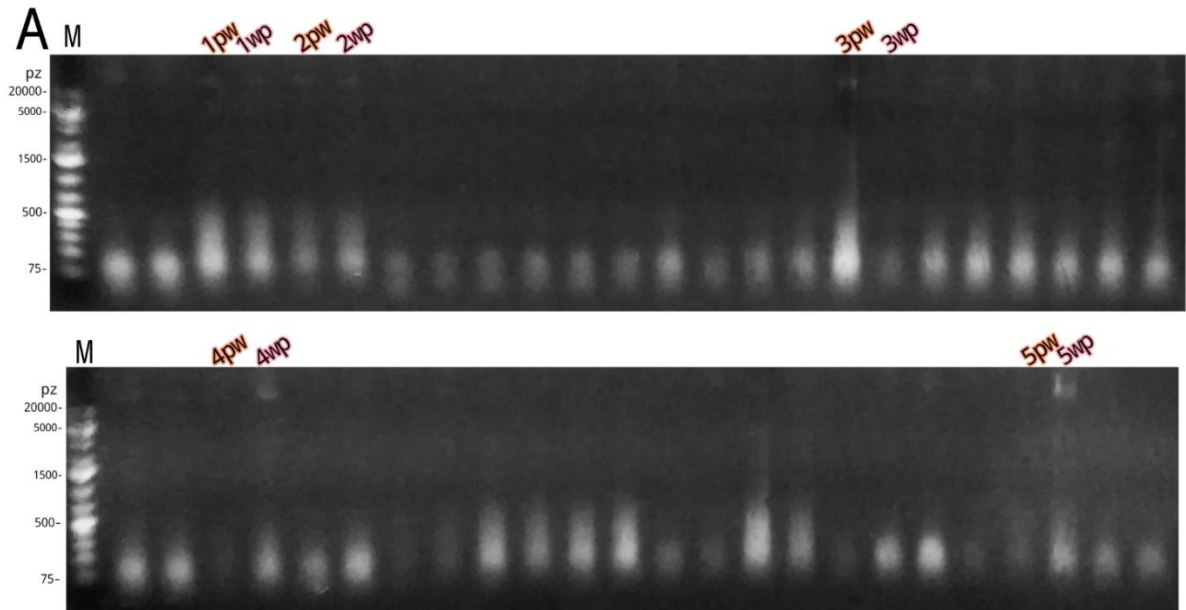


Ryc. 39. Analiza elektroforetyczna plazmidów po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+. A. Wzór restrykcyjny wyizolowanych plazmidów (P1-P6) po trawieniu enzymem *Bgl*I. B. Schemat *in silico* wzorów restrykcyjnych po trawieniu enzymem *Bgl*I plazmidu z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 (1) oraz wyjściowego plazmidu (2). M – marker masy cząsteczkowej.

Tabela 23. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem *BglI* plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+. P1-P6: fragmenty restrykcyjne obserwowanych plazmidów (Rycina 34); 1: rozkład fragmentów *in silico* plazmidu z wstawionym całym genomem bakteriofaga TP-84; 2: rozkład fragmentów *in silico* wyjściowego plazmidu. Prz. – wielkość przewidywana, Obs. – wielkość obserwowana.

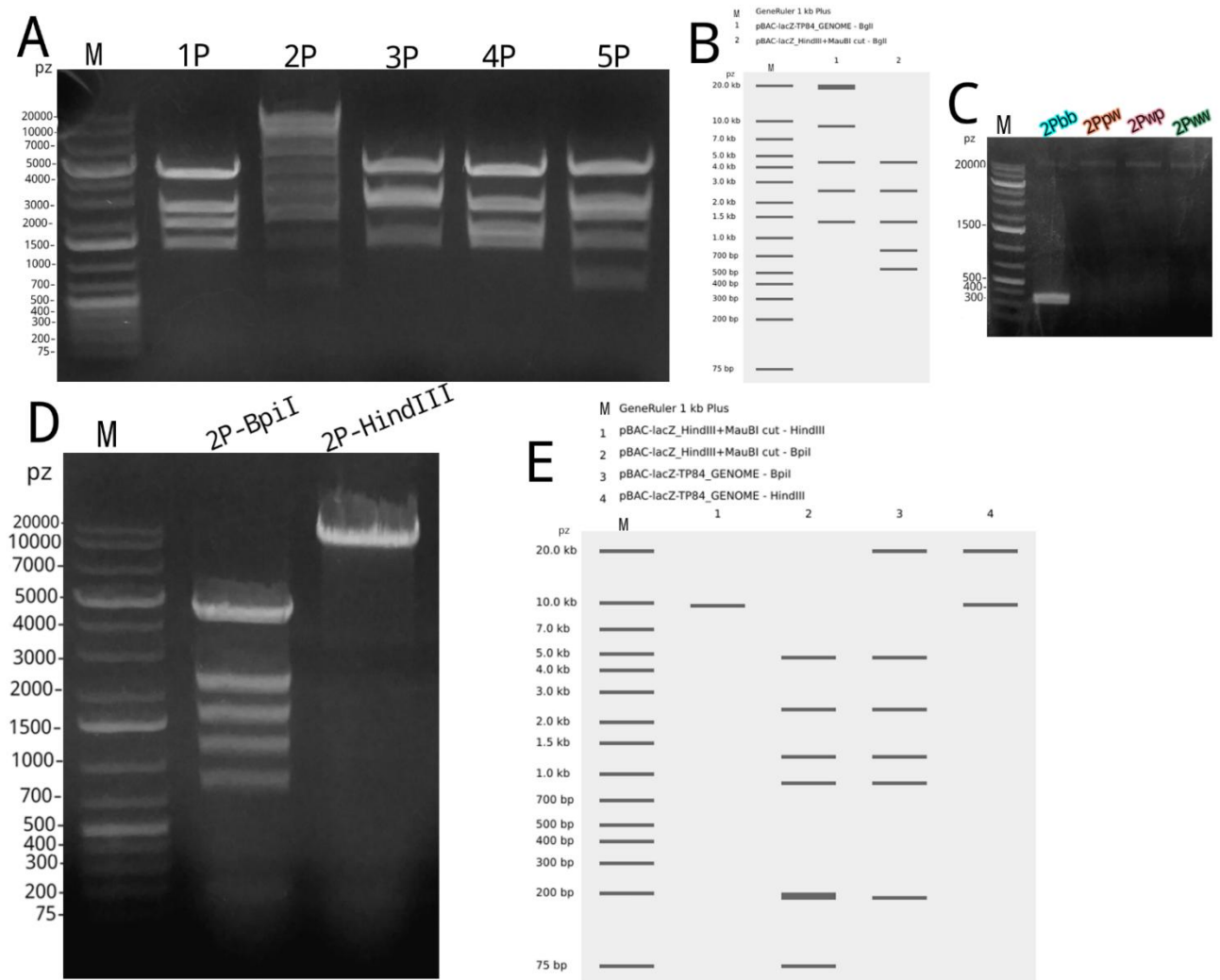
		Wielkość fragmentu (pz) (po trawieniu <i>BglI</i>)					
Prz. 1	Prz. 2	Obs. P1	Obs. P2	Obs. P3	Obs. P4	Obs. P5	Obs. P6
20857	-	-	-	-	-	-	-
19130	-	-	-	-	-	-	-
9028	-	-	-	-	-	-	-
-	-	5000	-	5000	5000	5000	5000
4449	4449	-	-	-	-	-	-
-	-	3000	3000	3000	3000	3000	3000
2520	2520	-	-	~2500	~2500	~2500	~2500
1368	1368	~1300	~1500	~1500	~1500	~1500	~1500
-	775	-	-	~700	>700	>700	>700
-	537	-	-	-	-	-	-

Z uwagi na niskie zdolności rozdzielcze elektroforezy agarozowej tak dużych fragmentów DNA, jak też stosunkowo niskie stężenia dwóch otrzymanych fragmentów, postanowiłam od razu przystąpić do ligacji fragmentów genomu TP-84 R1++ i R2++ ze zlinearyzowanym plazmidem pBAC-lacZ. Posiłkując się kalkulatorem ligacji, dodałam fragmenty DNA w stosunkach molowych 1:2:2 oraz 1:3:3 (plazmidu do R1++ oraz do R2++). Obie mieszaniny ligacyjne pozostawiłam w 16°C na 12 godzin, po czym wykonałam standardową transformację. Wydajność reakcji była nieznacznie wyższa niż w przypadku wcześniejszych klonowań, ponieważ uzyskałam łącznie około 100 białych kolonii z wszystkich płytek. Przystąpiłam więc do wykonywania kolonijnej PCR, z parami starterów specyficznymi do miejsc łączenia pomiędzy plazmidem a wstawkami. Po sprawdzeniu 74 kolonii, nie uzyskałam ani jednego pozytywnego wyniku reakcji, natomiast w przypadku niektórych sprawdzanych kolonii, były widoczne duże, słabo widoczne fragmenty DNA podczas rozdziału elektroforetycznego na wysokości powyżej 20000 pz (Rycina 40).



Ryc. 40. Analiza elektroforetyczna fragmentów DNA po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++ (R1+ + R2+), R2++ (R3+ + R4+). Kolonijna PCR po klonowaniu Golden Gate. Zaznaczono 5 kolonii, które zostały wyizolowane i poddane analizie (Ryc. 39). pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R8), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

Z pięciu kolonii z widocznym prążkiem ponad 20000 pz (Rycina 40 1-5) wyizolowałam plazmidy i przeprowadziłam analizę restrykcyjną przy użyciu enzymu *BglII* (Rycina 41A, Tabela 24). Plazmid oznaczony jako 2P po trawieniu restrykcyjnym, posiadał duże fragmenty DNA na wysokości 20000 pz i 10000 pz. Wzór trawienia nie odpowiadał do końca prawidłowemu rozkładowi fragmentów restrykcyjnych w przypadku klonu pozytywnego (Rycina 41B), mimo to postanowiłam poddać go dalszym analizom. Powtórzyłam kolonijną PCR używając wyizolowanego plazmidu jako matrycy (Rycina 41C), oraz wykonałam trawienie restrykcyjne tego enzymu dwoma kolejnymi enzymami restrykcyjnymi (Rycina 41D), czyli *BpiI* oraz *HindIII*, które wykazywały inny wzór trawienia dla wyjściowego plazmidu oraz dla pozytywnego klonu (Rycina 41E).



