

ABSTRACT

The main purpose of this project is to create an artificial RNA polymerase that can read DNA with artificial nucleotides. This polymerase could then be used in the viral therapy of cancer to control the biosynthesis of viral genome to solve the main problem of this treatment – the uncontrolled reproduction of viruses. Using computational calculation methods 28 mutant forms of RNA polymerase were analyzed and selected. The capability of these mutants to read DNA with artificial nucleotides was determined.

Основная цель проекта - создание РНК полимеразы, которая может считывать ДНК с искусственным нуклеотидами. Такие полимеразы могут быть использованы для контроля биосинтеза вирусного генома, что поможет решить основную проблему такого лечения - негативные последствия, вызванные неконтролируемым размножением вирусов. При помощи вычислительных методов, были подобраны 28 мутантных форм РНК полимеразы. Также была исследована способность этих полимераз считывать ДНК с искусственными нуклеотидами.

Selection of optimal protein translation conditions

Capping is an essential process of RNA modification but it occurs only in eukaryotic cells. Finding out if capping was necessary for in vitro systems and especially for future work was very important. Western blotting with uncapped and capped wild type T7 RNA polymerase showed that the time of translation and capped end of RNA are critical factors (Fig. 1). Further on taking into account the amount of time and capping will be needed to provide better conditions for translation in vitro.

Кэпирование является необходимым процессом модификации РНК, но встречается только в эукариотических клетках. Поэтому определить, необходимо ли кэпирование для in vitro систем, стало важной задачей для будущей работы. Вестерн блот для кэпированной и некэпированной T7 РНК полимеразы дикого типа показал, что время трансляции и кэпированность конца РНК являются существенными факторами (Рис. 1). В дальнейшей стоит учитывать и время, и кэпированность РНК, чтобы обеспечить лучшие условия для трансляции in vitro.

