

(19)



(10) **LT IP1515 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1515** (51) Int. Cl. (2006): **C12Q 1/42**  
**C12Q 1/48**  
**C12Q 1/68**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 03**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: **218103, 1988 07 12, US**  
**4614586, 1989 07 11, SU**
- (71) Pareiškėjas:  
**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, 17 Quincy Street,  
Cambridge, Massachusetts 02138, US**
- (72) Išradėjas:  
**Stanley TABOR, US**  
**Charles C. RICHARDSON, US**
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabalienės kontora METIDA, Verslo  
centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:  
**DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdas ir priemonių rinkinys**
- (57) Referatas:  
—

**LT IP1515 A**

DNR NUKLEOTIDINĖS SEKOS NUSTATYMO BŪDAS IR PRIEMONIŲ RINKINYS

Šis išradimas skirtas DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdui, tame tarpe ir automatiniam DNR sekvenavimo būdams.

Apskritai, DNR nukleotidinės sekos nustatymas grindžiamas būdu, kurį pasiūlė F. Sengeris ir kt./Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 5463, 1977/ ir kurį sudaro fermentinė viengrandinės DNR sintezė, panaudojant viengrandinės DNR matricą ir pradmenį. Pažvelgus į 1 pav., matyti, kad vykdomos 4 atskiros sintezės. Viengrandinė matrica naudojama kartu su pradmeniu, kuris hibridizuojamas su matrica. Pradmuo ilginamas panaudojant DNR polimerazę, ir kiekviena reakcija baigiasi ties specifine baze /guaninas, G, adeninas, A, timinas, T, arba citozinas, C/ prisijungus atitinkamam grandinės augimą stabdančiam agentui, pavyzdžiui, didezoksinukleotidui. Dabartiniu metu naudojant šį sekos nustatymo būdą, vartojami sekantys fermentai: Escherichia coli DNR polimerazės didysis

fragmentas I/Klenovo fragmentas/, atvirkštinė transkriptazė, Tag polimerazė ir T7 bakteriofago DNR polimerazės modifikuota forma.

I pav. matyti, kad DNR sintezės keturių reakcijų pasėkoje gaunamos DNR produktų keturios serijos, kuriose kiekvienas produktas turi vieną pastovų galą, o kitą - kintamą. Pastovusis galas prasideda pradmens molekule. Kintamas galas baigiasi grandinės augimą stabdančiu agentu, specifiniu nukleotido bazei /arba G, A, T, arba C/, ties kuria sintezės reakcija sustoja. Keturios skirtingos produktų serijos frakcionuojamos priklausomai nuo molekulinės masės didelės skiriamosios gebos poliakrilamidiniame gelyje elektroforezės būdu keturiuose skirtinguose takeliuose tam, kad būtų gautos keturios juostų serijos, kur kiekviena juosta gelyje atitinka pagal seką DNR nukleotidinėje sekoje specifiniam nukleotidui. Tokiu būdu, juostų santykinės pozicijos identifikuoja kiekvienos nukleotidų bazės vietą DNR nukleotidinėje sekoje. Apskritai paėmus, DNR produktai žymimi, kad gautas juostas būtų lengva aptikti. Kaip matyti I pav., viename takelyje esančių juostų intensyvumas nevienodas, kadangi intensyvumas tiesiogiai susijęs su to paties molekulinio svorio DNR produktų kiekiu ar koncentracija, esančia tame takelyje, o tas kiekis svyruoja ir kiekviename produkte yra kitoks, net jeigu jie ir turi apytikriai panašų molekulinį svorį ar turi tokį pat grandinės augimo stabdymo agentą.

Pasiūlytos įvairios DNR nukleotidinės sekos nustatymo automatinės sistemos, paremtos aukščiau aprašytos metodikos panaudojimu. Vienas tokių prietaisų, kuriuos gamina EG & G firma, naudoja 32P-žymę ir DNR polimerazę, o reakcijos metu gautus DNR produktus frakcionuoja elektroforezės gelyje būdu. Tonegucco ir kt., Biotech-

niques 6, p. 460, 1988, 32P-detektorius skanuoja radioaktyvumą apatinėje gelio dalyje, praeidamas pro pastarąją dalį. Keturios sintezės reakcijos būtinos kiekvienos matricos sekų analizei, o taip pat reikalingi ir keturi takeliai kiekviename gelyje, atskiras takelis reikalingas produktams, besibaigiantiems grandinės augimo stabdymo agentu, kaip tai parodyta, pavyzdžiui, I pav.

Kanbara ir kt., Biotechnology, 6, p. 816, 1988, 32P-pažymėtą pradmenį, aprašytą aukščiau, pakeitė pradmeniu, pažymėtu fluorescentu. Gauti reakcijos metu fluorescenciniu agentu pažymėti produktai apatinėje gelio dalyje sužadunami lazeriu, o fluorescencinis agentas aptinkamas STV-moniuru. Šios procedūros metu reikia keturių sintezės reakcijų ir keturių takelių gelyje kiekvienai analizuojamai matricai.

Applied Biosystems firma gamina prietaisą, kuriame panaudojami keturi skirtingi pradmenys, kurių kiekvienas žymimas savu fluorescenciniu markeriu. Smith ir kt., Nuc. Acid. Res., 13, p. 2399, 1986 ir Nature, v. 321, p. 674, 1986. Kiekvienas pradmuo naudojamas atskiroje reakcijoje, turinčioje vieną iš keturių di-dezoksinukleotidų. Atlikus šias keturias reakcijas, jos apjungiamos ir analizuojamos viename gelio takelyje. Lazeris apatinėje gelio dalyje naudojamas tam, kad būtų aptikti fluorescenciniai produktai po to, kai jie buvo panaudoti elektroforezei gelyje. Ši sistema reikalauja keturių atskirų renatūracijos ir keturių atskirų sintezės reakcijų kiekvienai matricai, tačiau pakanka vieno takelio gelyje. Šios sekos kompiuterinė analizė pasidaro paprastesnė, negu tuo atveju, kai viename takelyje būna keturios juostos.

DuPon firma gamina prietaisą, kuriame skirtingi fluores-

cenciniai markeriai "prikabinami" prie kiekvieno iš keturių didezoksinukleozidtrifosfatų. Prober ir kt., Science, v. 238, p.336, 1987. Būtina viena renatūracijos stadija, viena polimerazės reakcija /turinti kiekvieną iš keturių žymėtų didezoksinukleozidtrifosfatų/ ir vienas takelis gelyje, naudojamame sekos analizei. Keturi skirtingi fluorescenciniai markeriai DNR produktuose aptinkami atskirai jų elektroforezės gelyje metu.

Englert ir kt. JAV patente Nr. 707 237 /1987/ aprašo daugiakanalį prietaisą elektroforezei, turintį priemonę, išdėstyta gelio plotyje ir galinčią registruoti žymėtus DNR produktus, migruojančius pro šį detektorių į keturius atskirus takelius, ir susukti tą takelį, kuriame yra pavyzdys. Pirmenybė teikiama variantui, kuriame naudojama radioizotopinė žymė.

Dabartiniu metu naudojamų DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdų charakteringu bruožu yra tai, kad DNR produktus, žymėtus fluorescenciniais ar radioaktyviais agentais, reikia atskirti panaudojant į gelį įsiterpenčius būdus, tokius kaip elektroforezė poliakrilamide ar kitame gelyje, o po to aptikti juos išsidėsčiusius įsiterpimo ar judėjimo gelyje ašyje vienas kito atžvilgiu. Šio būdo tikslumą sąlygoja iš dalies signalo juostoje vienodumas, prasiskverbęs gelyje tuo pačiu atstumu. Signalų intensyvumų skirtumai ar variacijos tarp artimų juostų kelia kai kurias problemas. Visu pirma, tai sumažina metodo jautrumą, kuris apsiriboja sugebėjimu surasti juostas, turinčias pačius silpniausius signalus. Antra, iškyla sunkumai nustatant ar ši juosta su silpnu signalu - tai realus signalas, kylantis iš grandinės augimą stabdančio agento, ar tai tik artefaktas, kurį sukėlė pauzės DNR saitas, kuriame polimerazė išsiskiria. Trečia, tai mažina sekos nustatymo tikslumą.

mą tarp artimų juostų, kadangi vienos juostos stiprus signalas gali "uždengti" savo "kaimynės" silpna signalą.