Ryc. 41. Analiza elektroforetyczna plazmidów po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++ (R1+ + R2+), R2++ (R3+ + R4+). **A.** Wzór restrykcyjny wyizolowanych plazmidów (1P-5P) po trawieniu enzymem *BglI*. **B.** Schemat *in silico* wzorów restrykcyjnych po trawieniu enzymem *BglI* plazmidu z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 (1) oraz pustego plazmidu (2). **C.** Kolonijna PCR plazmidu 2P z sekcji A. **D.** Wzór restrykcyjny plazmidu 2P po trawieniu enzymami *BpiI* i *HindIII*. **E.** Schemat *in silico* wzorów restrykcyjnych po trawieniu enzymem *BpiI* plazmidu z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 (3), wyjściowego plazmidu (2), oraz po trawieniu enzymem *HindIII* plazmidu z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 (4) i wyjściowego plazmidu (1). pp – para starterów specyficznych do plazmidu; ww – para starterów specyficznych do sąsiadujących wstawek (R2+R3); pw – starter „forward” specyficzny do plazmidu, starter „reverse” specyficzny do wstawki (R1); wp - starter „forward” specyficzny do wstawki (R8), starter „reverse” specyficzny do plazmidu; M – marker masy cząsteczkowej.

Tabela 24. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem *Bgl*I plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++, R2++. P1-P5: fragmenty restrykcyjne obserwowanych plazmidów (Rycina 34); 1: rozkład fragmentów *in silico* plazmidu z wstawionym całym genomem bakteriofaga TP-84; 2: rozkład fragmentów *in silico* wyjściowego plazmidu.

Przewidywana 1	Przewidywana 2	Wielkość fragmentu (pz) (po trawieniu <i>Bgl</i> I)				
		Obserwowana P1	Obserwowana P2	Obserwowana P3	Obserwowana P4	Obserwowana P5
20857	-	-	>20000	-	-	-
19130	-	-	>10000	-	-	-
9028	-	-	>7000	-	-	-
-	-	<5000	~5000	~5000	~5000	5000
4449	4449	-	~4000	-	-	-
-	-	<3000	-	~3000	~3000	~3000
2520	2520	>2000	>2000	-	~2000	~2500
1368	1368	~1500	>1500	>1500	~1500	~1500
-	775	-	~700	-	-	>700
-	537	-	-	-	-	-

Obie analizy wykazały jednoznacznie, że plazmid 2P, pomimo wzoru trawienia enzymem *Bgl*I wskazującego na to, że posiada wstawione fragmenty genomu TP-84, był plazmidem wyjściowym.

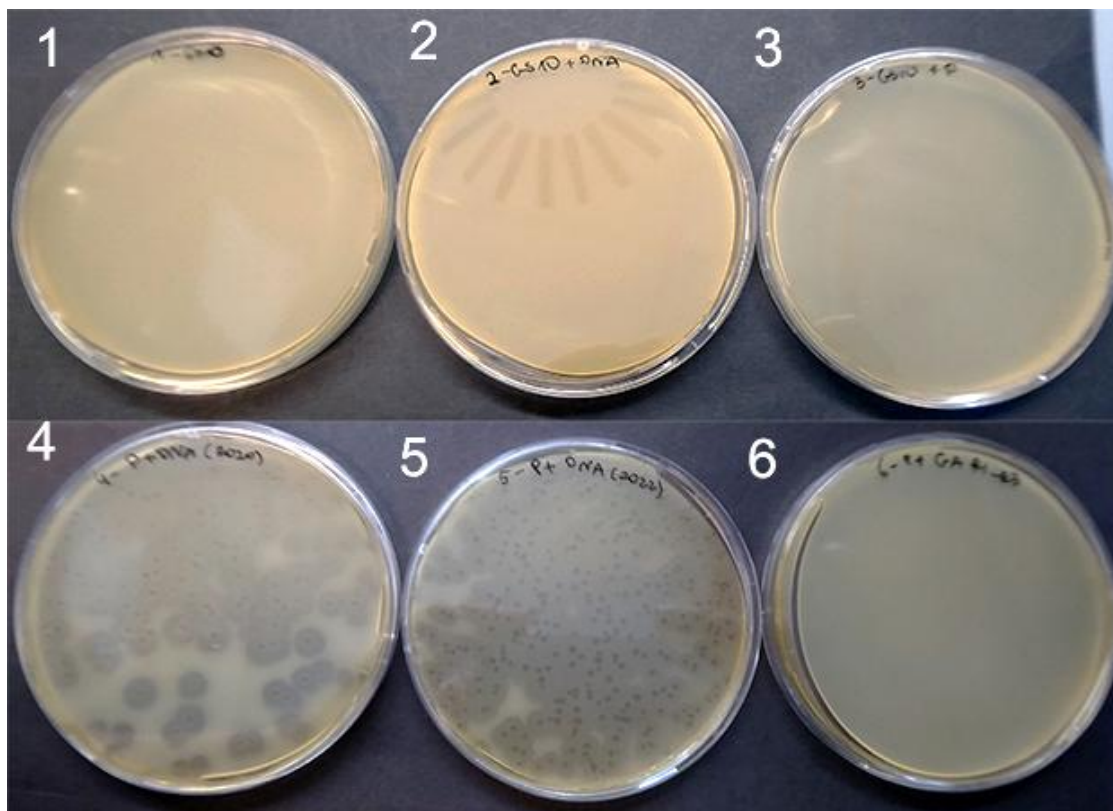
Podsumowując ten etap badań, nie udało się uzyskać pozytywnych klonów pBAC-lacZ zawierających wstawione fragmenty genomu bakteriofaga TP-84. Z tego też powodu klonowanie metodą Gibsona wydaje się bardziej obiecującą metodą do uzyskania rekombinowanego całego genomu faga TP-84 z uwagi na to, że udało się osiągnąć częściowy sukces w postaci konstruktów zawierających wstawione 6600 pz genomu faga. Wymagana jest natomiast dalsza optymalizacja w kwestii efektywnego klonowania całego genomu do wektora typu BAC.

6.5. Transfekcja protoplastów *G. stearothermophilus* 10 rekombinowanym materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84

Opracowanie metody umożliwiającej umieszczenie zrekombinowanego genomu w wirionie bakteriofaga TP-84 lub w komórce gospodarza, jest niezbędnym etapem podczas opracowywania systemu prezentacji białek na powierzchni bakteriofagów. Dwie najczęściej

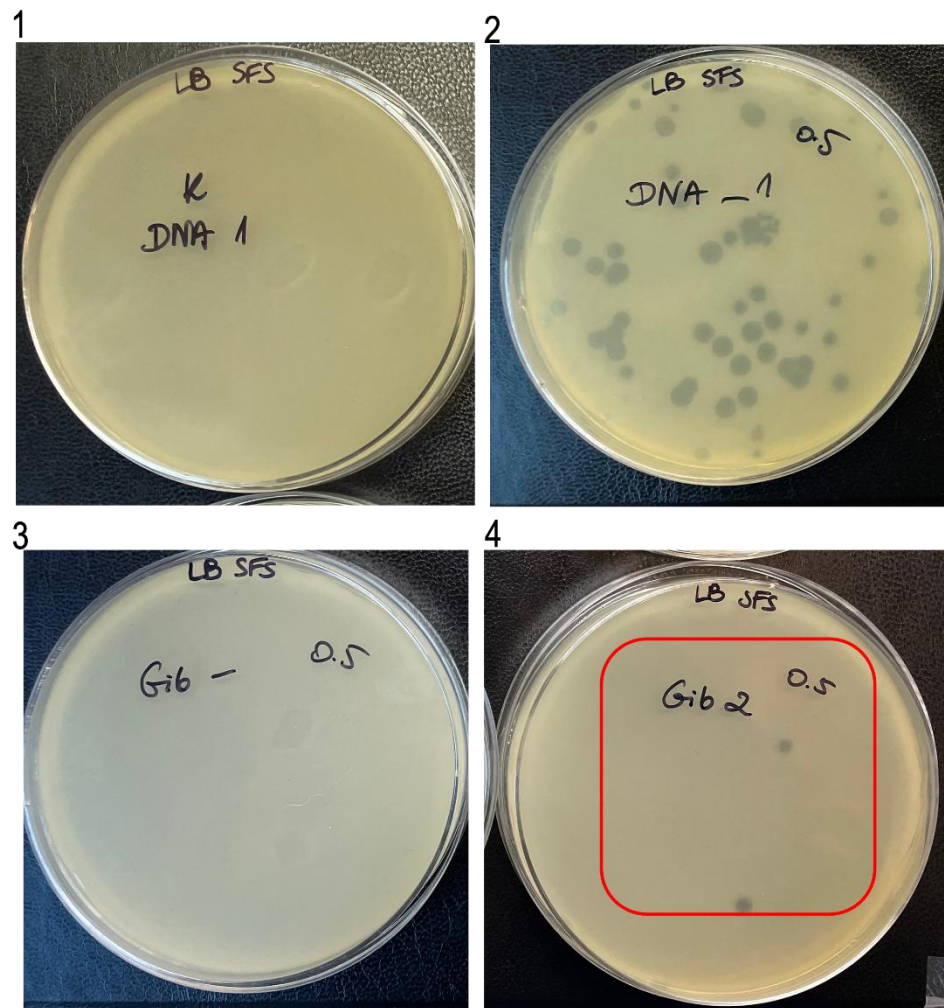
używane strategie umieszczania molekuł rekombinowanego DNA bakteriofaga obejmują pakowanie rekombinowanego DNA *in vitro* do pustych kapsydów oraz transfekcję [46]. Pakowanie DNA *in vitro* uważane jest za metodę bardziej wydajną i efektywną, jednak jest ona stosowana przede wszystkim podczas składania bakteriofagów, których cykl życiowy oraz wszystkie białka biorące udział w pakowaniu są już dobrze poznane i zbadane [47]. Wprowadzanie rekombinowanego DNA poprzez transfekcję może być wykonane za pomocą metod biologicznych, czyli wektorów wirusowych, chemicznych, takich jak zastosowanie fosforanu wapnia [48] lub fizycznych, takich jak elektroporacja lub mikroiniekcja [49], [50].