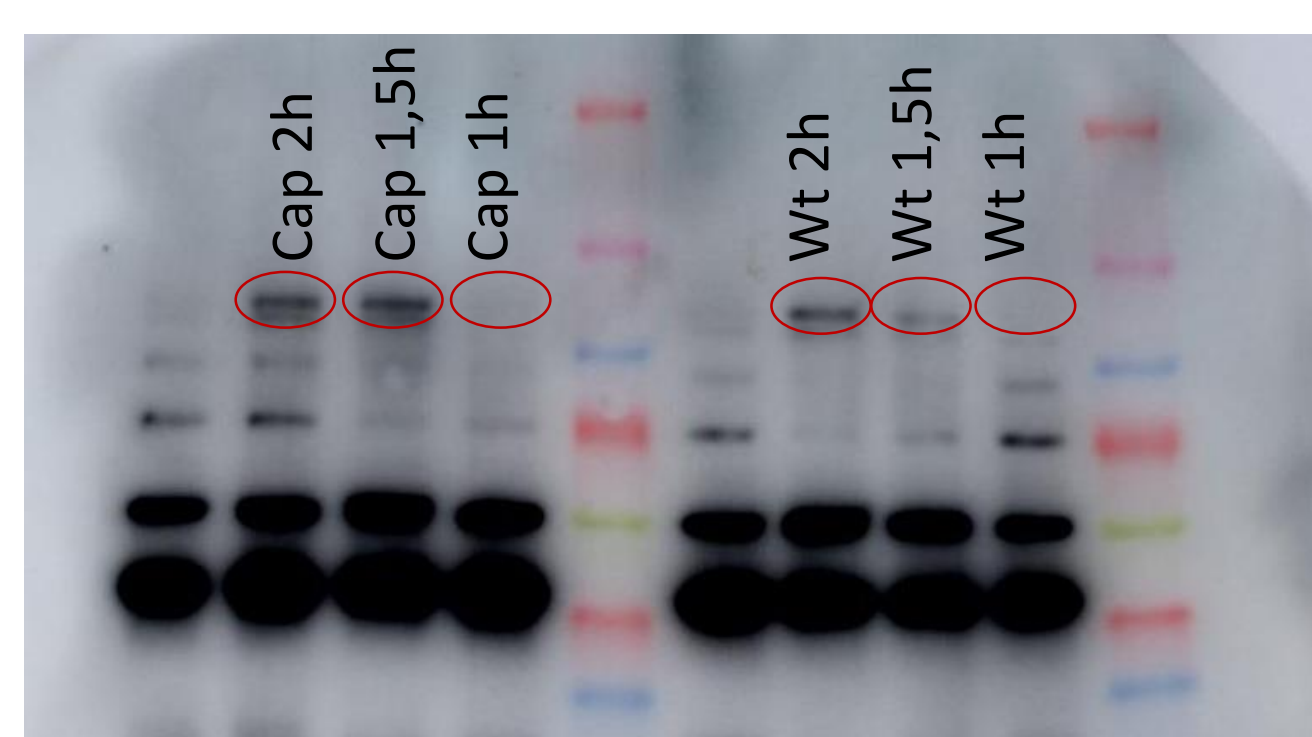


Fig. 1. Western blotting result. Lines inside red ovals match the weight of T7 RNA polymerase.

Рис. 1. Результат вестерн блота. Линии внутри красных овалов соответствуют весу T7 РНК полимеразы.