Šis išradimas išsprendžia visas aukščiau paminėtas problemas, kadangi pagal jų sekų analizės reakcijos metu gaunami apytikriai vienodi kiekiai to paties molekulinio svorio DNR produktų, ir tokiu būdu artimos juostos sekų analizės gelyje tame pačiame takelyje pasižymi apytikriai vienodu intensyvumu.

Apytikriai vienodo intensyvumo juostos sujungimo galimybė labai naudinga, kadangi tai leidžia sekos analizės metu bet kurios reakcijos rezultatus iššifruoti paprasčiau ir patikimiau. Be to, kadangi sekos analizės reakcijos DNR produktai su specifiniu grandinės augimo stabdymo agentu sudaro juostas, turinčias panašius intensyvumus kaip ir kaimyninių juostų, tai pačios juostos intensyvumas suteikia specifinę žymę visai serijai tokiu būdu gautų juostų. Apytikriai to paties molekulinio svorio DNR produktų kiekis, sąlygotas grandinės augimo stabdymo agento, varijuoja priklausomai nuo šio agento koncentracijos. Taip panaudojus kiekvieno iš stabdymo agentų kitą koncentraciją sintezei, DNR produktus, jungiančius vieną grandinės augimo stabdymo agentą, skiria nuo DNR produktų maždaug to paties molekulinio svorio, bet jungiančių kitus grandinės augimo stabdymo agentus, tuo, kad jie skiriasi skaičiumi ar kiekiu; tuo būdu, DNR produktų juostos gali būti identifikuotos pagal grandinės augimo stabdymo agentą, tiesiog pagal jų intensyvumą, palyginus su gretimų juostų intensyvumu. Dvi ar daugiau DNR produktų serijos, kuriose kiekviena serija turi skirtingus grandinės augimo stabdymo agentus, gali būti analizuojamos gelyje viename takelyje ir gali būti identifikuotos, t.y. tarpusavyje atskirtos pagal kiekvienos juostos intensyvumą, palygintą su kaimyninių juostų intensyvumu. Be to, DNR produktų, jun-

giančių skirtingus grandinės augimo stabdymo agentus, sintezė gali vykti nebūtinai atskirai atskirose talpose, o visa tai gali vykti vienu metu viename reakcijos inde, ir galima panaudoti vienodą žymę, pavyzdžiui, radioizotopinę, fluorescencinę ir t.t., jei gu tai būtina, visiems grandinės augimo stabdymo agentams, vietoje to, kad panaudoti kiekvienam iš jų skirtingą žymę, o tai žymiai supaprastina eigą.

Būtina pažymėti, kad stebimas visų DNR produktų juostų intensyvumo palaipsnis mažėjimas skverbimosi per gelį eigoje; tie, kurie prasiskverbė trumpesnę atstumą, rodo mažesnę intensyvumą palyginus su tais, kurie nukeliavo toliau. Nežiūrint to, kiekvienos juostos santykinis intensyvumas palyginus su kaimyninėmis juostomis bet kuriame taške išilgai ašies, lieka maždaug vienodas. Santykinio intensyvumo išsaugojimas viso prasiskverbimo gylio atstume sąlygoja šio išradimo galimybę.

"Kaimyninėmis juostomis" suprantamos juostos, esančios viename ir tame pačiame takelyje 20-30 mm į priekį arba atgal nuo tiriamos juostos atskaičiuojant pagal prasiskverbimo ašį. Bendrai paėmus, kaimyninės juostos apima DNR produktus, besiskiriančius nuo tiriamo produkto ne daugiau kaip 20 bazių /t.y. masių skirtumai ne daugiau 6000 daltonų/.

Apskritai, šiam išradimui būdingas DNR polimerazės panaudojimas. DNR sekos analizės reakcijose, kuris sekos analizės reakcijoje duoda DNR produktus, turinčius menkai besiskiriančius molekulinis svorius, ir apytikriai vienodą produktų kiekį. Kadangi tokius DNR produktus išskirsto gelio matricoje, pastarieji sudaro juostas, kurios yra arti viena kitos ir pasižymi panašiu intensyvumu. Neapsiribodamas kokia nors konkrečia teorija, pareišk

kėjas žiūri į intensyvumo vienodumo pasireiškimą, kaip į faktą, rodantį, kad ši polimerazė neskiria normalių nukleozidtrifosfatų nuo grandinės augimo stabdymo agentų, tokių, kaip didezoksinukleozidtrifosfatai.

Pirmuoju aspektu, atitinkamai šiam išradimui, siūlomas DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdas, susidedantis iš šių stadijų: viengrandinės DNR gavimo, jos renatūracijos, tam, kad pradmuo gautų hibridizuotis su viengrandine DNR ir gautųsi renatūruotas mišinys, renatūruoto mišinio inkubacijos su dezoksiribonukleozidtrifosfatu, DNR polimeraze ir pirmuoju grandinės augimo stabdymo agentu tokiomis sąlygomis, kai polimerazė ilgina pradmenį ir suformuoja pirmą "seriją" pirmųjų DNR produktų, besiskiriančių pailginto pradmens ilgiu, kai tuo tarpu kiekvienas pirmas DNR produktas savo pailgintame gale turi grandinės augimo stabdymo agentą; kiekvieno pirmojo DNR produkto kiekis apytikriai toks pats visiems DNR produktams, kurie skiriasi savo ilgiu 1-20 bazių. Geresniame variante siūlomas būdas šalia anksčiau paminėtų dar apima šias stadijas: pirmųjų DNR produktų frakcionavimą gelyje pagal molekulinį svorį tam, kad būtų gauta juostų pirmoji serija, kurioje kiekviena juosta - tai tam tikro molekulinio svorio pirmasis DNR produktas, ir visų gretimų juostų intensyvumas apytikriai toks pats, o tuo pačiu ir iš esmės visoms pirmos serijos juostoms jis yra panašus; ir kiekvienos pirmos juostos padėties nustatymą.

Terminu "iš esmės visoms" suprantama, kad mažiausiai 9 iš 10 /arba 19 iš 20/ gretimų juostų turi apytikriai vienodą intensyvumą. Tai yra, tik atsitiktinės juostos gali būti kito intensyvumo. Kito intensyvumo yra artefaktai. Vienu iš tokio artefakto pavyzdžių yra skirtingo molekulinio svorio dviejų ar daugiau DNR produktų "sangrūda" vienos juostos viduje. 2 pav. parodytas dviejų



tokių "sangrūdų" pavyzdys, kur artefakto juostos pažymėtos žvaigždute. Terminu "apytikriai vienodas" išreiškiama, kad juostų intensyvumas pasikeičia daugių daugiausia 2 kartus, naudojant geresnį variantą - ne daugiau 1,2 karto. Kalbant apie analizę gelyje, turima galvoje poliakrilamidiniai geliai, naudojami DNR nukleotidinės sekos analizei, bei visi kiti būdai, naudojami DNR produktų frakcionavimui pagal molekulinį svorį.

Viename iš išradimo variantų gaunamos apytikriai vienodo intensyvumo gretimos juostos, inkubuojant DNR polimerazę tirpale su mangano ir geležies jonais.

Viename iš geresnių išradimo variantų siūlomas būdas papildomai įjungia stadiją, kurioje į renatūruotą mišinį įvedamas ant-rasis grandinės augimo stabdymo agentas tokia koncentracija, kuri skirtųsi nuo pirmojo grandinės augimo stabdymo agento koncentracijos. To pasėkoje DNR polimerazė susintetina antrųjų DNR produktų antrąją seriją, kurioje kiekvienas antras DNR produktas turi savo pailgintame gale antrąjį grandinės augimo stabdymo agentą, o kiekvieno antrojo DNR produkto kiekis apytikriai panašus kaip ir visų DNR produktų, kurie skiriasi 1-20 bazių ilgiu. Tuo tarpu kiekis visų pirmų ir visų antrų DNR produktų, kurie skiriasi 1-20 bazių ilgiu, žymiai skiriasi. Geriausio varianto metu antra DNR produktų serija sudaro antrą juostų seriją, frakcionuojant gelyje pagal molekulinį svorį, kurioje iš esmės visų gretimų antros serijos juostų intensyvumas apytikriai vienodas, o iš esmės visų pirmos serijos juostų intensyvumas ryškiai ir "akivaizdžiai" skiriasi nuo antros serijos kiekvienos gretimos juostos intensyvumo. Siūlomas būdas dar papildomai įjungia stadiją, kurios metu nustatoma kiekvienos juostos padėtis ir intensyvumas, ir savo ruožtu intensyvumas tampa tam tikros serijos juostų charakteristika.