Metodą, jaka została wykorzystana w niniejszej pracy była transfekcja protoplastów gospodarza *G. stearothermophilus* 10 za pośrednictwem glikolu polietylenowego (PEG8000) genomem bakteriofaga TP-84 [Metody 5.2.2.]. Obraz płytek (Rycina 42) potwierdził, że w ramach tego doświadczenia uzyskałam protoplasty z bakterii *G. stearothermophilus* 10, będącej gospodarzem dla bakteriofaga TP-84. Na płytkach z dodatkiem samych bakterii gospodarza (Rycina 42 - 1) lub z bakteriami gospodarza z dodanym DNA (Rycina 42 - 2) brak jest widocznych łyseinek. Zatem zarówno w hodowli gospodarza, jak i w preparatach zawierających DNA TP-84, nie było obecnych cząstek wirusowych. Dodanie roztworu protoplastów do hodowli komórek gospodarza również nie skutkowało powstaniem łyseinek (Rycina 42 - 3), wykluczyć więc można ewentualne zakażenie tych preparatów bakteriofagiem TP-84. Obecne na płytkach numer 4 i 5 (Rycina 42) łyseinki świadczą o tym, że materiał genetyczny TP-84 dodany do mieszaniny protoplastów dostał się do protoplastów. Umożliwiło to namnożenie się bakteriofaga TP-84 oraz wytworzenie łyseinek. Spróbowałam również dodać do protoplastów mieszaninę ze zlinearyzowanym plazmidem pBAC-lacZ oraz pełnym genomem bakteriofaga podzielonym na osiem części (Rycina 42 - 6). W wyniku tej próby nie uzyskałam żadnych łyseinek.



Ryc. 42. Płytki po transfekcji protoplastów bakterii *G. stearothermophilus 10* materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84. Podczas przygotowania protoplastów dodano DNA następująco: 1. *G. stearothermophilus 10*; 2. *G. stearothermophilus 10*+DNA TP-84; 3. *G. stearothermophilus 10*+protoplasty *G. stearothermophilus 10*; 4. Protoplasty *G. stearothermophilus 10*+DNA TP-84; 5. Protoplasty *G. stearothermophilus 10*+DNA TP-84; 6. Protoplasty *G. stearothermophilus 10*+mieszanina po reakcji klonowania Gibsona (pBAC-lacZ+R1-R8).

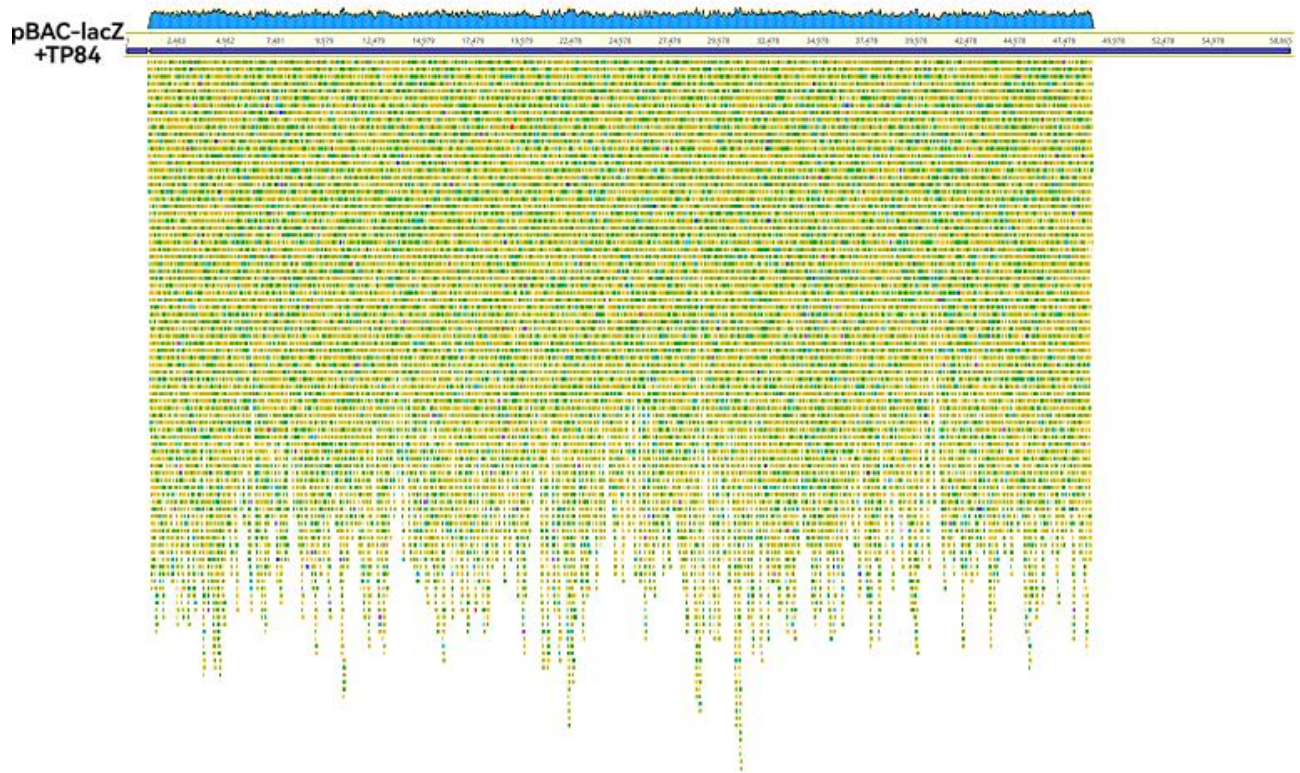
Podczas innego powtórzenia tego samego doświadczenia (Rycina 43) uzyskano łyseki na płytce z dodatkiem komórek gospodarza, protoplastach oraz mieszaniną po klonowaniu metodą Gibsona, czyli zawierającą rekombinowany, niemodyfikowany materiał genetyczny faga TP-84 (Rycina 43 – 4). Na płytce z kontrolą negatywną (Rycina 43 – 3), zawierającą mieszaninę reakcyjną Gibsona bez dodatku DNA faga TP-84, nie obserwowano łysek, co świadczyło o braku zanieczyszczenia mieszaniny bakteriofagiem TP-84. Wyizolowano materiał genetyczny z uzyskanych łysek i zlecono sekwencjonowanie nowej generacji (ang. Next-Generation Sequencing, NGS).



Ryc. 43. Płytki po transfekcji protoplastów bakterii *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84. Podczas przygotowania protoplastów dodano DNA następująco: 1. *G. stearothermophilus* 10+DNA TP-84; 2. *G. stearothermophilus* 10+protoplasty *G. stearothermophilus* 10+DNA TP-84; 3. *G. stearothermophilus* 10+Protoplasty *G. stearothermophilus* 10+mieszanina reakcyjna Gibsona bez DNA TP-84; 4. *G. stearothermophilus* 10+protoplasty *G. stearothermophilus* 10+mieszanina po reakcji klonowania Gibsona (pBAC-lacZ+R1-R8).

Analizy otrzymanych wyników sekwencjonowania wskazują na to, że w otrzymanych lysinkach obecny był jedynie genom bakteriofaga TP-84, bez sekwencji wektora pBAC-lacZ (Rycina 44). Wytłumaczeniem tego wyniku może być ewentualne wycinanie przez bakteriofaga swojego materiału genetycznego z wektora plazmidowego, jednak to założenie wymagają dalszych analiz. Niemniej jednak, otrzymanie lysinek po transfekcji protoplastów *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym faga TP-84 za