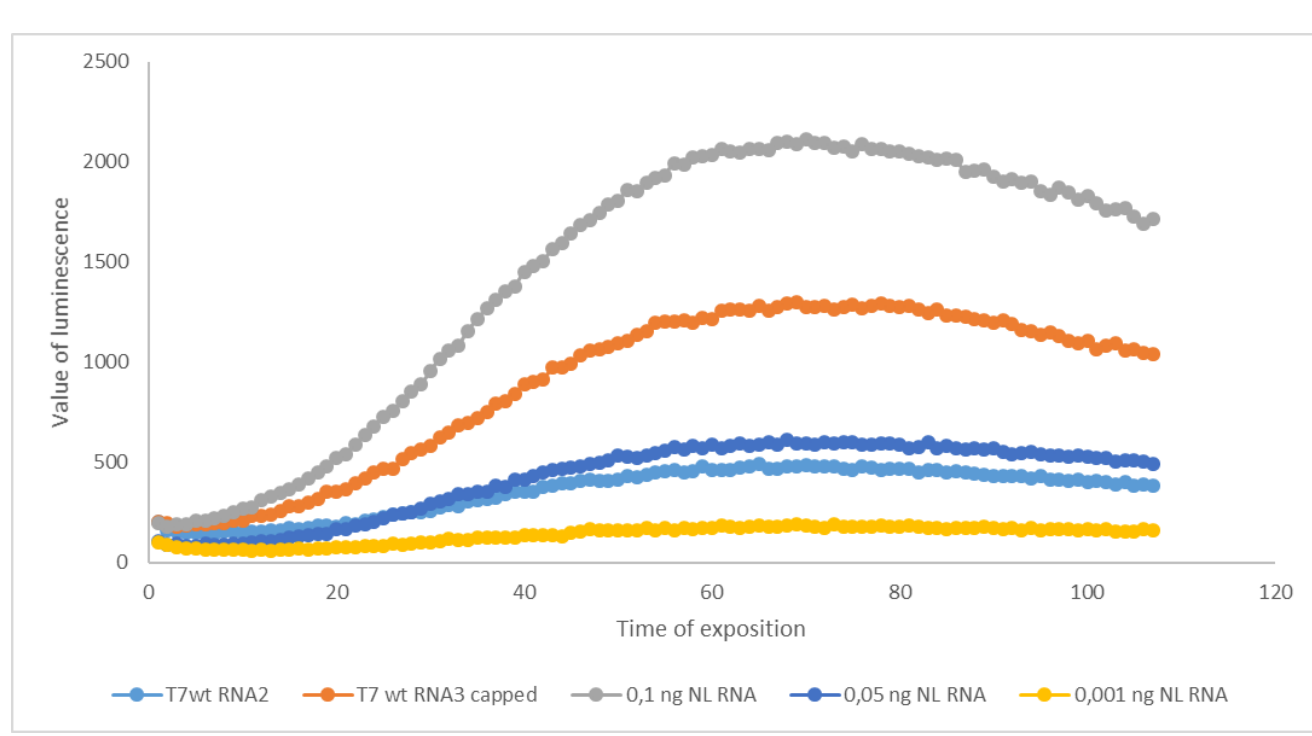


Fig. 2. Luminescence measurement results on the production of nanoluciferase to contrast capped and uncapped T7wt RNA.

Рис. 2. Сравнение кэпированной и некэпированной T7 РНК полимеразы, используя данные люминесцентного измерения.

SUMMARY

- Optimal protein translation conditions in vitro were determined using wild type T7 RNA polymerase.
- Were reproduced all steps of protein biosynthesis required for obtaining mutant T7 RNA polymerase.
- 28 mutant T7 RNA polymerases were obtained. Transcription efficiency of new polymerases were defined.
- Определены оптимальные условия трансляции in vitro на примере РНК полимеразы дикого типа.
- Воспроизведены все этапы белкового биосинтеза, необходимые для получения мутантов РНК полимеразы.
- Получили 28 мутантных форм T7 РНК полимеразы. Определили эффективность транскрипции новых мутантных форм T7 РНК полимеразы.