Terminu "akivaizdžiai skiriasi" nusakoma tai, kad vienos serijos juosta galima atskirti nuo gretimos kitos serijos juostos /t.y. juostos besiskiriančios 1-20 bazių ilgiu/. Tokiu būdu, prietaisas, matuojantis tam tikro molekulinio svorio DNR produktų kiekį, gali vienas nuo kito atskirti dviejų serijų DNR produktus.

Dar viename geresniame variante pagal šį išradimą siūlomas būdas įjungia dar du kitus grandinės augimo stabdymo agentus ir tuomet DNR polimerazė sintezuoja antrą ir trečią DNR produktų antrą ir trečia serijas. Gautas kiekvieno antro ir trečio DNR produkto kiekis apytikriai vienodas kaip ir iš esmės visų DNR produktų, besiskiriančių 1-20 bazių ilgiu. Tuo tarpu kiekis visų pirmų, visų antrų ir visų trečių DNR produktų, besiskiriančių 1-20 bazių ilgiu, žymiai skiriasi. Geriausiame variante kiekviena antrą ir trečių <sup>DNR</sup> produktų antra ir trečia serija sudaro skirtingas antrų ir trečių juostų serijas, frakcionuojant gelyje pagal molekulinį svorį, kuriose iš esmės visų antros serijos gretimų juostų intensyvumas apytikriai vienodas, iš esmės visų trečios serijos gretimų juostų intensyvumas apytikriai vienodas. Tuo tarpu skirtingų serijų gretimų juostų intensyvumas akivaizdžiai skiriasi. Siūlomas būdas papildomai įjungia dar stadijas, kurių metu nustatoma kiekvienos juostos padėtis ir intensyvumas, ir savo ruožtu intensyvumas tampa tam tikros serijos juostų charakteristika.

Dar viename geresniame variante pagal šį išradimą siūlomas būdas įjungia į renatūruotą mišinį keturis skirtingus dezoksiribonukleozidtrifosfatus ir keturis skirtingus grandinės augimo stabdymo agentus, ir tuomet DNR polimerazė sintezuoja antrą, trečią ir ketvirtą seriją iš antrų, trečių ir ketvirtų DNR produktų. Gautas antrų, trečių ir ketvirtų DNR produktų kiekis apytikriai vie-

nodas kaip ir iš esmės visų DNR produktų, besiskiriančių 1-20 bazių ilgiu. Tuo tarpu kiekis visų pirmų, visų antrų, visų trečių ir visų ketvirtų DNR produktų, besiskiriančių 1-20 bazių ilgiu, akiškai skiriasi. Geriausiame variante kiekviena antra, trečia ir ketvirta serijos sudaro antrą, trečią ir ketvirtą juostų serijas, frakcionuojant gelyje pagal molekulinį svorį, kuriose iš esmės visų antros serijos gretimų, arba trečios serijos gretimų, arba ketvirtos serijos gretimų juostų intensyvumas apytikriai vienodas. Tuo tarpu skirtingų serijų gretimų juostų intensyvumas akiškai skiriasi. Siūlomas būdas papildomai įjungia dar stadijas, kurių metu nustatoma kiekvienos juostos padėtis ir intensyvumas, ir savo ruožtu intensyvumas tampa tam tikros serijos juostų charakteristika.

Dar viename geresniame variante pagal šį išradimą į renatūruotą mišinį įvedami mangano ir geležies jonai, kurie polimerazę padaro grandinės augimo stabdymo agentams nediskriminuojama. DNR produktai frakcionuojami pagal molekulinį svorį mažiau kaip keturiuose gelio takeliuose. Kiekvienos juostos intensyvumas matuojamas gelio diagramų šifravimo prietaisu. DNR polimerazė pasirenkama iš šių polimerazių tarpo: T7 tipo DNR polimerazės, E. coli DNR polimerazės didžiojo fragmento I ir Taq polimerazės. Grandinės augimo stabdymo agentu panaudotas didezoksinukleozidtrifosfatas.

Ryšium su aukščiau išdėstytais aspektais pagal šį išradimą siūlomas būdas viengrandinės DNR nukleotidinei sekai analizuoti, įjungiantis šias stadijas - arba a) DNR polimerazės gavimą ir DNR polimerazės ir viengrandinės DNR inkubaciją tirpale su mangano ir geležies jonais bei grandinės augimo stabdymo agentu, arba b) DNR polimerazės gavimą, kuomet polimerazė tampa nediskriminuo-

jama grandinės augimo stabdymo agentui.

Dar vienu artimu aspektu šis išradimas siūlo būdą kaip gauti DNR polimerazę DNR sekos nustatymui, įjungiant stadiją, kuomet DNR polimerazė sumaišoma tirpale su mangano ir geležies jonais.

Dar vienu aspektu pagal šį išradimą siūlomas tirpalas, turintis A-7 tipo arba Taq polimerazę ir mangano ar geležies jonus. Geresniame variante šių jonų koncentracija nuo 0,005 iki 100 milimolių.

Dar vienu aspektu pagal šį išradimą siūlomas priemonių DNR sekos nustatymui rinkinys, susidedantis iš DNR polimerazės, grandinės augimo stabdymo agento ir mangano ar geležies jonų.

Šio išradimo realizacijos geresniame variante polimerazė pasirenkama T7 tipo DNR polimerazė, E. coli DNR polimerazės I didysis fragmentas arba Taq polimerazė, grandinės augimo stabdymo agentu yra didezoksinukleotidas: į priemonių rinkinį dar įeina ir dezoksiribonukleozidtrifosfatas.

Dar vienu aspektu šis išradimas apima ir DNR sekos nustatymo automatizuotą būdą, įjungiantį polimerazės gavimą, kuri iš esmės yra grandinės augimo stabdymo agento nediskriminuojama ir stimuliuoja sintezę "serijos" DNR produktų, kurie skiriasi savo molekulinio svoriu ir baigiasi vienodu grandinės augimo stabdymo agentu. Be to, DNR produktai duoda iš esmės apytikriai vienodo intensyvumo gretimas juostas.

Terminu "nediskriminuojama" nusakoma tai, kad grandinės augimo stabdymo agentai įsijungia tolygiai pagal visą DNR ilgį, nepriklausomai nuo DNR nukleotidinės sekos. Terminu "apytikriai vienodi" nusakoma, kad intensyvumai skiriasi daugų daugiausia 2-3 kartus.

Dar vienu aspektu pagal šį išradimą siūlomas DNR sekos nustatymo automatinis prietaisas, susidedantis iš reaktoriaus, reikalingo mažiausia 2 serijų DNR produktų gavimui, kurie gaunami iš vienintelio pradmens ir viengrandinės DNR. Serijos kiekvienas DNR produktas skiriasi savo molekulinio svoriu ir gale turi grandinės augimo stabdymo agentą. Prietaisas turi DNR produktų frakcionavimo priemonę tam, kad būtų gautos juostos serijomis, iš esmės serijoje visų gretimų juostų intensyvumas apytikriai vienodas, o gretimų juostų skirtingose serijose intensyvumas skirtingas. Prietaisas turi priemonę juostų "skaitymui" tam, kad po išfrakcionavimo būtų nustatyta kiekvienos juostos vieta ir intensyvumas. Prietaisas taip pat turi kompiuterinę įrangą tam, kad remiantis tiesiogiai žiniomis apie juostų padėtį ir intensyvumą, nustatytą viengrandinės DNR nukleotidinę seką.

Geresniame išradimo realizacijos variante į reaktorių dedami mangano ar geležies jonai ir T7 tipo DNR polimerazė.

Dar vienu aspektu pagal šį išradimą siūlomas tirpalas ar rinkinys, į kurį įeina pirofosfatazė, DNR polimerazė ir grandinės augimo stabdymo agentas arba DITF; ir DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdas, kurio metu sekos analizės reakcijoje naudojama pirofosfatazė. Įvedus į sekos analizės reakciją pirofosfatazė, sumažėja pirofosfato koncentracija ir padidėja gretimų juostų intensyvumo vienodumas.

Bet kuriame iš anksčiau paminėtų aspektų mangano ir geležies jonus galima gauti esant chelatui, tokiam, kaip citratas ar izocitratas. Tokių chelatų pagalba galima geriau kontroliuoti reikalingo jono koncentraciją DNR sekos analizės reakcijoje.

Galiausiai, paskutiniame aspekte pagal šį išradimą siūloma

DNR polimerazė T7 Lys 118 - Arg 145 ir DNR, kuri koduoja šią polimerazę. Ši polimerazė nepasižymi egzozonukleazės aktyvumu.

