

Związki Polifluoroalkilowe (PFAS) to grupa syntetycznych związków chemicznych szeroko stosowanych w przemyśle i produktach konsumenckich. Cechują się wyjątkową stabilnością chemiczną, przez co są trudne do rozkładu, co powoduje ich długotrwałą obecność w środowisku i bioakumulację w organizmach.

1. Charakterystyka PFAS

- 1) PFAS zawierają atomy fluoru przyłączone do łańcucha węglowego, tworząc bardzo stabilne wiązania węgiel-fluor (C-F).
 - a. **Stabilność chemiczna:** Wiązania C-F są jednymi z najsilniejszych wiązań kowalencyjnych, co czyni PFAS odpornymi na rozkład biologiczny i chemiczny.
 - b. **Właściwości hydrofobowe i lipofobowe:** PFAS odpychają wodę i tłuszcze, co jest przydatne w produktach przemysłowych.
 - c. **Zastosowanie w przemyśle:** Są szeroko stosowane w produktach takich jak odzież, naczynia kuchenne, farby, środki gaśnicze.

2. Problemy środowiskowe i zdrowotne PFAS

- 1) PFAS są znane jako „wieczne chemikalia” (ang. *forever chemicals*) ze względu na ich trudność w rozkładzie i trwałość w środowisku.
 - a. **Bioakumulacja:** PFAS kumulują się w tkankach organizmów, przez co mogą przenikać przez łańcuch pokarmowy.
 - b. **Wpływ na zdrowie:** Badania wskazują na ich powiązania z zaburzeniami hormonalnymi, problemami immunologicznymi oraz zwiększonym ryzykiem nowotworów.
 - c. **Zanieczyszczenie środowiska:** PFAS występują w wodach gruntowych, rzekach oraz organizmach żywych, co sprawia, że stanowią zagrożenie dla ekosystemów.

3. Degradacja PFAS przez mikroorganizmy

- 1) Badania nad mikroorganizmami zdolnymi do degradacji PFAS koncentrują się na wykorzystaniu bakterii i grzybów.
- 2) Przykłady mikroorganizmów:
 - a. **Bakterie glebowe:** Bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, które są w stanie częściowo przekształcać PFAS.
 - b. **Grzyby glebowe:** Grzyby z rodzaju *Phanerochaete*, które posiadają enzymy (lakazy, peroksydazy) zdolne do degradacji związków organicznych.
 - c. **Konsorcja mikrobiologiczne:** Różne mikroorganizmy mogą działać synergicznie, umożliwiając etapowy rozkład PFAS.

Enzymy Potencjalnie Uczestniczące w Degradacji PFAS to grupa enzymów, które mogą rozkładać trwałe wiązania węgiel-fluor (C-F) w PFAS. Badania nad tymi enzymami koncentrują się na ich zdolności do transformacji lub częściowej degradacji PFAS.

1. Dehalogenazy

- 1) **Charakterystyka:** Dehalogenazy są enzymami zdolnymi do usuwania atomów halogenów (np. fluoru) z cząsteczek organicznych. Ich prosta struktura i nieskomplikowane centrum aktywne sprawiają, że są obiecujące dla degradacji PFAS.
- 2) **Przykład:** Dehalogenazy haloalkanowe, takie jak *DhaA* z *Xanthobacter autotrophicus*, są stosowane do rozkładu pochodnych PFAS.

2. Oksydoreduktazy (np. Peroksydazy i Lakazy)

- 1) **Charakterystyka:** Oksydoreduktazy katalizują reakcje redoks, które mogą rozkładać stabilne wiązania w związkach organicznych. Działają w obecności reagentów, takich jak nadtlenuk wodoru.
- 2) **Przykład:** Peroksydaza chrzanowa (HRP) i lakazy z grzybów, takich jak *Phanerochaete chrysosporium*, są stosowane w badaniach nad degradacją związków fluoroorganicznych.