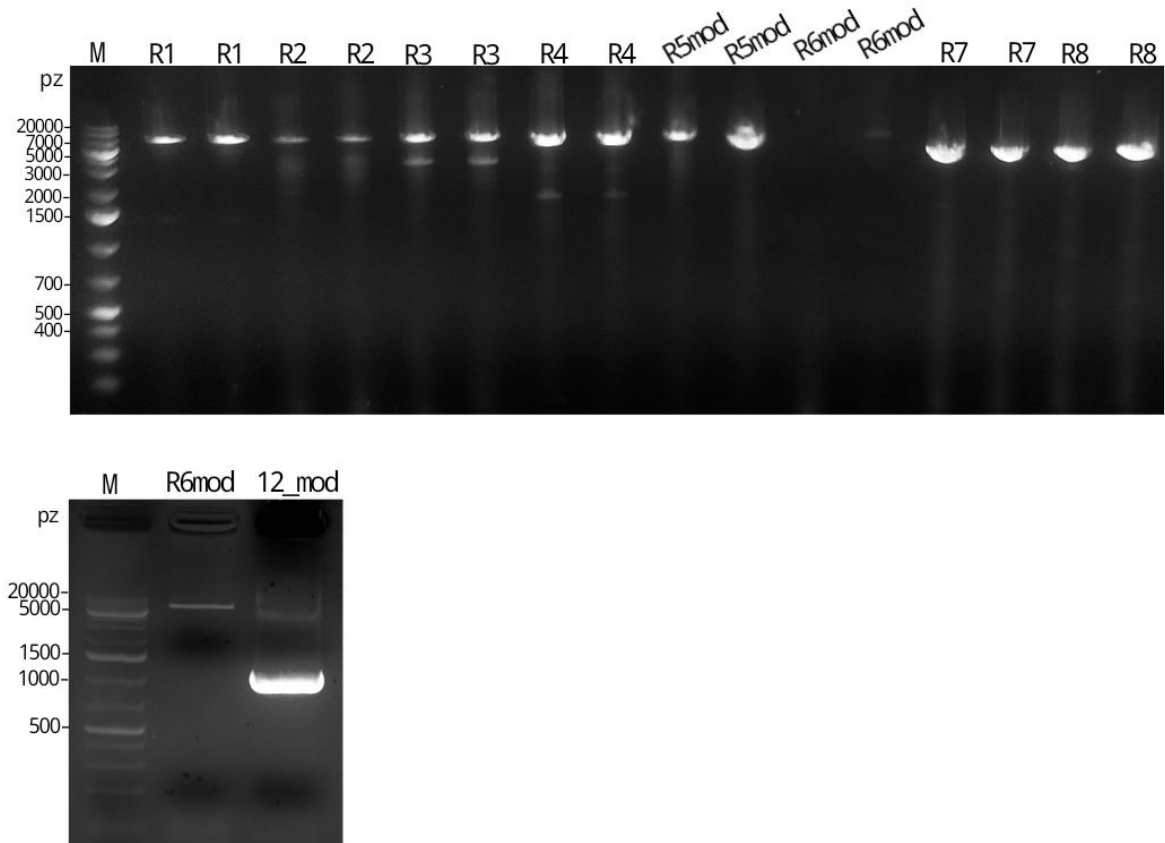
pomocą reakcji Gibsona, świadczy o tym, że uzyskano pozytywne wyniki tego etapu prac, jak również stanowiło solidną podstawę do uzyskania funkcjonalnego systemu prezentacji białek/peptydów na powierzchni faga TP-84.



Ryc. 44. Wizualne przedstawienie wyników sekwencjonowania NGS materiału genetycznego wyizolowanego z lysinek otrzymanych po przeprowadzeniu transfekcji protoplastów *G. stearothermophilus* 10 konstruktem złożonym z plazmidu pBAC-lacZ oraz genomu bakteriofaga TP-84 po reakcji Gibsona. Pełna sekwencja docelowego konstrukt przedstawiona jest schematycznie granatowym paskiem. Kolorami zielono-żółtymi zwizualizowane są odczyty sekwencji uzyskane podczas sekwencjonowania NGS, zgodność odczytanych sekwencji z teoretyczną sekwencją docelowego konstruktu zobrazowana jest niebieskimi „słupkami”. Grafikę wykonałam za pomocą programu Geneious Prime.

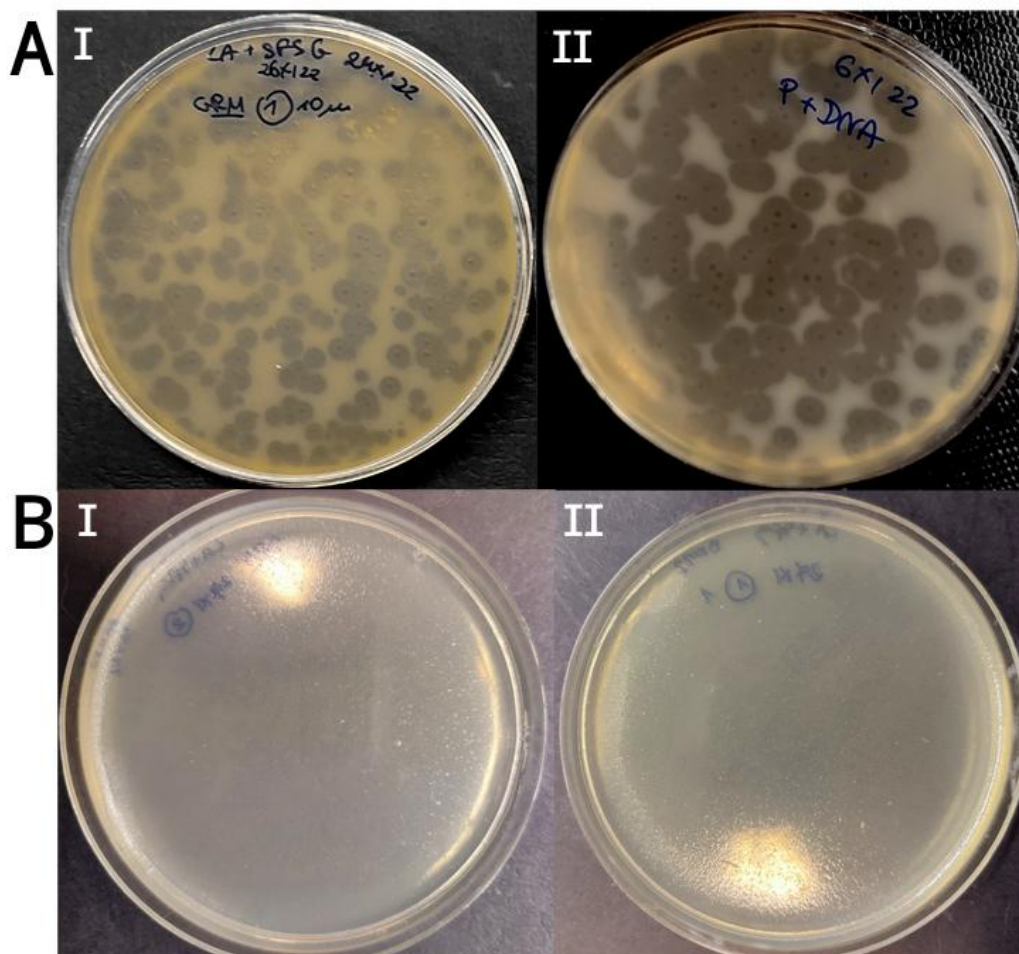
6.6. Transfekcja protoplastów *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84 z dołączonym znacznikiem molekularnym FLAG na C-końcu białka kodowanego przez gen 12

W celu otrzymania bakteriofaga TP-84 posiadającego rekombinowany genom wykonałam zmodyfikowaną wersję reakcji Gibsona [Metody 5.2.8.2.4.], nie używając do klonowania wektora plazmidowego. Jak w poprzednich doświadczeniach [Wyniki 6.3.], genom bakteriofaga podzielony był na osiem części, ale dwie z nich były zmodyfikowane tak, aby kończyć się w miejscach otaczających gen 12 bakteriofaga TP-84. Za pomocą PCR typu Touch-Down [Tabela 15] powieliłam fragmenty genomu używając, jako matrycy DNA wyizolowanego z dzikiego typu szczepu bakteriofaga TP-84, natomiast fragment zawierający gen 12 bakteriofaga połączony z odcinkiem DNA kodującym znacznik molekularny FLAG na C-końcu białka (fragment 12_mod) powieliłam na matrycy plazmidu pUC19-FLAG-C-TERM-TP84_12 [Wyniki 6.2., Rycina 13]. Prawidłową wielkość powielonych fragmentów oceniłam za pomocą elektroforezy agarozowej (Rycina 45). Przystępując do pierwszej próby złożenia genomu faga wraz ze zmodyfikowanym fragmentem, użyłam początkowo stosunków molowych fragmentów niemodyfikowanych R1-R8 do zmodyfikowanego 12_mod 1:2. Stężenie wszystkich fragmentów wyniosło 0,1 pmol. W wyniku reakcji Gibsona używając wyżej podanego stosunku fragmentów i późniejszej transfekcji protoplastów mieszaniną po reakcji, otrzymałam łącznie dwie pojedyncze łyśinki, które po zsekwencjonowaniu okazały się niemodyfikowanymi bakteriofagami. Być może te łyśinki o niezmiennym genomie były efektem zakażenia dzikiego typu bakteriofagiem TP-84 hodowli gospodarza *G. stearothermophilus* 10.



Ryc. 45. Analiza elektroforetyczna dziewięciu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R6, 12_mod) w dwóch powitórzeniach, używanych, jako wstawki podczas klonowania metodą Gibsona genomu modyfikowanego. M – marker masy cząsteczkowej.