Paraiškos pateikėjai nuostatė sąlygas, kurių metu galima modifikuoti DNR polimerazes tam, kad pasikeistų jų sugebėjimas įjungti grandinės augimo stabdymo agentą pailgintame pradmens gale, dalyvaujant DNR matricai. Šis sugebėjimas leidžia atlikti DNR sekos analizę esant mažesniems grandinės augimo stabdymo agentų koncentracijoms, ir tokiu būdu, žymiai sumažėja DNR sekos nustatymo savikaina. Be to, pateikėjai nustatė, kad DNR polimerazės pasižyminčios tokiais sugebėjimais, produkuoja naudojamose DNR sekos analizei geliuose gretimas juostas, pasižyminčias apytikriai vienodu intensyvumu. Tai reiškia, kad polimerazė jokių laipsnių nediskriminuojama tarp prisijungusių grandinės augimo stabdymo agentų ir normalių dezoksinukleozidtrifosfatų. Pareiškėjas parodė, kad mažiausiai tris polimerazes galima modifikuoti tokiu būdu, įskaitant tame tarpe modifikuotą T7 polimerazę, E. coli DNR polimerazės I didįjį fragmentą ir Taq polimerazę. Kitos polimerazės, homologiškos aukščiau paminėtoms polimerazėms, taip pat gali būti veiklios pagal šį išradimą.

Dar vienas šio išradimo privalumas yra tai, kad galima lengvai paskaičiuoti bet kurio grandinės augimo stabdymo agento, naudojamo sekos analizės reakcijoje, koncentraciją, kadangi juostos intensyvumas tiesiogiai susijęs su bet kurio grandinės augimo stabdymo agento koncentracija ir yra toks pats kiekvienam tokiam agentui.

Modifikuotos polimerazės, esančios šio išradimo objektu, ypač naudingos sekos analizės reakcijose, kadangi reikalinga tik viena sekos analizės reakcija, turinti visus keturis grandinės augimo stabdymo agentus keturiomis skirtingomis koncentracijomis. Tokiu

būdu, bet kuriai konkrečiai DNR matricai galima panaudoti mažiau keturių skirtingų sekos analizės reakcijų.

Šio išradimo kiti skirtumai ir privalumai bus aiškūs, žemiau pateikus jo realizacijos geresnių variantų aprašymus ir išradimo apibrėžties punktus.

### Geresnių realizacijos variantų aprašymas

Pirmiausia trumpai aprašomos iliustracijos.

#### Iliustracijos

I pav. pateikta DNR nukleotidinės sekos nustatymo Sengerio ir kt. būdu schema (žiūr. aukščiau).

2 - 7 pav. grafiškai pavaizduotas šešių skirtingų gelių DNR sekos analizės metu gautų, panaudojus Applied Biosystems firmos Sekos Analizės Sistemą, juostų santykinis intensyvumas (Modelis 370A). Kiekviena juosta priklauso vienam gelio takeliui, turinčiam sekos analizės reakcijos mišinį, kuriame panaudota genetiškai modifikuota T7 DNR polimerazė bei įvairūs mangano ar magnio mišiniai ir skirtingi didezoksinukleozidai.

Kiekvienoje šių iliustracijų analizuojama DNR buvo mG PI-2 (koduojanti T7 DNR polimerazę, Tabor ir kt., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 4767, 1987), o pradmuo - Applied Biosystems firmos pradmuo. Kiekvienu atveju parodyta visa neapdorota išeiga pradmeniui, šios išeigos pradžia ir pabaiga. Be to, parodytos sekų pozicijos pagal jų atitinkamas pozicijas T7 tipo laukinėje DNR (Danc ir kt., J. Mol. Biol., v. 8, pp. 452, 1983). Kiekviename grafike vietos, pažymėtos žvaigždute, yra "sangrūdos", atsiradusios mažiausiai dviems skirtingo molekulinio svorio DNR produktams migravus į tą pačią poziciją. Tokios "sangrūdos" bendrais bruožais aprašytos Taboro ir kt. darbe Proc. Nat. Acad. Sci.

USA, v. 84, pp. 4767, 1987.

8 pav. pateiktas grafikas, rodantis DNR polimerazės (genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės atvejis) aktyvumui optimalią magnio ir mangano koncentraciją, pridėjus 4,0 mM izocitrato ir be jo.

9 pav. pateiktas grafikas, rodantis įvairių izocitrato koncentracijų poveikį genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės aktyvumui, pridėjus 10 mM magnio arba mangano.

10 pav. pateikta plazmidės pG P5-8, koduojančios genetiškai modifikuotą T7 DNR polimerazę, neturinčią Lys 118 - Arg 145 aminorūgščių srities bei egzozukleazės aktyvumo, schema.

11 pav. pateikta automatinio sekos nustatymo prietaiso, esančio šio išradimo objektu, schema.

#### DNR polimerazė

Šiame išradime naudotos DNR polimerazės, priklausančios homologinių polimerazių klasei, kaip antai, T7 tipo DNR polimerazės (tokios kaip T7, T8, FI, FII, H, W31, gh-1, U, AII22 arba SP6), E. coli DNR polimerazės I didysis fragmentas ir Taq polimerazė. Homologinėmis polimerazėmis laikomas fragmentas, kuris esant magniui, diskriminuoja didezoksinukleozidtrifosfatą palyginus su dezoksinukleozidtrifosfatais, tačiau, kuomet magnis pakeičiamas manganu, didezoksinukleozidtrifosfatų atžvilgiu diskriminacija sumažėja. Šias polimerazes naudoja DNR sekos analizės reakcijoje tokiomis sąlygomis, kuomet jos produkuoja apytikriai vienodo intensyvumo gretimas juostas (maždaug 1,5 - 2,0- kartinės intensyvumo variacijos), atliekant sekos analizės reakcijos DNR produktų analizę gelyje. Terminu "gretimos" ("kaimyninės") nusakomos juostos, atstovaujančios DNR produktus, kurių molekulinis svoris ski-



riasi 6000, t.y. 20 bazių.

Šio intensyvumo realus dydis mažes slenkant išilgai gelio, tai aprašyta žemiau ir parodyta iliustracijose. Juostos intensyvumas atspindi šioje juostoje esančių DNR produktų kiekį. Tam, kad būtų gauta lengvai aptinkama juosta, kurios intensyvumas atspindi tokių DNR produktų kiekį, naudojamos tokios žymės, kaip fluoroforezės arba radioizotopai. Pagal šį išradimą gretimos juostos, gautos vienos sekos analizės reakcijos metu, dalyvaujant grandinės augimo stabdymo agentui, turi apytikriai vienodą DNR produktų kiekį, ir tokiu būdu, vienodą juostų intensyvumą. Į sekos analizės sąlygas įeina polimerazės inkubacija, dalyvaujant specifiniams divivalenčiams ar trivalenčiams katijonams tokiems, kaip manganas (II ir III), divalentės ir trivalentės geležies jonai. Vienvalenčiams ir divivalenčiams katijonams, kurie nepasižymi radimo efektu arba kurie nepalankiai veikia DNR sintezę, priklauso: K, Na, Ba, Be, Ca, Ce, Cr, Co, Cu, Ni, Si ir Zn. Anijonai ne vaidina jokio vaidmens, pavyzdžiui, galima naudoti chloridą, acetatą ir sulfatą. Esant šioms sąlygoms, tokiems fermentams, kaip E. coli DNR polimerazės I didysis fragmentas ir Taq polimerazė, 1000 kartų, o modifikuotai T7 polimerazei - 10 kartų sumažėja grandinės augimo stabdymo agentų tokių, kaip didezoksinukleozidai poreikis. Į toki tirdpalą galima įdėti chelato tam, kad palengvėtų prieinamų divivalenčių metalų jonų koncentracijos reguliavimas. Pavyzdžiui, galima pridėti citrato ar izocitrato. Šie chelatai reikalingi tam, kad, pavyzdžiui, laisvų mangano jonų koncentracija būtų palaikoma plačiose ribose nuo 10 iki 100 mM. Tai reiškia, kad chelatas veikia kaip buferis.