3. Hydrolazy Amidowe

- 1) **Charakterystyka:** Hydrolazy amidowe rozkładają wiązania amidowe w cząsteczkach, co jest przydatne w degradacji PFAS zawierających grupy amidowe.
- 2) **Przykład:** Amidohydrolazy mogą być stosowane do rozkładu pochodnych PFAS, które posiadają grupy amidowe, umożliwiając częściową degradację.

4. Monooksygenazy i Dioksygenazy

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy te katalizują reakcje wprowadzania tlenu do związków organicznych, co ułatwia rozkład struktury węglowej.
- 2) **Przykład:** Monooksygenazy podobne do P450 (cytochrom P450) są stosowane w modyfikacjach fluoroorganicznych związków, chociaż ich skuteczność jest ograniczona w pełnej degradacji PFAS.

5. Projektowane Enzymy i Enzymy Syntetyczne

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy modyfikowane genetycznie oraz enzymy syntetyczne są projektowane, aby rozkładać trwałe wiązania C-F. Dzięki inżynierii białek możliwe jest modyfikowanie miejsc aktywnych w celu poprawienia aktywności degradacyjnej.
- 2) **Zastosowanie:** Zastosowanie syntetycznych enzymów jest obiecującą metodą degradacji PFAS, szczególnie przy pochodnych związkach fluoroorganicznych.

Dehalogenaza Haloalkanowa (DhaA) jest enzymem odpowiedzialnym za usuwanie atomów halogenów z organicznych związków chemicznych. Enzym ten jest stosowany w badaniach nad biodegradacją i biotransformacją związków fluoro- i chloroorganicznych, które są trudne do rozkładu [6].

1. Opis Białka i Struktura

- 1) Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) pochodzi z bakterii *Xanthobacter autotrophicus*.
- 2) Enzym składa się z ****293 aminokwasów**** i ma masę cząsteczkową około 33 kDa [6].
- 3) Struktura przestrzenna DhaA należy do klasy α/β -hydrolaz i zawiera charakterystyczny fałd α/β z helisami i arkuszami β , które tworzą stabilny rdzeń białka [15].
- 4) Struktura dzikiego typu DhaA jest dostępna w bazie danych PDB pod identyfikatorem ****4E46****, co stanowi istotny punkt odniesienia w analizie mutantów tego enzymu [6].

2. Centrum Katalityczne

- 1) Centrum aktywne DhaA zawiera triadę katalityczną, typową dla enzymów z klasy α/β -hydrolaz.
 - a. **Triada katalityczna** składa się z trzech kluczowych reszt aminokwasowych: seryny (Ser145), kwasu asparaginowego (Asp176) oraz histydyny (His272) [11].
 - b. W reakcji dehalogenacji seryna działa jako nukleofil, który atakuje substrat, inicjując reakcję rozszczepienia wiązania C-Hal (np. C-Cl lub C-F).
- 2) W centrum aktywnym występuje także kieszeń hydrofobowa, która stabilizuje hydrofobowe fragmenty substratu, ułatwiając jego wiązanie i rozkład [7].

3. Kofaktory i Wymagania

- 1) Enzym nie wymaga dodatkowych kofaktorów, co czyni go stosunkowo łatwym do syntezy i użycia w systemach ekspresji heterologicznej, takich jak *E. coli* [6].
- 2) Optymalna aktywność DhaA występuje w obecności jonów sodu i potasu, które stabilizują strukturę białka i centrum aktywne.