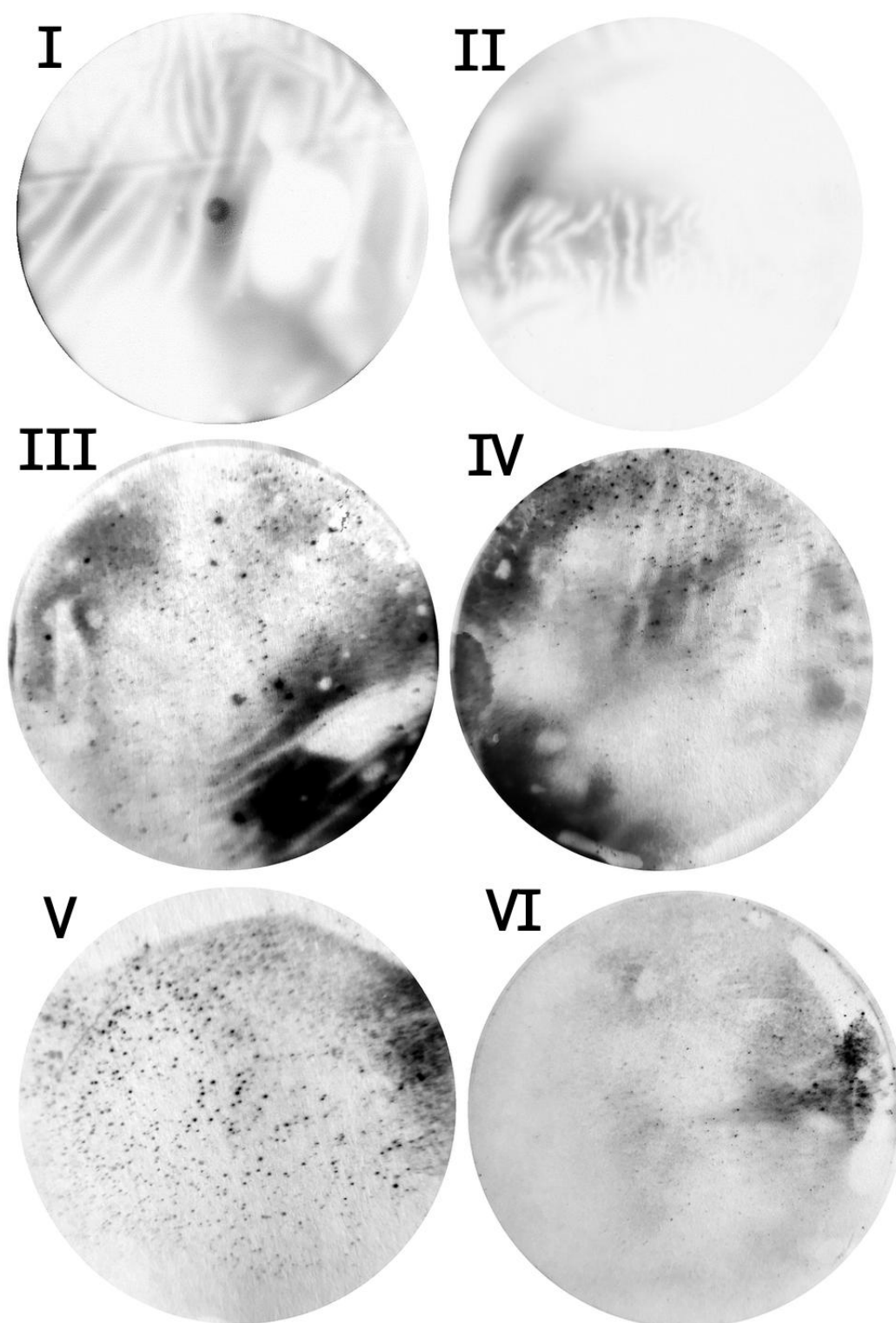
Z uwagi na znaczną różnicę wielkości poszczególnych fragmentów używanych podczas reakcji Gibsona, gdzie fragmenty R1-R8 były wielkości od około 6700 pz do 4300 pz, natomiast fragment zmodyfikowany 12_mod był wielkości 1068 pz, postanowiłam zwiększyć wielokrotność krótszego fragmentu do pozostałych do 8:1. Dodatkowo, ponieważ podczas jednej reakcji składanych było naraz aż dziewięć fragmentów DNA, użyłam znacznie wyższych stężeń molowych, od 0,65 pmol do 0,8 pmol, gdzie każdy fragment R1-R8 został dodany w stężeniu 0,05 pmol, a fragment 12_mod w stężeniu od 0,25 pmol do 0,4 pmol. W wyniku takich modyfikacji ilości DNA używanych podczas reakcji Gibsona, otrzymałam łącznie około kilkudziesięciu łysek po transfekcji protoplastów *G. stearothermophilus* 10 połową objętości reakcji, czyli 10 μ l (Rycina 46A). Losowo wybrane cztery łyseki namnożyłam w taki sposób, aby otrzymać w całości zlizowane płytki, co zwiększało szansę detekcji obecności zmodyfikowanego białka kapsydowego z dołączonym znacznikiem molekularnym FLAG [Metody 5.2.11.]. W taki sam sposób namnożyłam łysekę dzikiego bakteriofaga TP-84 (Rycina 46B).



Ryc. 46. **A.** Płytki po transfekcji protoplastów bakterii *G. stearothermophilus* 10 mieszaniną po reakcji Gibsona, zawierającą modyfikowany materiał genetyczny bakteriofaga TP-84 (I) oraz po transfekcji materiałem genetycznym dzikiego bakteriofaga TP-84 (II). **B.** Płytki po namnożeniu pojedynczych łysek z płytek I oraz II otrzymanych po transfekcji, poprzez zawieszenie ich w 100 μ l buforu TM oraz użycie metody płytek dwuwarstwowych.

Aby sprawdzić, czy otrzymane po reakcji Gibsona bakteriofagi TP-84 posiadają zmodyfikowany gen 12 z metką FLAG, czyli są klonami pozytywnymi, użyłam techniki immunodetekcji [Metody 5.2.11.]. Przykładanie membrany nitrocelulozowej do płytek z agarem górnym (Rycina 46B) powodowało przywieranie do niej białek kapsydowych bakteriofagów. Następnie po zablokowaniu przetransferowanych białek na membranach, używałam roztworu przeciwciał poliklonalnych I-rzędowych anti-FLAG. Przeciwciała te rozpoznawały epitop docelowego peptydu, czyli specyficznego oktapeptydu FLAG przyłączonego do C-końca głównego białka kapsydu bakteriofaga TP-84 i przywierały do niego. Po wypłukaniu membran z pozostałości roztworu I-rzędowych przeciwciał,

używałam roztworu przeciwciał poliklonalnych II-rzędowych, sprzężonych z peroksydazą chrzanową, które wiązywały się z przeciwciałami I-rzędowymi obecnymi na membranie. Dodanie substratu [Materiały 5.1.5.2.], po wypłukaniu roztworu przeciwciał II-rzędowych, umożliwiało detekcję obecności peroksydazy chrzanowej sprzężonej z przeciwciałami obecnymi na membranach. Detekcja możliwa była poprzez utlenianie luminolu w obecności peroksydazy chrzanowej i nadtlenku wodoru. Reakcja ta skutkowała chemiluminescencją, czyli emisją światła, która zostawała zobrazowana poprzez autoradiografię. Klisza rentgenowska przyłożona ściśle do membran na 8 minut utrzymywała sygnał reakcji enzymatycznej peroksydazy chrzanowej, potwierdzając tym samym obecność zmodyfikowanego głównego białka kapsydu bakteriofaga TP-84 w badanych próbkach (Rycina 47). Prawidłowość otrzymanego sygnału potwierdza obecność sygnału z kontroli pozytywnej (Rycina 47-I), czyli membrany z zablokowanym na niej roztworem przeciwciał I-rzędowych anti-FLAG, oraz brak sygnału z kontroli negatywnej, czyli membrany przyłożonej do płytki zawierającej wiriony dzikiego typu bakteriofaga TP-84 (Rycina 47-II). Podsumowując ten etap badań, otrzymałam funkcjonalne zmodyfikowane bakteriofagi TP-84. Podczas ich konstrukcji użyłam jednego z fragmentów DNA faga TP-84 w postaci rekombinowanej, zawierał on fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu w połączeniu z odcinkiem kodującym potrójny oktapeptyd FLAG ulegający ekspozycji na powierzchni wirionu. Obecność pozytywnych klonów potwierdził sygnał świetlny otrzymany na kliszy rentgenowskiej w postaci kropek, odzwierciedlających skupiska zmodyfikowanych bakteriofagów TP-84 obecnych w agarze górnym. Wyniki te świadczą o otrzymaniu skutecznego systemu termofilnego prezentacji białek/peptydów na powierzchni faga TP-84. Niemniej jednak, system ten wymaga dalszych optymalizacji, zwłaszcza w zakresie testów funkcjonalnych, oraz porównania wszystkich parametrów cyklu życiowego modyfikowanych bakteriofagów w stosunku do dzikich.



Ryc. 47. Klisze rentgenowskie z utrwalonym sygnałem świetlnym w postaci czarnych plamek, otrzymanym na powierzchni membran nitrocelulozowych podczas immunodetekcji z użyciem przeciwciał I-rzędowych anti-FLAG oraz przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową. **I.** Kontrola pozytywna eksperymentu. **II.** Kontrola negatywna eksperymentu. **III-VI.** Obraz otrzymany z membran nitrocelulozowych przykładanych do płytek z agarem górnym, gdzie namnożone były sprawdzane bakteriofagi.

7. Podsumowanie

W ostatnich latach zaobserwować można intensywny rozwój technik związanych z prezentacją białek/peptydów/innych cząsteczek na powierzchni bakteriofagów. Świadczyć o tym może roczny wzrost liczby publikacji związanych z tą tematyką. Używając słów kluczowych „phage display”, wyszukiwarka Google Scholar pokazuje, że w 2018 roku wydano 8230 publikacji o tej tematyce, w 2019 r. było to 8420 publikacji, w 2020 r. 9110 publikacji, natomiast w 2021 roku było to aż 10600 publikacji. Jest to więc technologia coraz częściej stosowana i rozwijająca się, ale także stosunkowo młoda, bo opracowana zaledwie 37 lat temu [19]. W części wstępnej niniejszej pracy opisałam szczegółowo wszystkie dotychczas skonstruowane systemy prezentacji białek/peptydów lub innych cząsteczek na powierzchni bakteriofagów filamentujących, innych bakteriofagów oraz na powierzchni innych cząstek biologicznych. Opisałam również metody generowania bibliotek, wady, zalety i przykłady zastosowań wszystkich systemów. W części eksperymentalnej przedstawiłam zarówno wszystkie etapy projektowania, jak i proces prowadzący do opracowania pierwszego systemu prezentacji białek/peptydów opierającego się na fagu termofilnym TP-84.