DNR polimerazės, esančios šio išradimo objektu, iš esmės iš

146

ilgai DNR matricos neskiria didezoksinukleozidinių analogų nuo dezoksinukleozidų. Tai reiškia, kad, dalyvaujant manganui ar geležiai, šios polimerazės nesugeba atskirti nukleotido, turinčio 3'-hidroksilo grupę, nuo šios grupės neturinčio nukleotido (turinčio du vandenilius ribozės 3'-pozicijoje). Tačiau, šios polimerazės diskriminuoja modifikacijas nukleozidų kitose pozicijose. Pavyzdžiui, šios polimerazės diskriminuoja kai kuriuos didezoksinukleozidų analogus, turinčius fluorescencines grupes, nuo dezoksinukleozidų. Tačiau, polimerazė neskiria gretimų ir kaimyninių nukleotidų, turinčių arba neturinčių modifikacijas didezoksinukleozide. Tokiu būdu, nežiūrint to, kad jos griežtai diskriminuoja tokius analogus, tačiau pastarųjų koncentracija DNR sekos analizės reakcijoje privalo būti žymiai didesnė negu nemodifikuotų didezoksinukleozidų, ir kaimyninių juostų intensyvumas bus kaip ir anksčiau vienodas. Pavyzdžiui, dalyvaujant Mn, stebima 10-kartinė didezoksi ITF (ddITF) diskriminacija palyginus su didezoksi GTF (ddGTF). Tačiau visos juostos, gautos šioje sekos analizės reakcijoje, yra tokio pat intensyvumo kaip ir ddITF atveju, kadangi nėra diferencinės diferenciacijos išilgai DNR matricos.

Tokiu būdu, polimerazės, esančios šio išradimo objektu, sąlygoja vienodą grandinės augimo stabdymo agentų prisijungimo efektyvumą netgi tuo atveju, jei jos diskriminuoja bendrą prisijungimą.

Grandinės augimo stabdymo agentai, naudojami pagal šį išradimą, yra didezoksinukleozidai, turintys 2' ir 3', didezoksi-struktūrą. Kitiems agentams, kuriuos galima naudoti pagal šį išradimą, priklauso tokie agentai, kurie sugeba specifiskai užbaigti DNR sekos analizės reakciją ties specifine baze ir esant aukš-

šiau aprašytoms sąlygoms, jų nesugeba diskriminuoti polimerazė.

Tam, kad būtų nustatyta, ar konkreči DNR polimerazė yra veikli derinyje su koku nors konkrečiu grandinės augimo stabdy- mo agentu ar su kitu sekos analizės reakcijos mišinyje esančiu komponentu pagal šį išradimą, atliekama standartinė DNR sekos analizės reakcija, kaip tai aprašyta žemiau ir parodyta iliustra- cijose. Po to įvertinamas juostų susidarymo apimtis ir gretimų juostų vienodumas sekos analizės gelyje. Jeigu polimerazės reak- cija nepailgina pradmens nors 20 bazių, tai reiškia, kad tokia netinkama naudojimui tokiomis sąlygomis. Pagal šį išradimą siekia kaimyninių juostų vienodumo dvikartinėse ir mažiau ribose, o ge- resniame variante jis būna 1,0-1,5 ribose. Tuo pačiu būdu nusta- tomas ir katijonų ar kitų potencialių katijonų, naudojamų pagal šį išradimą, optimali koncentracija, patikrinant tai sekos anali- zės reakcijoje įvairiomis sąlygomis. Pavyzdžiui, išbando katijonų koncentraciją nuo 0,005 iki 100 mM riboje. Tokio bandymo pavyzdys aprašytas žemiau:

DNR sintezei panaudota 17-merinis pradmuo sekančios sekos 5'-GTAAACGACGGCCAGT-3' (numeris 1211 pagal New England Labs kata- logą), kuris pažymėtas 5' gale radioaktyviu 32P ir renatūruotas su viengrandininemGPI-2 DNR, Tabor ir kt., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 84, pp. 4767 (1987) ir Tabor ir kt., J. Biol. Chem., v. 262, pp. 16212 (1987). Blon-pradmenį panaudojo reakcijoje su DNR polimeraze, dalyvaujant metalo jonams anksčiau nurodytos koncen- tracijos ribose. Reakcijoje dalyvavo visi 4 dezoksinukleotidai tam tikroje koncentracijoje (DNTFS, 20-200 μM) bei vienas iš tam tikrų didezoksinukleotidų (ddNTE, šiuo atveju -ddGTF nuo 10 iki 500 μM). Po to buvo analizuojami DNR produktai, panaudojant elek- troforezę poliakrilamido gelyje, kuriame DNR sintezė buvo aptinka- ma produkuojančių pradmenį juostų tęsinio forma ir tai buvo įvai-

rių molekulinį svorių tąsa gelyje.

(10  $\mu$ l)

Specialiame pavyzdyje kiekvienas reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 0,1  $\mu$ g 32P-pradmens-matricos, 40 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM ditiotreitolo (DTT), nuo 5  $\mu$ M iki 20 mM metalo jonų, nuo 10 iki 500  $\mu$ M 4dNTP, nuo 1 iki 500  $\mu$ M ddNTP ir 2 vienetų DNR polimerazės. Inkubuojama 15 min prie 37 °C. Reakcija stabdoma pridėjus 10  $\mu$ l 90% formamido ir 0,1% bromfenolinio mėlio, 50mM EDTA.

Gautus mėginius kaitino iki 75 °C 2 min prieš užnešant į poliakrilamidinį gelį (8% akrilamido, 0,3% bisakrilamido) 7 moduluose šlapalo, 100 mM Tris-sorato, pH 8,9. Elektrofrezė vykdoma 2000 voltų įtampoje 2 val. Gelis fiksuojamas 50% metanolio, 10% acto rūgšties 30 min, po to džiovinamas ir analizuojamas autoradiografu. Kiekvieno takelio juostų intensyvumą, gautą juostelėje, matuoja skenuojant densitometru kiekvieną takelį. Naudotas densitometras - dvispindulinis savirašis prietaisas, modelis MkIIIC (Džois, Lebl end Ko., Ltd., Gatešėidas ant Taino, II, Anglija). Galima naudoti bet kokį gelių skanavimui tinkamą densitometrinių prietaisą. Kaip alternatyvą, galima panaudoti DNR produktų skanavimą, kai jie analizuojami elektroforeze gelio viduje, ir pagal tai nustatyti juostų vienodumą.

Vieno fermento sugebėjimą prijungti duotą ddNTP palyginus su atitinkamu dNTP matavo ddNTP ir dNTP santykiu, būtinu tam, kad įvyktų DNR sintezė, besibaigianti fiksuotoje srityje, ir kurią galima aptikti produkuotų juostų, neviršijamčių fiksuoto molekulinio svorio, pavidalu. Tai reiškia, kad juostos, gautos reakcijos metu, baigiasi sekos analizės gelyje specifinės srities viduje. Taip, jeigu vienas fermentas diskriminuoja 1000 kartų labiau pateiktą ddNTP negu kiti fermentai, tai reikės 1000 kartų didesnio

ddNTP su dNTP santykio tam, kad būtų gautos juostos, besibaigiančios gelio tos pačios srities atitinkamose vietose.

### Manganas (Mn)

Žemiau pateikiama serija pavyzdžių, kuriuose panaudota modifikuota T7 DNR polimerazė arba E. coli DNR polimerazės I didysis fragmentas DNR sekos analizės reakcijose, dalyvaujant Mn sekos analizės buferyje. Į šiuos pavyzdžius nereikia žiūrėti kaip į ribojančius šį išradimą. Jie pateikiami tik tam, kad kiekvienas šios technikos srities specialistas gautų pagrindines žinias, būtinas DNR polimerazės, esančios šio išradimo objektu, panaudojimui. Kaip buvo anksčiau aprašyta, kiekvienas šios technikos srities specialistas gali lengvai nustatyti sąlygas, kurioms esant galima gauti šio išradimo DNR polimerazes, pasižyminčias čia aprašytomis savybėmis apie grandinės augimo stabdymo agento prisijungimo vienodumą ir panaudojimą grandinės analizės reakcijoje.

Speciali modifikuota T7 DNR polimerazė, panaudota žemiau aprašytuose pavyzdžiuose, genetiškai modifikuota tam, kad nebeturėtų egzozukleazės aktyvumo. Tokia genetiškai modifikuota DNR polimerazė žymima kaip  $\Delta$  Lys 118 - Arg 145 ( $\Delta$ 28), kadangi aminorūgščių sritis nuo Lys 118 iki Arg 145 yra T7 DNR polimerazėje pašalinta. Gsi, koduojantis šią polimerazę, buvo pateiktas plazmidėje pG P5-8 kaip plazmidės variantas pG P5-5, aprašytas Tabor ir kt., JAV patentas Nr. 795 699.