4. Dostępne Mutanty DhaA

- 1) W celu zwiększenia aktywności i specyficzności DhaA dla różnych substratów, opracowano szereg mutantów tego enzymu.
 - a. **DhaA80 (mutacja T148L/W264F)**: Wykazuje wyższą specyficzność wobec związków chloroorganicznych i jest stabilniejsza termicznie niż typ dziki. Struktura tego mutantu jest dostępna w bazie PDB pod identyfikatorem ****7O8B**** [16].
 - b. **DhaA31 (mutacja T148L/Y273F)**: Zwiększona aktywność w dehalogenacji krótszych alkanów fluoroorganicznych [16].
 - c. **DhaA115 (mutacja T148L/W264F/L175A)**: Ta mutacja sprawia, że enzym jest bardziej stabilny i wykazuje zwiększoną aktywność w szerszym zakresie pH, co czyni go użytecznym do zastosowań przemysłowych [11].

Podsumowanie: Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) jest wszechstronnym enzymem stosowanym w biodegradacji związków halogenowych. Zarówno struktura dzikiego typu (4E46), jak i mutanty, takie jak DhaA80 (7O8B), stanowią cenne obiekty do badań mechanizmu działania tego enzymu oraz jego wykorzystania w zastosowaniach przemysłowych [6, 15, 16].

Protokół eksperymentalny: Pomiar efektywności pracy dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) przy użyciu spektrofotometru. Eksperyment umożliwia ocenę parametrów kinetycznych enzymu, takich jak V_{\max} i K_m , poprzez pomiar szybkości reakcji dehalogenacji halogenowanego substratu [3].

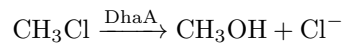
1. Cel eksperymentu

- 1) Ocena efektywności katalitycznej dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) poprzez pomiar szybkości dehalogenacji substratu halogenowanego [16].
- 2) Uzyskanie parametrów kinetycznych enzymu, takich jak V_{\max} i K_m [2].

2. Wybór Substratu

- 1) Przykładowy substrat: chlorometan (CH_3Cl) lub 1-chlorobutan, który ulega dehalogenacji przez enzym DhaA [3].

- 2) Reakcja:



- 3) Anion chlorkowy (Cl^-) tworzy produkt, którego wzrost stężenia można monitorować spektrofotometrycznie [2].

3. Przygotowanie odczynników i roztworów

- 1) **Roztwór substratu:** Przygotowany w buforze fosforanowym o pH optymalnym dla działania enzymu (zwykle pH 7-8) [16].
- 2) **Roztwór enzymu:** Roztwór oczyszczonego enzymu DhaA w buforze, o stężeniu dostosowanym do widocznej zmiany absorbancji [3].
- 3) **Bufor reakcyjny:** Bufor fosforanowy o odpowiednim pH dla maksymalnej aktywności enzymu.

4. Ustawienie Spektrofotometru

- 1) Długość fali: Ustaw spektrofotometr na 240 nm, co odpowiada maksymalnej absorbancji anionu chlorkowego (Cl^-) [2].

5. Procedura pomiarowa

- 1) **Przygotowanie próbki kontrolnej:** Zmieszaj substrat z buforem bez dodatku enzymu, aby wyeliminować absorbancję substratu.
- 2) **Przygotowanie próbki badanej:**
 - a. Do kuwety spektrofotometrycznej dodaj roztwór substratu i enzymu w buforze.
 - b. Dokładnie zmieszaj i natychmiast umieść w spektrofotometrze.
- 3) **Pomiar absorbancji:**
 - a. Mierz zmianę absorbancji co 15 sekund przez okres 5-10 minut.
 - b. Monitoruj zmniejszanie absorbancji substratu lub wzrost absorbancji produktu (anionu chlorkowego) [2].

6. Obliczenia

- 1) **Szybkość reakcji:** Oblicz początkową szybkość reakcji (V_0) jako zmianę absorbancji w jednostce czasu ($\Delta A/\Delta t$) [2].

- 2) **Parametry V_{\max} i K_m :** Dla różnych stężeń substratu wykonaj wykres Lineweavera-Burka lub krzywą Michaelisa-Menten w celu obliczenia V_{\max} i K_m .