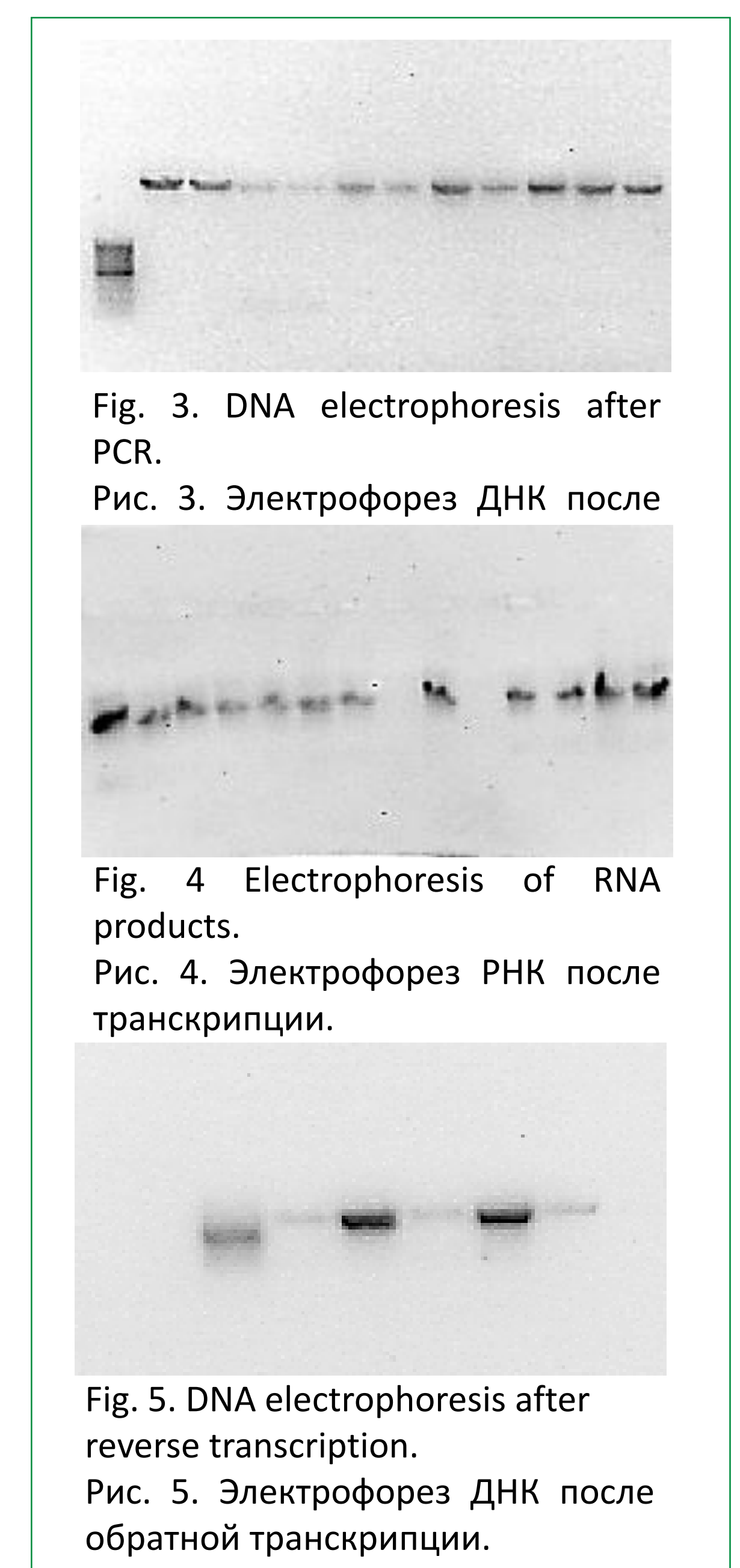
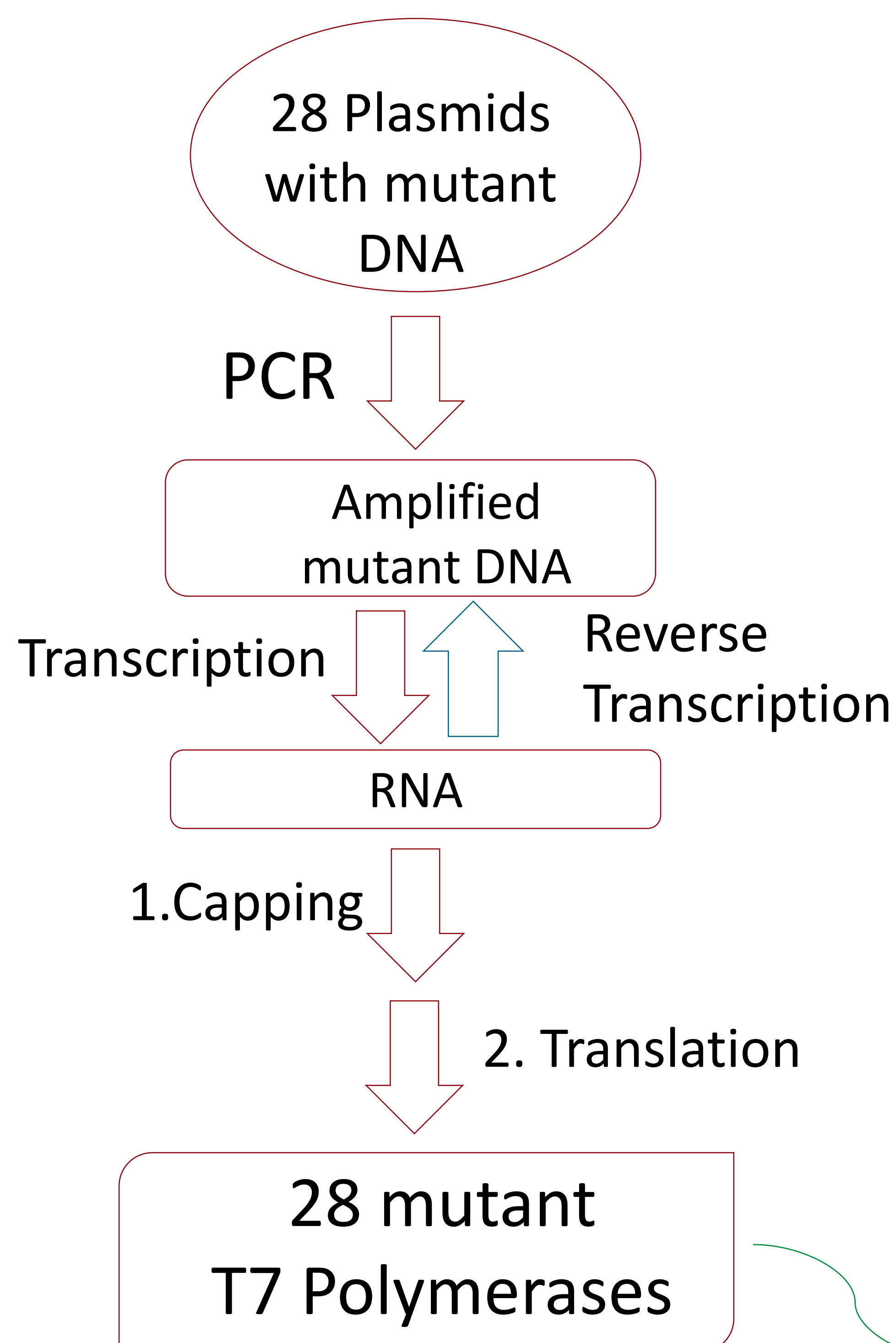