10 pav. parodoma, kad į pG P5-8 įeina PACYCI77, perskelta BamHI ir HincII saituose, T7 DNR nuo bazės 5667 iki bazės 6166, turinti  $\phi$  I, I A ir  $\phi$  I. IB, ir T7 DNR nuo bazės 14306 iki bazės 16869, turinti geną 5 su modifikacijomis, parodytomis 10 pav. pG P5-8 konstravo pradžioje sintezuodami 34-merą, 5' CCGGCAAGTTGCC

GGGATGCTCGAGGAGCAGGG 3'. Šis oligonukleotidas panaudotas kaip pradmuo DNR sintezei nuo viengrandinės DNR ML3 mGP5-2, turinčios geno 5 T7, aprašyto Tabor ir kt. darbe (žiūr. aukščiau), intarpa. DNR sintezė ir mutantų atranka atlikta pagal aukščiau paminėtą Tabor ir kt. darbą. Iššaukė tikslinę mutaciją mGP5-2, atitinkamą geno 5 T7 sritį, turinčią pašalintą 84 bp (bazių porų) rajoną, įstatė į pG P5-5 izoliuodami EcoRI-HpaI-fragmentą, turintį T7 DNR nuo 14306 pozicijos iki 15610 pozicijos, kurioje buvo sritis, turinti pailgintą 84 bp rajoną, ir jį ligavus į palyginamąją sritį iš pG P5-5. pG P5-8 gavimą patvirtino tai, kad ji turi pašalintą rajoną, kuris buvo nustatytas pagal esančius jame saitus SmaI ir XhoI, sukurtus mutagenezės pagalba, ir taip pat DNR sekos analize srityje, turinčioje pašalintą 84 bp rajoną. pG P5-8 transformavo kamiene K38/pT X-3 tam, kad būtų gautas kamienas K38/pTrX - 3/pG P5-8. Pastarojo indukciją ir genetiškai pakeistos T7 DNR polimerazės valymą atliko pagal metodiką, aprašytą Tabor ir kt. darbe (žiūr. aukščiau) ir panaudotą kamienui K38/pT rX - 3/pG P5-5. Kadangi ši polimerazė nepasižymi endonukleazės aktyvumu, todėl ne reikėjo Tabor ir kt. darbe aprašytos cheminės modifikacijos tam, kad ją panaudoti DNR sekos analizės reakcijoje. Genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės, panaudotos vėliau pateiktuose pavyzdžiuose, santykinis aktyvumas buvo 1000 vienetų / ml.

1 pavyzdys: DNR sekos analizės reakcija panaudojant manganą

DNR sekos analizei, dalyvaujant Mn, panaudota standartinė DNR sekos analizės reakcijos metodika. Sekos analizės bendros stadijos T7 DNR polimerazei detaliam aprašytos Tabor ir kt. darbe, žiūr. aukščiau. Žemiau trumpai aprašomos stadijos ir sąlygos.

A. Renatūracijos reakcija

Renatūracijos reakcijai gaunamas tirpalas:

181

Analizuojamoji DNR (pvz., DNR mGPI-2)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5: 0,1 mM EDTA, 2 mg/7 ml	7 ml
5X Seg Buf (200 mM -HCl, pH 7,5, 5 mM MnCl <sub>2</sub> , 250 mM NaCl)	2 ml
Pradmuo (17-meras, New England Biolabs, katalogo Nr. #1210 , 0,5 nm/ ml )	1 ml
	<hr/> 10 ml

Šis tirpalas šildomas iki 65 °C 2 min, o po to lėtai atvėsinaamas iki kambario temperatūros.

B. Žymės įvedimo reakcija

Žymės įvedimo reakcijai ruošiamas sekantis tirpalas:

Renatūruotas reakcijos mišinys	10 ml
Ditiotreitolas 0,1 M	1
/35S/ dATF, firma New England Nuclear NEG-034X	1
dTTF, dCTF, dGTF 1,5 mM kiekvieno	2
Genetiškai modifikuota T7 DNR polimerazė, 1 vienetas/ ml (Δ Lys 118 - Arg 145, kaip tai aprašyta anksčiau)	<hr/> 2
	16 ml

Visa tai inkubuojama kambario temperatūroje 5 min.

C. Užbaigimo reakcija

Šiai reakcijai ruošiami keturi mišiniai:

	G	A	T	C
5X Seg Buf	0,6	0,6	0,6	0,6 ml
4dNTP (3 mM)	0,3	0,3	0,3	0,3 ml
H <sub>2</sub> O	1,9	1,9	1,9	1,9 ml
ddGTF 0,2 mM	0,2 ml			
ddATF 0,2 mM		0,2 ml		
ddTTF 0,2 mM			0,2 ml	
ddCTF 0,2 mM				0,2 ml
	<hr/> 3	<hr/> 3	<hr/> 3	<hr/> 3 ml

Užbaigimo reakcijos mišinius inkubuoja 37 °C temperatūroje 2 min, o po to pridedama po 3 µl žymės įvedimo reakcijos produktų į šiuos mišinius. Gautas tirpalas inkubuojamas 37 °C 5 min.

Užbaigimo reakcija sustabdoma pridedant 5 µl 90% formamido, 20 mM EDTA, 0,2% bromfenolinio mėlio, ksilolo-cianolo, pH 8,0. Gauti mėginiai kaitinami iki 75 °C dvi minutes ir po to užnešamos ant poliakrilamidinio gelio (8% akrilamido, 0,3% bisakrilamido) 7 M šlapalo, 100 mM tris-borato, pH 8,9 ir atliekama elektroforezė prie 2000 voltų įtampos 2 val bėgyje. Gelis fiksuojamas 50% metanoliu, 10% acto rūgštimi 30 min, po to džiovinama ir naudojama juostelės analizei panaudojant autoradiografą.

Po ekspozicijos geliai ryškinami, ir skenuojant kiekvieną takelį densitometru, nustatomas radioaktyvių juostų intensyvumas (Džois, Lebl end Ko., modelio numeris MkLIIC).

Kuomet mėginiai buvo išbandyti, naudojant vietoje mangano magnį, sekančiuose tripletuose pabrauktos bazės buvo 2 - 5 kartus intensyvesnės negu kaimyninės bazės kiekvienu šių tripletų pasirodymo atveju: TCT, AAG, GCA, CCT. Tačiau tik ką aprašytame pavyzdyje juostos, atitinkančios kiekvienai bazei visuose ką tik nurodytuose tripletuose, turi vienodą intensyvumą, besiskiriantį vienas nuo kito daugiausia 20%.

2 pavyzdys: Sekos analizės reakcija, panaudojant manganą, 2X ddGTF ir IX ddCTF, tam kad būtų diferencijuoti G ir C pagal santykinį juostų intensyvumą.

Šiame pavyzdyje panaudotas tik vienas indas sekos analizės reakcijai tam, kad DNR matricoje būtų nustatyta dviejų tipų bazių ( C ir G) seka. Naudotos šios stadijos:

Renatūracijos reakcijoje gautas sekantis tirpalas:



mG PI-2 DNR (2,7 mM 10-je mM Tris-HCl	
pH 7,5, 0,1 mM EDTA)	8,6 $\mu$ l
5X Seg Buf	4
Pradmuo (pradmuo fam ABI, 0,4 pm/ $\mu$ l	2
H <sub>2</sub> O	<u>5,4</u>
	20 $\mu$ l

Tirpalas pakaitinamas iki 65 °C 2 min ir lėtai atvėsinaamas iki kambario temperatūros. Pradmuo fam žymimas fluorescencine žyme, kurią galima aptikti pastarajai migruojant per sekos analizės gelį, panaudojant DNR sekos Analizės Sistemą Modelis 370 A ABI.

Tęsiant reakciją, naudojamas sekantis tirpalas:

Renatūracijos reakcijos mišinys	20 $\mu$ l
Ditiotreitolas 0,1 M	1
4 dNTF 3 mM	3
ddGTF 30 $\mu$ M	3
ddCTF 30 $\mu$ M	<u>1,5</u>
	28,5 $\mu$ l

Šis tirpalas inkubuojamas 37 °C temperatūroje 2 min, po to pridama 1,5  $\mu$ l genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės ( $\Delta$  28), 1 vienetas/ $\mu$ l ir tirpalas inkubuojamas 37 °C temperatūroje 10 min. Reakcija sustabdoma pridėjus 5  $\mu$ l 100 mM EDTA, pH 8,0.