Podstawowymi technikami inżynierii genetycznej użytymi w pracy były: (i) klonowanie metodą RF, bez użycia enzymów restrykcyjnych, polegającej na powielaniu klonowanych genów w formie „megastartera”, stanowiącego matrycę podczas reakcji z wektorem plazmidowym; (ii) klonowanie metodą Gibsona, opierającej się na generowaniu przy użyciu T5 egzonukleazy 5' „lepkich końców” komplementarnych do sąsiadujących fragmentów zarówno wstawek, jak i do wektora plazmidowego, które następnie uzupełniane są polimerazą DNA; (iii) klonowanie metodą Golden Gate, również polegającej na wytwarzaniu „nawisów” 5', ale w porównaniu do klonowania Gibsona, „nawisy” te są krótsze i generowane za pomocą enzymu restrykcyjnego typu IIs, który przeprowadza hybrydyzację nici DNA w miejscu poza sekwencją rozpoznawaną przez enzym. Sekwencje „nawisów” były projektowane tak, aby sąsiadujące fragmenty DNA były do siebie komplementarne. Cały konstrukt ligowany był za pomocą ligazy T4 DNA. W pracy opisałam również skuteczny sposób transfekcji protoplastów *G. stearothermophilus* 10 rekombinowanym oraz modyfikowanym materiałem genetycznym TP-84. Otrzymanie funkcjonalnego systemu prezentacji białek/peptydów na powierzchni termofilnego

bakteriofaga TP-84 potwierdziłam za pomocą techniki immunodetekcji, wynik natomiast zobrazowałam poprzez utrwalenie sygnału chemiluminescencyjnego.

Niniejsza praca wpisuje się w nowatorski nurt badań nad kolejnymi platformami do prezentacji białek/peptydów. Główne elementy nowości oraz wnioski płynące z niniejszej pracy to:

1. Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dotyczące skonstruowania termofilnego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni bakteriofaga termofilnego TP-84 są pierwszą próbą otrzymania takiego systemu.
2. W wyniku przeprowadzonych badań skutecznie sklonowano sześć genów faga TP-84, kodujących białka strukturalne/kapsydowe, do wektora plazmidowego, którym skutecznie transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5 α . Skonstruowano bibliotekę natywną, jak też biblioteki genów fuzyjnych kodujących wybrane białka strukturalne faga TP-84 z dołączonymi fragmentami DNA kodującymi znaczniki molekularne 3xFLAG oraz 6xHis.
3. Opracowano metodę tandemowego wstawienia genu 8 faga TP-84, kodującego dodatkowe białko kapsydu, do wektora plazmidowego. Gen ten może okazać się bardzo istotny w docelowym systemie prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego faga TP-84.
4. Skutecznie wstawiono fragment genomu bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 pz do wektora typu BAC. Próby wstawienia większego fragmentu genomu lub całego genomu do plazmidu typu BAC, celem integracji genów fuzyjnych w miejsca natywnych genów, zakończyły się niepowodzeniem, stosując zarówno metodę Gibsona jak i Golden Gate.
5. Z uwagi na trudność w klonowaniu genu 8, jak też całego genomu faga TP-84, mimo zastosowania indukowalnego systemu zwiększania liczby kopii, wnioskować można, że produkty niektórych genów tego faga są toksyczne dla komórek *E. coli*.

6. Skutecznie transfekowano protoplasty *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84, zarówno w formie natywnej jak i rekombinowanej, tzn. umieszczonym w wektorze plazmidowym pBAC-lacZ.
7. Uzyskano aktywne cząstki fagowe posiadające fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu połączone ze znacznikiem molekularnym 3xFLAG eksponowanym na zewnątrz wirionu.

Podsumowując, osiągnęłam wszystkie trzy stawiane w pracy cele, tj. sklonowanie sześciu genów TP-84, opracowanie metody wstawiania rekombinowanego genomu do komórek gospodarza, za pomocą transfekcji, oraz wprowadzenie *in vitro* modyfikowanego genomu bakteriofaga TP-84 otrzymując funkcjonujący system prezentowania białek/peptydów na jego powierzchni.

8. Bibliografia

- [1] D. M. Woodcock *i in.*, „Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants”, *Nucleic Acids Res*, t. 17, nr 9, s. 3469–3478, maj 1989, doi: 10.1093/nar/17.9.3469.
- [2] B. Łubkowska, J. Jeżewska-Frąckowiak, I. Sobolewski, i P. M. Skowron, „Bacteriophages of Thermophilic «Bacillus Group» Bacteria-A Review”, *Microorganisms*, t. 9, nr 7, s. 1522, lip. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9071522.
- [3] G. F. Saunders i L. L. Campbell, „Characterization of a thermophilic bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*”, *J Bacteriol*, t. 91, nr 1, s. 340–348, sty. 1966, doi: 10.1128/jb.91.1.340-348.1966.
- [4] P. M. Skowron *i in.*, „Sequence, genome organization, annotation and proteomics of the thermophilic, 47.7-kb *Geobacillus stearothermophilus* bacteriophage TP-84 and its classification in the new Tp84virus genus”, *PLoS One*, t. 13, nr 4, s. e0195449, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195449.
- [5] I. Epstein i L. L. Campbell, „Production and purification of the thermophilic bacteriophage TP-84”, *Appl Microbiol*, t. 29, nr 2, s. 219–223, luty 1975, doi: 10.1128/am.29.2.219-223.1975.
- [6] J. Wild i W. Szybalski, „Copy-control pBAC/oriV vectors for genomic cloning”, *Methods Mol Biol*, t. 267, s. 145–154, 2004, doi: 10.1385/1-59259-774-2:145.
- [7] J. A. Glasel, „Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios”, *Biotechniques*, t. 18, nr 1, s. 62–63, sty. 1995.
- [8] S. Gallagher, „Quantitation of nucleic acids with absorption spectroscopy”, *Curr Protoc Protein Sci*, t. Appendix 4, s. Appendix 4K, maj 2001, doi: 10.1002/0471140864.psa04ks13.
- [9] D. Hanahan, „Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids”, *J Mol Biol*, t. 166, nr 4, s. 557–580, cze. 1983, doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- [10] F. van den Ent i J. Löwe, „RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids”, *J Biochem Biophys Methods*, t. 67, nr 1, s. 67–74, kwi. 2006, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.12.008.
- [11] S. R. Bond i C. C. Naus, „RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects”, *Nucleic Acids Res*, t. 40, nr Web Server issue, s. W209-213, lip. 2012, doi: 10.1093/nar/gks396.
- [12] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, i H. O. Smith, „Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases”, *Nat Methods*, t. 6, nr 5, s. 343–345, maj 2009, doi: 10.1038/nmeth.1318.
- [13] Y. Cai i J. Dai, „Methods to Synthesize Large DNA Fragments for a Synthetic Yeast Genome”, *Cold Spring Harb Protoc*, t. 2017, nr 3, mar. 2017, doi: 10.1101/pdb.prot080978.
- [14] M. McGuffie, „Gibson Assembly calculator.” <https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsGibsonCloning>, 15 lipiec 2022.
- [15] D. Codex, „Gibson Assembly User Guide.” Codex DNA, Inc., 2020. Dostęp: 1 sierpień 2022. [Online]. Dostępne na: <https://codexdna.com/wp-content/themes/codexdna/assets/pdfs/Gibson-Assembly-HiFi-User-Guide.pdf>
- [16] C. Engler, R. Kandzia, i S. Marillonnet, „A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability”, *PLoS One*, t. 3, nr 11, s. e3647, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003647.

- [17] G. S. Sandhu, J. W. Precup, i B. C. Kline, „Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed *Escherichia coli* colonies”, *Biotechniques*, t. 7, nr 7, s. 689–690, sie. 1989.
- [18] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, i D. J. Lipman, „Basic local alignment search tool”, *J Mol Biol*, t. 215, nr 3, s. 403–410, paź. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [19] G. P. Smith, „Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface”, *Science*, t. 228, nr 4705, s. 1315–1317, cze. 1985, doi: 10.1126/science.4001944.
- [20] S. F. Parmley i G. P. Smith, „Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes”, *Gene*, t. 73, nr 2, s. 305–318, grudz. 1988, doi: 10.1016/0378-1119(88)90495-7.
- [21] V. F. de la Cruz, A. A. Lal, i T. F. McCutchan, „Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage”, *J Biol Chem*, t. 263, nr 9, s. 4318–4322, mar. 1988.
- [22] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, i D. J. Chiswell, „Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains”, *Nature*, t. 348, nr 6301, s. 552–554, grudz. 1990, doi: 10.1038/348552a0.
- [23] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, i H. R. Hoogenboom, „Making antibodies by phage display technology”, *Annu Rev Immunol*, t. 12, s. 433–455, 1994, doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245.
- [24] G. P. Smith, „Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture)”, *Angew Chem Int Ed Engl*, t. 58, nr 41, s. 14428–14437, paź. 2019, doi: 10.1002/anie.201908308.
- [25] A. H. Rosenberg, K. Griffin, M. T. Washington, S. S. Patel, i F. W. Studier, „Selection, identification, and genetic analysis of random mutants in the cloned primase/helicase gene of bacteriophage T7”, *J Biol Chem*, t. 271, nr 43, s. 26819–26824, paź. 1996.
- [26] Z. Ren i L. W. Black, „Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid”, *Gene*, t. 215, nr 2, s. 439–444, lip. 1998, doi: 10.1016/s0378-1119(98)00298-4.
- [27] I. N. Maruyama, H. I. Maruyama, i S. Brenner, „Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 91, nr 17, s. 8273–8277, sie. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.17.8273.
- [28] G. W. Nchinda, N. Al-Atoom, M. T. Coats, J. M. Cameron, i A. B. Waffo, „Uniqueness of RNA Coliphage Q β Display System in Directed Evolutionary Biotechnology”, *Viruses*, t. 13, nr 4, s. 568, mar. 2021, doi: 10.3390/v13040568.
- [29] M. Spingola i D. S. Peabody, „MS2 coat protein mutants which bind Qbeta RNA”, *Nucleic Acids Res*, t. 25, nr 14, s. 2808–2815, lip. 1997, doi: 10.1093/nar/25.14.2808.
- [30] G. F. Saunders i L. L. Campbell, „Abstranct of Papers.”, Chicago, Ill., 1964, t. p. 36C.
- [31] N. Sternberg i R. H. Hoess, „Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 92, nr 5, s. 1609–1613, luty 1995, doi: 10.1073/pnas.92.5.1609.
- [32] G. Å. Løset, B. Bogen, i I. Sandlie, „Expanding the versatility of phage display I: efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage”, *PLoS One*, t. 6, nr 2, s. e14702, luty 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0014702.
- [33] X. Gao, Y. Huang, i S. Zhu, „Construction of murine phage antibody library and selection of ricin-specific single-chain antibodies”, *IUBMB Life*, t. 48, nr 5, s. 513–517, lis. 1999, doi: 10.1080/713803560.