Fig. 3. DNA electrophoresis after PCR.

Рис. 3. Электрофорез ДНК после

Fig. 4. Electrophoresis of RNA products.

Рис. 4. Электрофорез РНК после транскрипции.

Fig. 5. DNA electrophoresis after reverse transcription.

Рис. 5. Электрофорез ДНК после обратной транскрипции.

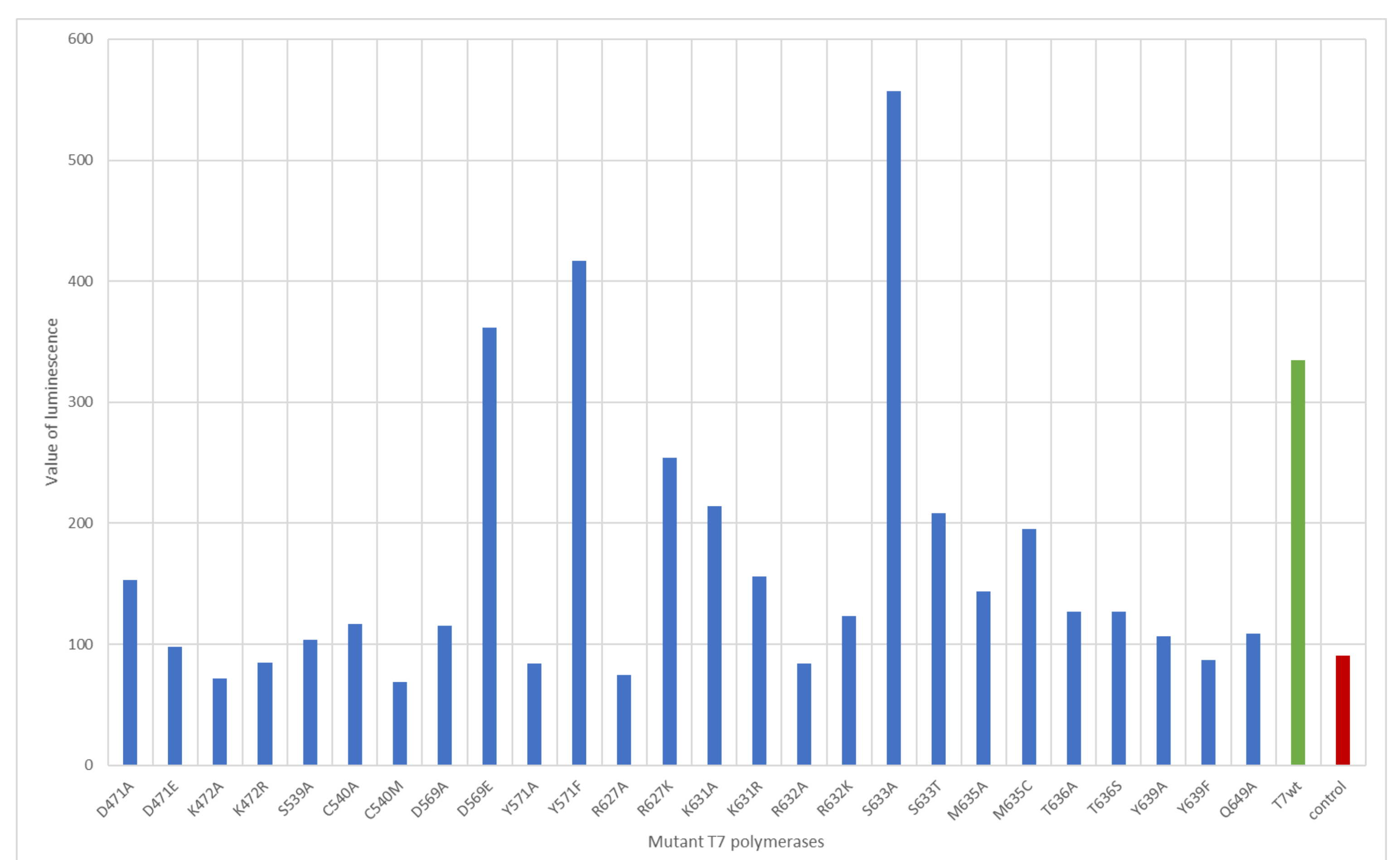
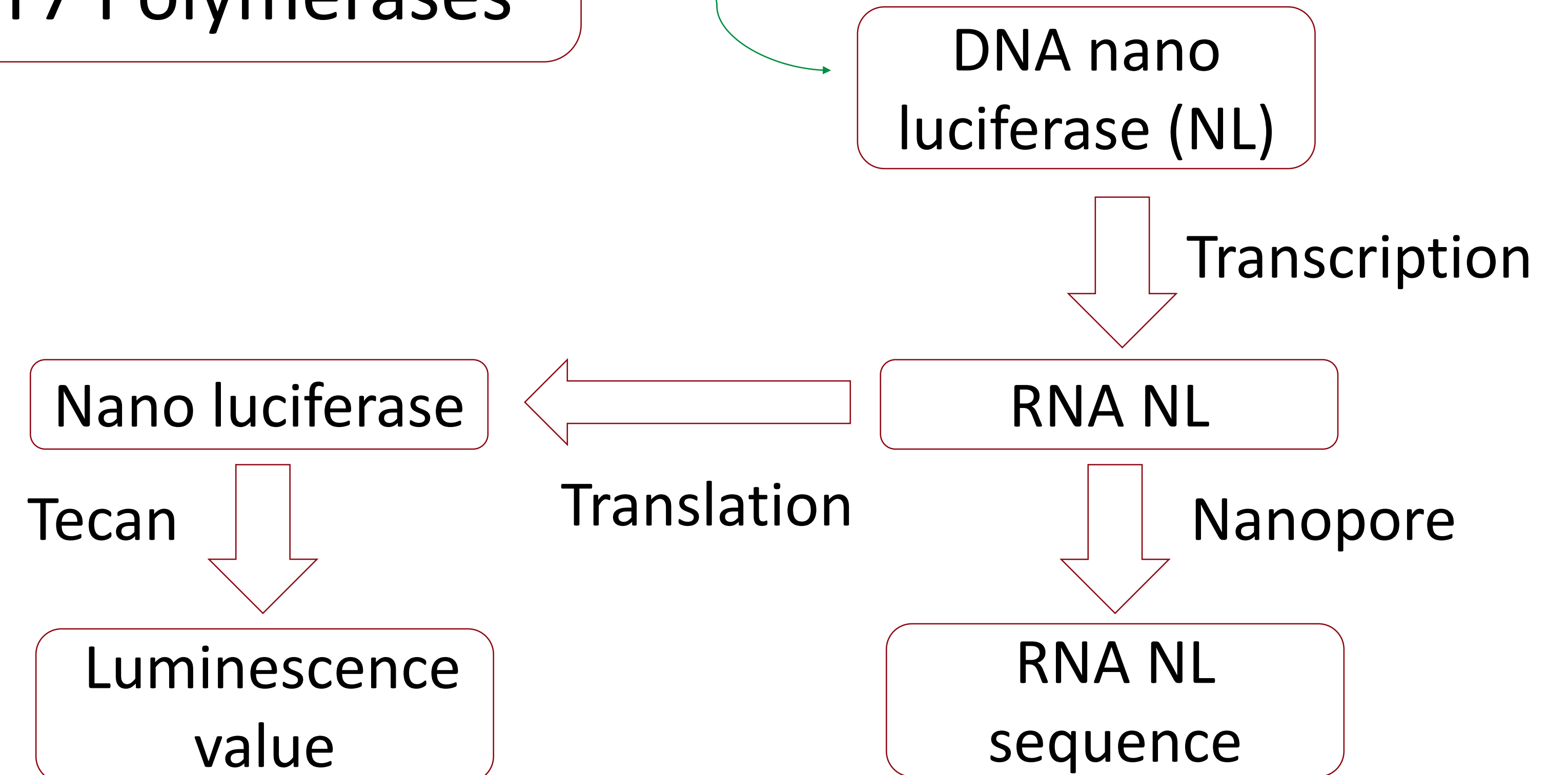