Gauti fragmentai išsodinami šiuo būdu: pridama 3,5  $\mu$ l 3M natrio acetato ir 100  $\mu$ l 100% etanolio. Inkubuojama ant ledo 10 min ir po to mišinys centrifuguojamas 30 min 4 °C temperatūroje mikrocentrifūgoje. Nuosėdos plaunamos 500  $\mu$ l 70% etanolium ir vėl centrifuguojama 5 min. Po to viršutinis sluoksnis nupilamas, o nuosėdos džiovinamos centrifuguojant vakume keletą min. Po to nuosėdos suspenduojamos 5  $\mu$ l 90% formamido, 50 mM EDTA, pH 8,0.

187

kaitino iki 75 °C 2 min, po to visa tai užnešama į DNR Sekos Analizės Sistemą Modelis 370A. Paleidus prietaisą, surinko gautus neapdorotus duomenis, kaip tai buvo aprašyta Modelio 370A naudojimosi instrukcijoje (preliminari versija, kovas, 1987, §§ 3, 4 ir 5). Pateikti neapdoroti duomenys tik pradmeniui fam.

Šios reakcijos rezultatai pateikti 4 pav. Kiekvienas G pateiktas aukštu pikų, o kiekvienas C - trumpu pikų. Tokiu būdu, G sekas DNR galima nustatyti pagal piko aukštį. Taip, vienoje iš sekos analizės reakcijų, kurioje naudota tik viena žymė visiems DNR produktams, galima nustatyti DNR sekos G ir C. Išilgai gelio piko aukštis pradeda mažėti, kadangi produktai, turintys didesnę molekulinę svorį, yra mažesniame kiekyje. Tačiau skirtumai tarp kaimyninių G ir C išlieka apie 2 kartus išilgai viso gelio, kai tuo tarpu skirtumai tarp kaimyninių G porų ir kaimyninių C porų apytikriai panašūs (keičiasi apie 1,1 - 1,4 karto), ir tai leidžia pakoreguoti kiekvienos papildomos pozicijos intensyvumą išilgai sekos. Pavyzdžiui, 4 pav. signalas sumažėja 2 kartus duotai juostų serijai einant išilgai apie 60 bazių. Tokiu būdu mažėja 1,16% kiekvienai papildomai pozicijai išilgai šio pradmens matricos (kadangi Chi yra 1,016, tai  $Chi^{60} = 2$ ).

Svarbu išmokti atskirti įvairaus intensyvumo juostas, kurias sąlygojo grandinės augimo stabdymo skirtingas efektyvumas, esančias tarp gretimų juostų, kada dvi ir daugiau juostų migruoja kartu elektroforezės metu. Pastarasis reiškinys, vadinamas "sangrūda", yra gelio elektroforezės artefaktas, o ne DNR sekos analizės pasireiškimas. Šio reiškinio neišvengiama net ir naudojant manganą. Vienas toks sangrūdos atvejis pažymėtas žvaigždute \* 4 pav. Jeigu žinoma, kad tokia sangrūda yra dviejų DNR produktų ber

dra migracija, kaip tai pažymėta 4 pav., tada ši juosta yra dvigubo intensyvumo tikras markeris.

Tikra seka sangrūdos srityje negali būti nustatyta. Tam, kad būtų nustatyta ši seka, būtina: arba 1) nustatyti seką su atvirkštine orientacija, arba 2) atlikti bandymą analizuojant seką gelyje žymiai griežtesnėmis denatūracijos sąlygomis, t.y. aukštesnėje temperatūroje arba pridėjus 50% formamido, arba 3) panaudoti nukleotidinių analogą, pvz., dNTP arba deazaGTP vietoje gGTP. Tokias sangrūdas sąlygoja gelio elektroforezės metu susidariusio pastovios DNR "sąsagos", o prisijungę nukleotidiniai analogai destabilizuoja didelę dalį šių "sąsagų".

"Sąsagų" sąlygotos sangrūdos gali turėti bet kokią ilgį, priklausomai nuo sąsagos galingumo. Taip pridėjus Mn, visos artimos juostos turi apytikriai vienodus DNR produktų kiekius, turinčius tą patį molekulinį svorį, tačiau esant sangrūdoms, nebūtinai turės vienodą juostų intensyvumą.

Žvelgdami į 2 pav., galime matyti, kad anksčiau aprašyta metodika, naudota su ddGTF, pridėjus mangano iki 1 mM. Kiekviena gauta analizės gelyje metu juosta parodyta 2 pav. piko pavidalu. Juostos intensyvumą parodo kiekvieno piko aukštis. Naudojant manganą, gretimų juostų intensyvuma, o tuo pačiu atitinkamai ir piko aukštis, išilgai gelio yra apytikriai vienodi, skirtumas tarp gretimų juostų sudaro mažiau 5 ar 10%.

Tuo tarpu rezultatai, pateikti 3 pav., priešingai, rodo bandymą, kur vietoje mangano, panaudotas magnis. Šiuo atveju gretimų juostų intensyvumas, ir, atitinkamai, pikų aukštis, varijuoja maždaug 10 kartų.

Žvelgdami į 5 pav., galime matyti, kad šiame bandyme naudo-

ti visi didezoksinukleotidai vienodose koncentracijose (kiekvieno ddNTF galutinė koncentracija 0,75  $\mu$ M kaip ir 2 pav.) sekos analizės reakcijoje pridėjus mangano. Šiuo atveju, kaimyninės juostos ir atitinkamai, pikai yra vienodi, besikeičiantis ne daugiau 1,5 karto. DNR produktui, turinčiam didesnę molekulinę svorį, absoliutus intensyvumas mažėja. Tuo tarpu, pridėjus magnio ir visus keturis didezoksinukleotidus, kaip tai parodyta 6 pav., priešingai, gretimų juostų intensyvumas žymiai varijuoja.

Keičiant kiekvieno ddNTF koncentraciją sekos analizės reakcijoje, galima nustatyti DNR grandinės nukleotidų seką. Tokios procedūros pavyzdys pateiktas 7 pav. Čia kiekvieno ddNTF koncentracija keičiama 30% intervalu; ddGTF (4,5  $\mu$ M, 2,2x), ddTAF (3,0  $\mu$ M, 1,7x), ddTTF (2  $\mu$ M, 1,3x) ir ddCTF (1,4  $\mu$ M, 1,0x). DNR seka, nustatyta pagal šią grafiką, pateikta paveikslėlyje antra eilute žemiau. Padarytos tik 6 klaidos (nurodytos simboliu "V"), palyginus su realiąja DNR seka. Šias klaidas galima pašalinti panaudojant kiekvieno ddNTF aukštesnes proporcijas (pavyzdžiui: 1xdddCTF, 2xdddTTF, 4xdddTTF, 4xdddATF ir 8xdddGTF). Lygiai taip pat, jeigu matuoti pikų plotą, o ne aukštį, tai rezultatai būtų tikslesni. Tokių pikų plotų matavimo kompiuterinės programos šiuolaikinei įrangai rašomos lengvai.

Žvelgdami į 8 pav., galime matyti, kad šiuo atveju nustatyta optimali sekos analizės reakcijai mangano koncentracija lygi 1 mM, nenaudojant chelatų, tokių kaip citratas arba izocitratas, kai tuo metu magniui ši koncentracija lygi 20 mM. Kuomet reakcijoje dalyvauja izocitratas 40 mM koncentracijoje, tuomet pridėjus mangano, polimerazės aktyvumas padidėja 4 kartus (optimali mangano koncentracija 5 - 20 mM).

Iš 9 pav. matyti, kad esant mangano 10 mM koncentracijai, izocitrato optimali koncentracija lygi 40 mM, ir, esant tokioms sąlygoms, polimerazės aktyvumas padidėja 4 kartus. Esant 10 mM magnio koncentracijai, bet koks izocitrato kiekis slopinančiai veikia polimerazės aktyvumą. Šie rezultatai gauti atliekant polimerazės reakciją pagal tai, kaip aprašyta žemiau, dalyvaujant įvairiems chelatams ir įvairioms jonų koncentracijoms. Detaliau: 200 ml reakcijos mišinio turėjo 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM di-tiotreitolo, 0,5 mM galvijų čiobrialiaukės denatūruotos DNR, 0,3 mM dGTF, dATF, dCTF ir (<sup>3</sup>H) dTTF (20 spm/nm), 50 μg/ml jaučio serumo albumino ir MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> arba natrio izocitrato nurodytas koncentracijas. Reakcija pradedama pridedant 0,1 vieneto genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės (Δ Lys 118 - Arg 145). Inkubuojama prie 37 °C 30 min. Reakcija sustabdoma pridedant 3 ml 1 M HCl tirpalo ir 0,1 M natrio pirofosfato, po to matuojamas radioaktyvumas dalyje, netirptančioje rūgštyje. Sekos analizės sąlygomis DNR polimerazės vienetas visada katalizuoja 10 nmolių nukleotidų, esančių netirpiu rūgštyje pavidalu, per 30 min. (Tabor ir kt., J. Biol. Chem., v. 262, p. 16212, 1987).