- [34] G. Fuh i S. S. Sidhu, „Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein”, *FEBS Lett*, t. 480, nr 2–3, s. 231–234, wrz. 2000, doi: 10.1016/s0014-5793(00)01946-3.
- [35] E. Ceballos-Alcantarilla i M. Merckx, „Understanding and applications of Ser/Gly linkers in protein engineering”, *Methods Enzymol*, t. 647, s. 1–22, 2021, doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.001.
- [36] G. J. Chen, N. Qiu, C. Karrer, P. Caspers, i M. G. Page, „Restriction site-free insertion of PCR products directionally into vectors”, *Biotechniques*, t. 28, nr 3, s. 498–500, 504–505, mar. 2000, doi: 10.2144/00283st08.
- [37] T. Unger, Y. Jacobovitch, A. Dantes, R. Bernheim, i Y. Peleg, „Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression”, *J Struct Biol*, t. 172, nr 1, s. 34–44, paź. 2010, doi: 10.1016/j.jsb.2010.06.016.
- [38] F. Cava, A. Hidalgo, i J. Berenguer, „Thermus thermophilus as biological model”, *Extremophiles*, t. 13, nr 2, s. 213–231, mar. 2009, doi: 10.1007/s00792-009-0226-6.
- [39] B. Reeve, E. Martinez-Klimova, J. de Jonghe, D. J. Leak, i T. Ellis, „The Geobacillus Plasmid Set: A Modular Toolkit for Thermophile Engineering”, *ACS Synth. Biol.*, t. 5, nr 12, s. 1342–1347, grudz. 2016, doi: 10.1021/acssynbio.5b00298.
- [40] M. O’Connor, M. Peifer, i W. Bender, „Construction of large DNA segments in Escherichia coli”, *Science*, t. 244, nr 4910, s. 1307–1312, cze. 1989, doi: 10.1126/science.2660262.
- [41] B. Bajpai, „High Capacity Vectors”, *Advances in Biotechnology*, s. 1–10, paź. 2013, doi: 10.1007/978-81-322-1554-7_1.
- [42] J. Wild, Z. Hradecna, i W. Szybalski, „Conditionally Amplifiable BACs: Switching From Single-Copy to High-Copy Vectors and Genomic Clones”, *Genome Res.*, t. 12, nr 9, s. 1434–1444, sty. 2002, doi: 10.1101/gr.130502.
- [43] R. Chao, Y. Yuan, i H. Zhao, „Recent advances in DNA assembly technologies”, *FEMS Yeast Res*, t. 15, nr 1, s. 1–9, luty 2015, doi: 10.1111/1567-1364.12171.
- [44] D. G. Gibson *i in.*, „Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome”, *Science*, t. 319, nr 5867, s. 1215–1220, luty 2008, doi: 10.1126/science.1151721.
- [45] B. A. Rabe i C. Cepko, „A Simple Enhancement for Gibson Isothermal Assembly”, *bioRxiv*, s. 2020.06.14.150979, sty. 2020, doi: 10.1101/2020.06.14.150979.
- [46] B. Hohn i K. Murray, „Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro.”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 74, nr 8, s. 3259–3263, sie. 1977.
- [47] B. Hohn, M. Wurtz, B. Klein, A. Lustig, i T. Hohn, „Phage lambda DNA packaging, in vitro”, *J Supramol Struct*, t. 2, nr 2–4, s. 302–317, 1974, doi: 10.1002/jss.400020220.
- [48] F. L. Graham i A. J. van der Eb, „A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA”, *Virology*, t. 52, nr 2, s. 456–467, kwi. 1973, doi: 10.1016/0042-6822(73)90341-3.
- [49] J. D. Jensen, A. R. Parks, S. Adhya, A. J. Rattray, i D. L. Court, „λ Recombineering Used to Engineer the Genome of Phage T7”, *Antibiotics (Basel)*, t. 9, nr 11, s. 805, lis. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9110805.
- [50] A. Donnelly, T. Yata, K. Bentayebi, K. Suwan, i A. Hajitou, „Bacteriophage Mediates Efficient Gene Transfer in Combination with Conventional Transfection Reagents”, *Viruses*, t. 7, nr 12, s. 6476–6489, grudz. 2015, doi: 10.3390/v7122951.

9. Wykaz rycin i tabel

Ryc. 1. Schemat przygotowywania i transfekcji protoplastów <i>G. stearothermophilus</i> 10 genomem bakteriofaga TP-84.....	58
Ryc. 2. Schemat metody klonowania RF.....	64
Ryc. 3. Schemat klonowania metodą Gibsona.....	69
Ryc. 4. Schemat klonowania metodą Golden Gate.....	77
Ryc. 5. Możliwe konfiguracje starterów stosowanych podczas kolonijnej PCR w celu analizy transformantów.....	81
Ryc. 6. Krzywa wzrostu gospodarza <i>G. stearothermophilus</i> 10 po infekcji bakteriofagem TP-84.....	87
Ryc. 7. Przykładowe płytki z widocznymi łysinkami bakteriofaga TP-84.....	88
Ryc. 8. Organizacja genomu bakteriofaga TP-84. Kolorem żółtym zaznaczone są geny kodujące białka strukturalne, których używano do stworzenia bibliotek genowych w niniejszej pracy.....	89
Ryc. 9. Sekwencje metek użytych podczas klonowania metodą RF wybranych genów bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pUC19.....	92
Ryc. 10. Projektowanie pary starterów hybrydowych dla genu 12 bakteriofaga TP-84 do plazmidu pUC19 podczas klonowania metodą RF.....	93
Ryc. 11. Analiza elektroforetyczna megastarterów M_TP84_06 (1673 pz), M_TP84_08 (2090 pz), M_TP84_12 (1073 pz), M_TP84_18 (602 pz), M_TP84_22 (780 pz), M_TP84_74 (590 pz).....	94
Ryc. 12. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR - transformantów otrzymanych po klonowaniu metodą RF.....	96
Ryc. 13. Plazmidy rekombinowane uzyskane podczas klonowania genów 6,12,18,22,74 bakteriofaga TP-84 do wektora pUC19, w formie natywnej oraz z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG na końcach 5' oraz 3' klonowanego genu.....	97
Ryc. 14. A. Rozdział elektroforetyczny megastarterów M_TP84_08' oraz M_TP86_08'' powielonych za pomocą PCR typu Touch-Down podczas klonowania tandemowego genu 8 bakteriofaga TP-84. B. Rozdział elektroforetyczny transformantów po klonowaniu metodą RF z użyciem megastarterów 8'.....	99
Ryc. 15. Analiza elektroforetyczna transformantów po klonowaniu fragmentu 8" genu 8 bakteriofaga TP-84 do plazmidu rekombinowanego pUC19-TP84_08'.....	100
Ryc. 16. A. Rozdział elektroforetyczny megastarterów M_TP84_08' oraz M_TP86_08'' z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG, na obu końcach genu. B. Rozdział produktów kolonijnej PCR C. Rozdział produktów kolonijnej PCR.....	101
Ryc. 17. Analiza elektroforetyczna transformantów po tandemowym klonowaniu RF fragmentu 8" genu 8 bakteriofaga TP-84, z dołączonymi znacznikami molekularnymi.....	103
Ryc. 18. Plazmidy rekombinowane uzyskane podczas tandemowego klonowania genu 8 bakteriofaga TP-84 do wektora pUC19, w formie natywnej oraz z dołączonymi sekwencjami kodującymi znaczniki molekularne His oraz FLAG na końcach 5' oraz 3' klonowanego genu.....	104
Ryc. 19. Zaprojektowane in silico trzy warianty klonowania metodą Gibsona genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ.....	107
Ryc. 20. Analiza elektroforetyczna ośmiu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R8), używanych podczas klonowania metodą Gibsona.....	108
Ryc. 21. Analiza elektroforetyczna plazmidu pBAC-lacZ.....	109
Ryc. 22. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R8.....	110
Ryc. 23. Analiza elektroforetyczna powielonych fragmentów genomu bakteriofaga TP-84.....	111
Ryc. 24. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheIcutB.....	112