Fig 6. Value of luminescence of nanoluciferase produced by RNA transcription using different T7 mutant polymerases.

Рис. 6. Уровень люминесценции нанолуциферазы, полученной после РНК транскрипции разными мутантными T7 РНК полимеразы.

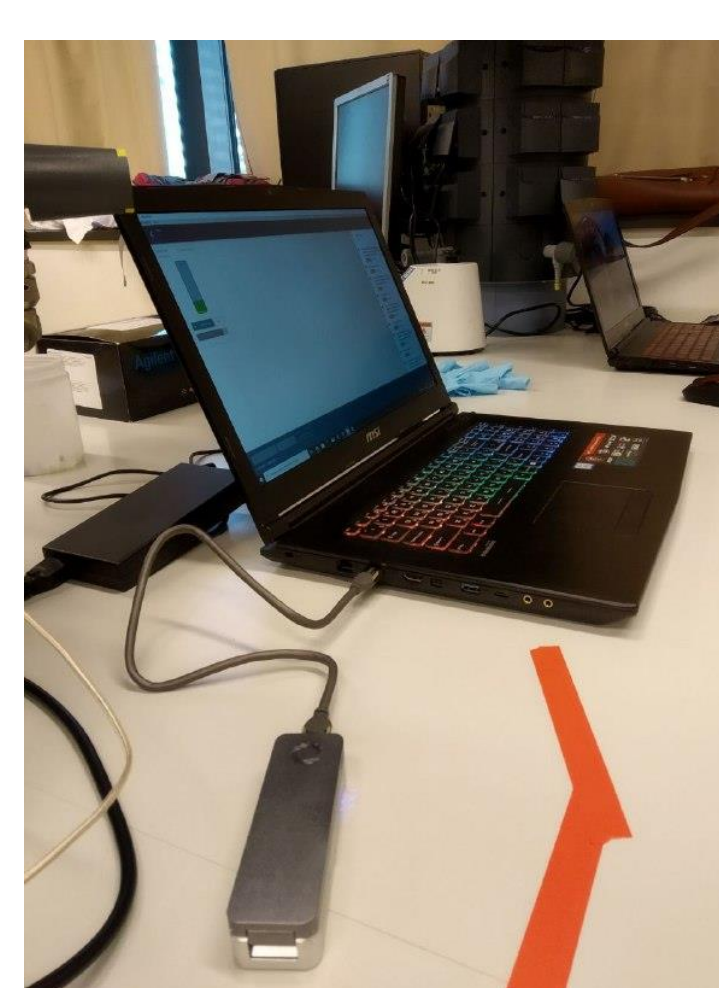


Fig 7. Super cool sequencer.