7. Interpretacja wyników

- 1) Wyższe V_{\max} oznacza wyższą maksymalną szybkość reakcji, a niższe K_m wskazuje na wyższe powinowactwo enzymu do substratu [16].

8. Kontrole i powtarzalność

- 1) Powtórz eksperyment dla różnych stężeń enzymu i w różnych warunkach pH oraz temperatury, aby ocenić stabilność i optymalne warunki aktywności enzymu [3].

Ekspresja białka dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) w *E. coli* z użyciem plazmidu pET-28a. Ekspresję białka dzikiego typu DhaA oraz jego mutantów można przeprowadzić z użyciem szczepu *Escherichia coli* BL21(DE3) oraz wektora ekspresyjnego pET-28a, co umożliwia wysoką wydajność i kontrolowaną ekspresję białka [18].

1. Szczep *Escherichia coli* BL21(DE3)

- 1) **Genotyp:** BL21(DE3) zawiera insercję *T7 RNA polymerase* pod kontrolą promotora *lacUV5*, co pozwala na kontrolowaną ekspresję genów umieszczonych za promotorem *T7* na plazmidach pET [4].
- 2) **Indukcja ekspresji:** Ekspresję można indukować za pomocą IPTG (izopropyl--D-tiogalaktopiranozydu), który odblokowuje promotor *T7*, inicjując produkcję białka [9].
- 3) **Zastosowania:** Dzięki niskiemu poziomowi proteaz oraz wysokiej wydajności translacji BL21(DE3) jest szeroko stosowany do ekspresji rekombinowanych białek w warunkach laboratoryjnych.

2. Wektor pET-28a dla ekspresji białka DhaA i jego mutantów

- 1) **Promotor T7:** pET-28a posiada promotor T7, który jest specyficznie aktywowany przez polimerazę T7, umożliwiając precyzyjną i wysoką ekspresję białka w szczepach zawierających *T7 RNA polymerase* (jak BL21(DE3)) [18].
- 2) **Znacznik His-tag:** pET-28a umożliwia fuzję białka z heksamerycznym znacznikiem histydynowym (His-tag) na końcu N- lub C-terminalnym, co ułatwia oczyszczanie białka za pomocą chromatografii na kolumnie niklowej [10].
- 3) **Miejsce MCS (Multiple Cloning Site):** Plazmid pET-28a posiada miejsce MCS, które umożliwia łatwe wstawienie genu kodującego DhaA lub jego mutanty.
- 4) **Selekcja antybiotykowa:** pET-28a zawiera gen oporności na kanamycynę, co ułatwia selekcję kolonii *E. coli* z plazmidem [9].

3. Procedura klonowania i ekspresji

- 1) **Klonowanie genu:** Gen kodujący białko DhaA (dzikie lub zmutowane) zostaje wstawiony do wektora pET-28a przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych i ligazy.
- 2) **Transformacja:** Zrekombinowany plazmid jest transformowany do szczepu *E. coli* BL21(DE3) za pomocą elektroporacji lub chemicznie kompetentnych komórek [14].
- 3) **Indukcja ekspresji:** Po uzyskaniu transformantów hodowlę wprowadza się do środowiska z IPTG, co indukuje ekspresję genu pod promotorem T7.
- 4) **Oczyszczanie białka:** Białko można łatwo oczyścić dzięki obecności znacznika His-tag za pomocą chromatografii afinacyjnej na kolumnie niklowej [10].

Szczegółowy opis sekwencji w plazmidzie pET28a(+)

1. Promotor T7

- 1) Promotor T7 jest miejscem inicjacji transkrypcji przez polimerazę RNA T7, umożliwiając wysokopoziomową ekspresję genów.
- 2) **Lokalizacja:** complement(368..386) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

- 4) Szczegóły procesu transkrypcji:

- a. Ponieważ promotor T7 znajduje się na nici antysensownej (-), nie pełni funkcję matrycy dla procesu transkrypcji.
- b. Polimeraza RNA T7 odczytuje sekwencję tej nici matrycowej (antysensownej) w kierunku 3' → 5'.
- c. W wyniku transkrypcji syntetyzowane mRNA jest komplementarne do nici antysensownej i powstaje w kierunku 5' → 3'.
- d. Sekwencja mRNA jest identyczna (z wyjątkiem zamiany tyminy na uracyl) z nicią sensowną (+), która koduje białko.