Ryc. 25. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR plazmidów wyizolowanych z kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheIcutB.....	113
Ryc. 26. Schemat wyników sekwencjonowania klonu pBAC-lacZ-TP84_R1-PAM-EheI-cutB ...	114
Ryc. 27. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA	116
Ryc. 28. Analiza elektroforetyczna mieszanin reakcyjnych po reakcji Gibsona. Rozdział markera masy molekularnej High-Range (od 10000 pz do 50000 pz).....	118
Ryc. 29. Analiza elektroforetyczna preligowanych fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 przed reakcją Gibsona	119
Ryc. 30. Analiza elektroforetyczna produktów kolonijnej PCR kolonii uzyskanych po klonowaniu metodą Gibsona pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA z dodatkiem białka SSB.....	120
Ryc. 31. Schemat rozdziału in silico fragmentów powstałych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym BglI	121
Ryc. 32. Analiza elektroforetyczna wielkości fragmentów restrykcyjnych plazmidów pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gibsona z dodatkiem białka ET SSB	122
Ryc. 33. Zaprojektowane in silico klonowanie metodą Golden Gate genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ.....	124
Ryc. 34. Schemat plazmidu pBAC-lacZ zlinearyzowanego enzymami MauBI i HindIII.	125
Ryc. 35. Analiza elektroforetyczna ośmiu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R8) w dwóch powtórzeniach, używanych, jako wstawki podczas klonowania metodą Golden Gate	126
Ryc. 36. Analiza elektroforetyczna plazmidów i fragmentów DNA po klonowaniu metodą Golden Gate.....	127
Ryc. 37. Analiza elektroforetyczna czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1+ - R4+) powstałych po ligacji fragmentów R1-R8.....	129
Ryc. 38. Analiza elektroforetyczna fragmentów DNA i plazmidu po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+	130
Ryc. 39. Analiza elektroforetyczna plazmidów po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+.....	131
Ryc. 40. Analiza elektroforetyczna fragmentów DNA po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++ (R1+ + R2+), R2++ (R3+ + R4+)	133
Ryc. 41. Analiza elektroforetyczna plazmidów po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++ (R1+ + R2+), R2++ (R3+ + R4+)	134
Ryc. 42. Płytki po transfekcji protoplastów bakterii <i>G. stearothermophilus</i> 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84	137
Ryc. 43. Płytki po transfekcji protoplastów bakterii <i>G. stearothermophilus</i> 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84.....	138
Ryc. 44. Wizualne przedstawienie wyników sekwencjonowania NGS materiału genetycznego wyizolowanego z lysinek otrzymanych po przeprowadzeniu transfekcji protoplastów <i>G. stearothermophilus</i> 10 konstruktem złożonym z plazmidu pBAC-lacZ oraz genomu bakteriofaga TP-84 po reakcji Gibsona.....	139
Ryc. 45. Analiza elektroforetyczna dziewięciu fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 (R1-R6, 12_mod) w dwóch powtórzeniach, używanych, jako wstawki podczas klonowania metodą Gibsona genomu modyfikowanego	142
Ryc. 47. Klisze rentgenowskie z utrwalonym sygnałem świetlnym w postaci czarnych plamek, otrzymanym na powierzchni membran nitrocelulozowych podczas immunodetekcji z użyciem przeciwciał I-rzędowych anty-FLAG oraz przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową.....	144

Tabela 1. Spis szczepów bakteryjnych i bakteriofagów użytych w pracy	39
Tabela 2. Spis plazmidów użytych w pracy	40
Tabela 3. Spis oligonukleotydów użytych w pracy	40
Tabela 4. Enzymy restrykcyjne używane podczas realizacji badań.....	46
Tabela 5. Enzymy i odczynniki stosowane do PCR i do klonowania metodami Gibsona, Goden Gate oraz RF Cloning	47
Tabela 6. Odczynniki i materiały używane do elektroforezy agarozowej.....	48
Tabela 7. Bufory używane w pracy	48
Tabela 8. Pożywki i podłoża używane w pracy	49
Tabela 9. Antybiotyki użyte w pracy	50
Tabela 10. Ilości DNA oraz długości megastartera i konstruktów używanych do klonowania metodą RF	65
Tabela 11. Profil czasowo-termiczny pierwszej PCR Touch Down podczas klonowania metodą RF	67
Tabela 12. Profil czasowo-termiczny drugiej PCR przy klonowaniu metodą RF.	68
Tabela 13. Mieszanina reakcyjna do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymem restrykcyjnym ZraI	71
Tabela 14. Składy mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 z użyciem trzech różnych polimeraz.....	72
Tabela 15. Profil czasowo-termiczny zastosowany do PCR typu Touch Down podczas klonowania metodą Gibsona	72
Tabela 16. Mieszanina reakcyjna do trawienia plazmidu pBAC-lacZ enzymami restrykcyjnymi HindIII oraz MauBI	78
Tabela 17. Mieszanina reakcyjna do ligacji plazmidu pBAC-lacZ z fragmentami genomu bakteriofaga TP-84	79
Tabela 18. Profil czasowo-termiczny zastosowany do kolonijnej PCR.....	82
Tabela 19. Mieszanina reakcyjna do przeprowadzania analizy restrykcyjnej plazmidu pBAC-lacZ po transformacji.....	83
Tabela 20. Geny bakteriofaga TP-84 sklonowane do plazmidu pUC19 [4].....	90
Tabela 21. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem BglI plazmidów pBAC-lacZ+R1EheI-R3cutA wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gibsona z dodatkiem białka ET SSB.....	123
Tabela 22. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem BglI plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Golden Gate	128
Tabela 23. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem BglI plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Golden Gate z użyciem czterech fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1+, R2+, R3+, R4+	132
Tabela 24. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymem BglI plazmidów wyizolowanych z kolonii bakteryjnych po klonowaniu metodą Gate z użyciem dwóch fragmentów genomu bakteriofaga TP-84 R1++, R2++	135

10. Dorobek naukowy

Publikacje:

1. Jaroszewicz W, Bielańska P, Lubomska D, Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Grabowski Ł, Wieczerek E, Drózd W, Gaffke L, Pierzynowska K, Cyske Z, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Antimicrobial Activities of Compounds Produced by Newly Isolated Streptomyces Strains from Mountain Caves. *Med Sci Forum*. 2022; 12(1):7
2. Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G. Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiol Rev*. 2022;46(2):fuab052
3. Jaroszewicz W, Bielańska P, Lubomska D, Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Grabowski Ł, Wieczerek E, Drózd W, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activities of Compounds Produced by Newly Isolated Streptomyces Strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland). *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(10):1212
4. Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Jaroszewicz W, Lubomska D, Piechowicz L. Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms*. 2022;10(2):222
5. Kubiak K, Gaffke L, Pierzynowska K, Cyske Z, Grabowski L, Kosznik-Kwaśnicka K, Jaroszewicz W, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Determination of Effects and Mechanisms of Action of Bacterial Amyloids on Antibiotic Resistance. *Methods Mol Biol*. 2022;2538:189-205
6. Cyske Z, Jaroszewicz W, Żabińska M, Lorenc P, Sochocka M, Bielańska P, Grabowski Ł, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G. Unexplored potential: Biologically active compounds produced by microorganisms from hard-to-reach environments and their applications. *Acta Biochim Pol*. 2021;68(4):565-574

Doniesienia konferencyjne:

1. Jaroszewicz W, Kosznik-Kwaśnicka K, Lubomska D, Węgrzyn A. (10 czerwca 2022). Characterization, Antifungal, and Antibacterial Activity of Bacteria Isolated from the Szczelina Chochołowska Cave Moonmilk Deposits (Tatra Mountains, Poland) [Prezentacja posteru]. *International Sopot Youth Conference 2022 "Where the World is Heading"*, Sopot (Polska)
2. Jaroszewicz W, Lubomska D, Dłuszcakowska K, Kosznik-Kwaśnicka K, Węgrzyn A. (7 czerwca 2019). Morphology and biofilm forming ability of Actinobacteria isolated from moonmilk samples derived from the Chochołowska Cave located in the Tatra Mountains in Poland [Prezentacja posteru]. *IV International Sopot Youth Conference "Where the World is heading?"*, Sopot (Polska)
3. Jaroszewicz W, Lubomska D, Sobiecki J, Kosznik-Kwaśnicka K, Węgrzyn A. (9-11 kwietnia 2019). Effects of different isolation media on the efficiency of bacterial recovery from moonmilk samples derived from Tatra caves in Poland [Prezentacja ustna]. *XV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and Progress of Biology"*, Lwów (Ukraina)

4. Jaroszewicz W, Lubomska D, Sobiecki J, Kosznik-Kwaśnicka K, Węgrzyn A. (10-12 października 2018). Various methods of isolation and characterization of Actinobacteria isolated from caves in the Tatra mountains [Prezentacja posteru]. *4th Congress of Baltic Microbiologists (CBM 2018)*, Gdańsk (Polska)
5. Morcinek-Orłowska J, Jaroszewicz W, Sobolewski I, Łubkowska B, Adamowicz K, Skowron P, Węgrzyn G. (18-22 lipca 2022). Construction of a novel phage display system based on thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* phage TP84 [Współautorstwo, poster]. *Viruses of Microbes 2022*, Guimarães (Portugalia)
6. Węgrzyn G, Jaroszewicz W, Bielańska P, Lubomska D, Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Grabowski Ł, Wieczerek E, Drózd W, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn A. (15-30 czerwca 2022). Antimicrobial Activities of Compounds Produced by Newly Isolated *Streptomyces* Strains from Mountain Caves [Współautorstwo, prezentacja ustna]. *2nd International Electronic Conference on Antibiotics-Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance*, Basel (Szwajcaria)
7. Dłuszczakowska K, Jaroszewicz W, Kosznik-Kwaśnicka K, Węgrzyn A. (7 czerwca 2019). Antibacterial properties of Actinobacteria [Współautorstwo, prezentacja ustna]. *IV International Sopot Youth Conference "Where the World is heading?"*, Sopot (Polska)
8. Sobiecki J, Lubomska D, Jaroszewicz W, Kosznik-Kwaśnicka K, Węgrzyn A. (10-12 października 2018). On the way to re-overcome pathogens [Współautorstwo, poster]. *4th Congress of Baltic Microbiologists (CBM 2018)*, Gdańsk (Polska)
9. Sobiecki J, Lubomska D, Jaroszewicz W, Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Węgrzyn A. (25 maja 2018). Antimicrobial *Streptomyces* strains from cave microbiota: a potential source for new drugs [Współautorstwo, prezentacja posteru]. *III International Sopot Youth Conference "Where the World is heading?"*, Sopot (Polska)

Udział w projektach grantowych:

Wykonawca w grantie NCBR nr. TECHMATSTRATEG2/410747/11/NCBR/2019 (w latach 2020-2022), pt.: „Systemy nowej generacji dostarczania molekuł bioaktywnych w syntetyzowanych chemicznie i poddanych inżynierii genetycznej nanobiomateriałach” (akronim BIONANOVA) realizowanego w ramach programu strategicznego „NOWOCZESNE TECHNOLOGIE MATERIAŁOWE” TECHMATSTRATEG.