Рис. 7. Многофункциональный секвенатор

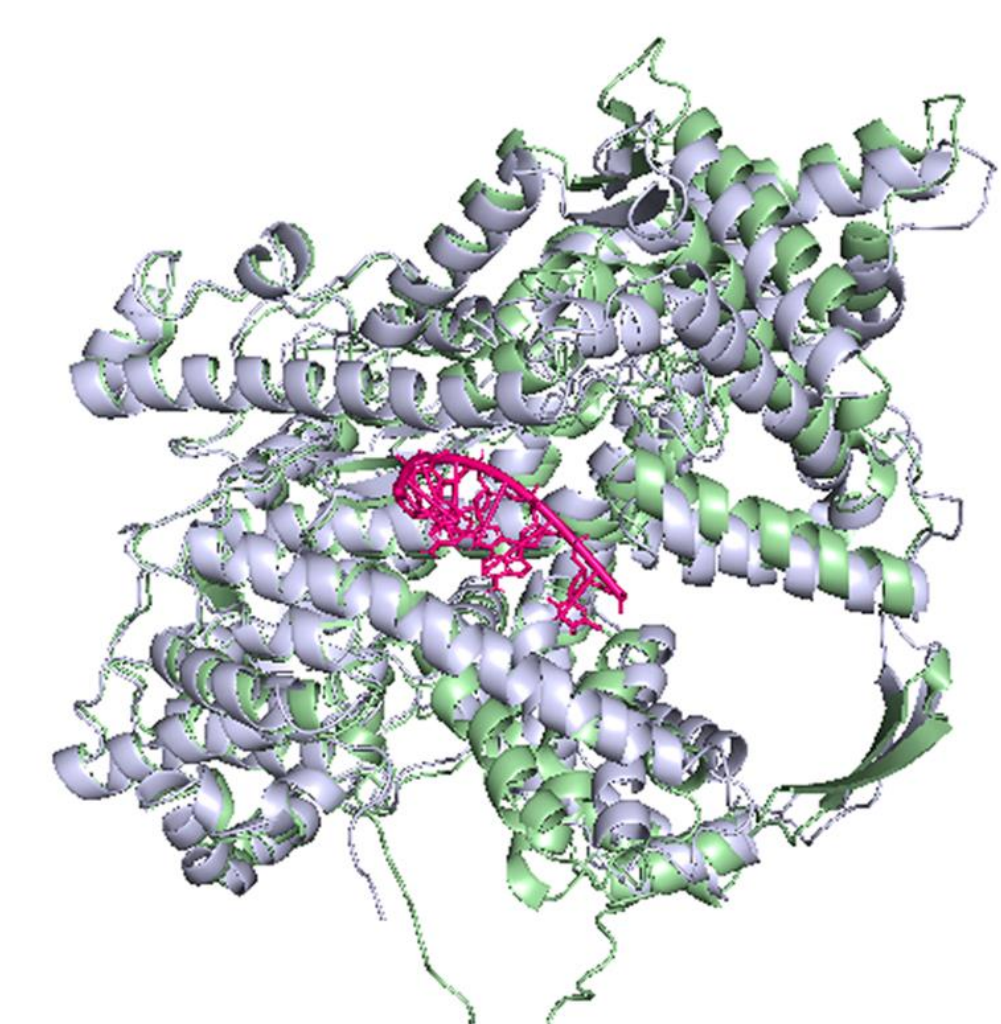


Fig 8. Mutant T7 RNA polymerase.

Рис. 8 Мутантная T7 РНК полимеразы.