- 5) **Inne promotory i miejsca inicjacji transkrypcji:**

5'	*	3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGGAGA	
K11	AATTAGGGCACACTATAGGGAGA	
SP6	ATTACGACACACTATAGAAGAA	
	bind-----	
	-----init	

Transkrypcja rozpoczyna się przy oznaczonym gwiazdką guaninie [13].

2. Operator *lac*

- 1) Operator *lac* jest miejscem wiązania represora LacI, co hamuje transkrypcję w nieobecności induktora [8].
- 2) **Lokalizacja:** complement(343..367) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-AATTGTGAGCGGATAACAATT-3'

3. Miejsce wiązania rybosomu (RBS)

- 1) RBS jest sekwencją umożliwiającą wiązanie rybosomu i inicjację translacji.
- 2) **Lokalizacja:** complement(306..328) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-AGGAGATATACAT-3'

4. Miejsce startu translacji

- 1) Kodon start (ATG) inicjuje translację białka.
- 2) **Lokalizacja:** complement(289) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3')**:

5'-ATG-3'

5. Znaczniki His₆-tag (sześciokrotny histydynowy tag)

- 1) Znacznik His₆ umożliwia oczyszczanie białka za pomocą chromatografii na kolumnie niklowej [5].
- 2) **Lokalizacje:**
 - complement(140..157) (N-końcowy, (-))
 - complement(270..287) (C-końcowy, (-))
- 3) **Sekwencja aminokwasowa:** HHHHHH

6. Miejsce cięcia trombiny

- 1) Umożliwia specyficzne usunięcie znacznika His₆ przez enzym trombinę.
- 2) **Lokalizacja:** complement(243..260) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja aminokwasowa:** LVPRGS
- 4) **Sekwencja DNA (5' → 3')**:

5'-CTGGTGCCGCGCGCAGC-3'

7. Region terminacji T7

- 1) Sekwencja terminacyjna zapewnia zakończenie transkrypcji przez polimerazę RNA T7 [17].
- 2) **Lokalizacja:** complement(26..73) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3')**:

5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

8. Gen oporności na kanamycynę (Kan^R)

- 1) Koduje aminoglikozydową fosfotransferazę, zapewniając oporność na kanamycynę [12].
- 2) **Lokalizacja:** 3995..4807 (na nici sensownej, (+))
- 3) **Sekwencja aminokwasowa:** MSHIQRETSCSRPRLNSNMDADLYGYKWARDNVGQSGATIYRLYGKPDAPFLKHKGSVA...

9. Region inicjacji replikacji (*ori*)

- 1) Region *ori* typu ColE1/pMB1/pBR322/pUC odpowiedzialny za replikację plazmidu [19].
- 2) **Lokalizacja:** complement(3285..3873) (na nici antysensownej, (-))

10. Gen *lacI*

- 1) Koduje represor LacI, hamujący ekspresję genów pod kontrolą operatora *lac* [8].
- 2) **Lokalizacja:** 773..1852 (na nici sensownej, (+))

- 3) **Sekwencja aminokwasowa:** VKPVTLYDVAEYAGVSYQTVSRVNVQASHVSAKTREKVEAAMAEL . . .

11. Gen *rop*

- 1) Koduje białko Rop, stabilizujące liczbę kopii plazmidu [1].
- 2) **Lokalizacja:** 2664 . . 2852 (na nici sensownej, (+))
- 3) **Sekwencja aminokwasowa:**

VTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLLEKLNELDADEQADICESLHDADELYRSCLARFGDDGENL

12. Miejsce MCS (Multiple Cloning Site)

- 1) MCS zawiera wiele unikalnych miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych, umożliwiając klonowanie genu *dhaA*.
- 2) **Lokalizacja:** Obejmuje region około complement (140 . . 300) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Enzymy restrykcyjne i ich miejsca cięcia:**
 - **NcoI:** CCATGG
 - **EcoRI:** GAATTC
 - **HindIII:** AAGCTT
 - **BamHI:** GGATCC
- 4) **Sekwencje DNA w MCS (5' → 3'):**

5'-GGTACCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCC-3'

Wyjaśnienie orientacji nici:

W plazmidzie pET-28a promotor T7 jest zlokalizowany na nici antysensownej ((-)), co oznacza, że transkrypcja zachodzi w kierunku przeciwnym do sekwencji podanej w GenBanku. W praktyce oznacza to, że gen wstawiany do MCS powinien być w orientacji zgodnej z nicią sensowną ((+)), aby mRNA było poprawnie syntetyzowane.

Geny *lacI* i *rop* są zlokalizowane na nici sensownej ((+)), co jest typowe dla ich funkcji w regulacji ekspresji i replikacji plazmidu. Różnice w orientacji wynikają z konstrukcji plazmidu i funkcji poszczególnych elementów genetycznych.

Kolejne kroki:

Dzięki powyższym informacjom możemy zaprojektować wstawienie genu dehalogenazy haloalkanowej (*dhaA*) do plazmidu pET-28a, korzystając z odpowiednich miejsc restrykcyjnych w MCS i upewniając się, że gen jest wstawiony w poprawnej orientacji.

Nić kodująca, nić matrycowa oraz indeksowanie w plazmidzie pET-28a: Przykład dla genu kanamycyny i regionu ekspresyjnego**1. Nić kodująca (+) i nić matrycowa (-)****1) Nić kodująca (positive strand, +):**

- a. Nić kodująca to ta, której sekwencja odpowiada mRNA (z uracyłem zamiast tyminy), dlatego jest określana jako nić +.
- b. W pET-28a pozycje nukleotydów są indeksowane względem tej nici, co umożliwia jednoznaczne określenie pozycji elementów na mapie plazmidu.
- c. Przykład: Gen kanamycyny (*KanR*), który jest skierowany na nici - (od 3' do 5' względem nici +), posiada pozycje opisane w odniesieniu do nici +.

2) Nić matrycowa (negative strand, -):

- a. Nić matrycowa jest komplementarna do nici kodującej i służy jako matryca podczas transkrypcji, umożliwiając syntezę mRNA.
- b. W przypadku genu na nici -, transkrypcja będzie przebiegać od wyższej do niższej pozycji (np. od pozycji 4807 do 3995 dla genu *KanR*), zachowując jednak kierunek od 5' do 3' na mRNA.

2. Orientacja genów w plazmidzie pET-28a i przykład dla regionu ekspresyjnego

- 1) W plazmidzie pET-28a, geny w regionie ekspresyjnym pod kontrolą promotora T7 są skierowane na nici +. Oznacza to, że polimeraza T7 będzie wiązać się z nicią + i syntetyzować mRNA komplementarne do nici matrycowej (-).
- 2) Geny kontrolowane przez promotor T7 (w regionie MCS) będą zatem transkrybowane w kierunku od 5' do 3' na nici +.
- 3) Przykład: Jeśli gen docelowy zostanie wstawiony między 100 a 200, będzie transkrybowany w kierunku od 5' (100) do 3' (200) na nici +.

3. Podsumowanie: Indeksowanie i orientacja w pET-28a

- 1) W plazmidzie pET-28a wszystkie pozycje nukleotydowe są indeksowane względem nici +, nawet jeśli dany gen znajduje się na nici -.
- 2) Transkrypcja dla genów na nici - (np. *KanR*) przebiega od wyższego do niższego indeksu, podczas gdy dla genów na nici + (np. w regionie MCS) transkrypcja przebiega od niższego do wyższego indeksu.
- 3) W ten sposób orientacja promotora oraz przypisanie nici kodującej/matrycowej wpływa na kierunek transkrypcji, ale zawsze odnosi się do ustalonego indeksowania względem nici +.

Bibliografia

- [1] G. Cesareni, M. A. Muesing i B. Polisky. “Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter”. W: Proceedings of the National Academy of Sciences 79 (1982), s. 6313–6317.
- [2] S. Chowdhury i in. “Kinetic analysis of enzymatic dehalogenation using spectrophotometry”. W: Analytical Biochemistry 380 (2009), s. 100–110.
- [3] J. Damborsky i Z. Prokop. “Haloalkane dehalogenase: application in environmental biotechnology”. W: Biotechnology Advances 24 (2006), s. 116–126.
- [4] M. De Lisa i W. Bentley. “Engineering Escherichia coli BL21(DE3) strain for improved protein expression and stability”. W: Biotechnology Progress 13.4 (1997), s. 547–555.
- [5] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz i D. Stüber. “Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent”. W: Nature Biotechnology 6 (1988), s. 1321–1325.
- [6] A. Jansson, S. Ramaswamy i S. Mowbray. “Structural basis for the dehalogenase activity in the haloalkane dehalogenase enzyme DhaA from Xanthobacter autotrophicus”. W: Journal of Molecular Biology 337.4 (2004), s. 917–929.
- [7] L. Kalum, J. Jones, C. J. Oakes i R. Schwarzenbacher. “Substrate specificity and stability of DhaA mutant enzymes”. W: Biochemistry 45.22 (2006), s. 6826–6833.
- [8] M. Lewis. “The lac repressor”. W: Comptes Rendus Biologies 328 (2005), s. 521–548.
- [9] Novagen. pET System Manual. Madison, WI: Novagen, Inc. 1995.
- [10] G. Petersen i L. Moller. “Purification of recombinant proteins from Escherichia coli using histidine-tagged fusion proteins”. W: Journal of Chromatography A 658.1 (1994), s. 25–32.
- [11] Z. Prokop, J. Sykorova, R. Chaloupkova i J. Damborsky. “Structure and catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase DhaA31 with a novel substitution in the catalytic triad”. W: Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 78.7 (2010), s. 1454–1462.
- [12] P. E. Reynolds i W. C. Noble. “Properties of the Kanamycin Resistance Transposon Tn903”. W: Plasmid 15 (1986), s. 19–28.
- [13] M. Rong, B. He, W. McAllister i R. Durbin. “Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase”. W: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95.2 (1998), s. 515–9. DOI: 10.1073/pnas.95.2.515.
- [14] J. Sambrook, E. Fritsch i T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] B. Schindler, J. Stourac, M. Pavlova i J. Damborsky. “Chemical basis for the enhanced dehalogenase activity in the mutant DhaA haloalkane dehalogenase enzyme”. W: Journal of Biological Chemistry 284.14 (2009), s. 9118–9126.
- [16] A. Stsiapanava, N. Kurumbang, J. Stourac, R. Chaloupkova i J. Damborsky. “Characterization and biotechnological potential of DhaA80, a haloalkane dehalogenase mutant with improved stability and activity”. W: Applied Microbiology and Biotechnology 85.3 (2010), s. 849–860.
- [17] F. W. Studier i B. A. Moffatt. “Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes”. W: Journal of Molecular Biology 189 (1986), s. 113–130.
- [18] F. Studier i B. Moffatt. “Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes”. W: Journal of Molecular Biology 189 (1990), s. 113–130.

- [19] J. G. Sutcliffe. “pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long”. W: Nucleic Acids Research 5 (1978), s. 2721–2728.