#### Pirofosfatazė

Kuomet DNR sekos analizei naudojama chemiškai modifikuota T7 DNR polimerazė, ilgiau painkubavus, išnyksta specifiniai fragmentai (Tabor ir Richardson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 4467, 1987). Pareiškėjas nurodo tas sritis, kur šis reiškinys matomas "tuštumų" pavidalu, ir ši procedūra sąlygoja sekos analizės gelyje tarpus. Tuštumos atsiranda dažniau, kai vietoje dGTF naudojamas dITF.

Šifruojant gelius, akivaizdžia problema tampa tokių speci-

188

finių fragmentų suirimas. Šifruojant seką, arba visai ignoruojamas fragmento nebuvimas, arba tai sąlygoja trūkumą nustatomoje sekoje arba, be to, galima stebėti "tuštumą", kurią galima interpretuoti tik kaip nežinomą bazę, esančią šioje pozicijoje.

Galima būtų spręsti šią problemą, siekiant trumpo reakcijos laiko. Tačiau tai netenkina dėl dviejų priežasčių. Pirma, tokiu būdu atlikti reakciją yra techniškai sunku, kadangi ji turi vykti labai sparčiai tam, kad tuoj po jos pradžios, ją galima būtų užbaigti. O dar svarbiau yra tai, kad kai kurios juostos itin jautrios irimui, ir jos išnyksta dėl šios priežasties netgi per trumpą reakcijos laiką.

Pareiškėjas sukonstravo genetiškai pakeistą T7 DNR polimerazės formą ( $\Delta$  28, aprašytą anksčiau), kuri nepasižymėjo žymesniu egzozonukleazės aktyvumu ( $< 10^{-7}$  x laukinio fermento lygio arba  $> 10000$  kartų žemesnis negu chemiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės aktyvumo lygis). Pareiškėjas tikėjosi, jog jeigu "tuštumos" atsiranda pailgėjus inkubacijai, tai jas matomai sąlygoja egzozonukleazės aktyvumas, ir tokiu būdu, naudojant, genetiškai modifikuotą T7 DNR polimerazės formą, jos turėtų neatsirasti. Tačiau anksčiau paminėti radioaktyvūs fragmentai vis tiek dingdavo tuo pačiu laipsniu, kaip ir naudojant ar chemiškai, ar genetiškai modifikuotą T7 DNR polimerazę.

Pareiškėjas nustatė, kad specifinių juostų išnykimą, sąlygoja polimerazės pirofosforolizės aktyvumas. Toks aktyvumas nepaiškinamas DNR polimerazės egzozonukleaziniu aktyvumu, o greičiausiai susijęs su polimerazės aktyvumo "konversija": dalyvaujant pirofosfatui (PPi) polimerazė gali prijungti PPi prie galinio nukleotido, esančio grandinės 3' gale, tuo pačiu išlaisvinda-

ma didezoksinukleozid-5'-trifosfatą. Žiūr. Doitčer ir kt., J. Biol. Chem., v. 244, p. 3019, 1969 ir Kornbergo knyga "DNR replikonas", pp. 125-126, išspausdintą Frimen ir Ko leidyklos, SF. Ši reakcija pasižymi bloko 3' gale pašalinimo efektu, o tai leidžia tęsti sintezę išilgai matricos. PPI kaupiasi DNR sintezės reakcijos mišinyje, kadangi jis yra polimerizacijos reakcijos produktas. Pirofosforolizės sritis priklauso nuo DNR sekos, ir tokiu būdu, tuštumos, aprašytos anksčiau, gaunamos tik specifiniuose saituose.

Tam, kad šis sunkumas būtų nagalėtas, reikia nuslopinti pirofosforolizės reakciją. Vienu iš pirofosforolizės inhibicijos kelių yra pirofosfato, atsiradusio polimerazės reakcijos metu, sudarymas tam tikslui pridėjus fermento - pirofosfatazės. Kiti būdai - tai pirofosfato pasikeitimas kitų fermentinių reakcijų pasekoje arba pridėjus analogo, inhibuojančio DNR polimerazės aktyvumą, išvengti pirofosforolizės reakcijos. Pareiškėjas nustatė, kad pridėjus šio fermento vos pėdsakinio kiekiu (viena tūkstantoji DNR polimerazės molekulės moliarinės dalies), sekos analizės reakcijoje pilnai stabilizuojama anksčiau paminėta fermentų specialiai klasė, ir tuo būdu išvengiama tuštumų. Dalyvaujant genetiškai T7 DNR polimerazės pakeistai formai ( $\Delta$  28) ir pirofosfatazei, visos juostos lieka stabilios, netgi esant ilgai (iki 2 val) inkubacijai.

Automatizuotos sekos analizės metu naudojant įvairaus intensyvumo juostas, svarbus tas faktas, kad kiekvienos juostos intensyvumą visiškai lemia ddNTP ir dNTP santykis. Pirofosfolizė gali kelti sunkumų, susijusių su kai kurių juostų intensyvumo sumažėjimu. Todėl šiuo atveju, naudojant tokią sekos analizės metodiką, ypač efektyvus pirofosfatazės pridėjimas.

Pirofosfatazė reikia pridėti kiekvieną kartą, kai sekos analizei naudojama chemiškai ar genetiškai modifikuota T7 DNR polimerazė, tokiu kiekiu, kad jo užtektų katalizuoti pasigaminusio PPI hidrolizę tiek, kad nustotų kauptis PPI tokia koncentracija, kuri gali iššaukti pirofosforolizę. Visa tai realu, kada vietoje dGTF naudojama dITF, kuomet tuštumas iššaukia pirofosforolizės reakcija, kuri vyksta dideliu greičiu.

3 pavyzdys: Pirofosfatazės panaudojimo sekos analizės reakcijose protokolas

Šiame pavyzdyje sekta bendru sekos analizės protokolu. Vienintelis pakeitimas buvo tai, kad naudota neorganinė mielių pirofosfatazė. Pirofosfatazės šaltinis neturi reikšmės, tačiau šiame pavyzdyje naudota neorganinė mielių pirofosfatazė Sigma, numeris kataloge 1-4503, papildomai jos nevalant arba po valymo monokolonėlėje FPLCH /skystinė chromatografija su programuotu srauto greičiu) ir neorganinė Uortingtono mielių pirofosfatazė, papildomai nevalyta. Ši pirofosfatazė pridedama prie modifikuotos T7 DNR polimerazės prieš žymės įvedimo reakciją. Bendrai, visai reakcijai sunaudojama 2 vienetai (0,25  $\mu$ g) polimerazės ir 0,001 vieneto mielių neorganinės pirofosfatazės (4 ng). Efektyvi gali būti plati pirofosfatazės aktyvumo sritis: nuo 0,01 ng iki 1  $\mu$ g mielių pirofosfatazės sėkmingai išbandyta sekos analizės reakcijose.

Pavyzdžiui, renatūracijos reakcijoje gautas sekantis tirpalas:

mG PI-2 DNR (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA)	7 $\mu$ l
5X Seg Buf	2
Pradmuo (17-meras, firma New England Biolabs, 0,5nm/ $\mu$ l katalogo numeris 1211 )	1
	<hr/>
	10 $\mu$ l



Šis tirpalas kaitinamas iki 65 °C 2 min ir lėtai atvėsinama iki kambario temperatūros.

Žymės įvedimo reakcijoje gaunamas šis tirpalas:

Renatūracijos reakcijos tirpalas	10 μl
Ditiotreitolas 0,1 M	1
<sup>35</sup> S dATF, New England Nuclear NEG-034X	1
3 dNTP (1,5 μM kiekvienam dTTP, dCTF, 3 μM dITF)	2
Fermentų mišinys (žiūr. žemiau)	2
	<hr/>
	16 μl.

Fermentų mišinys:

Genetiškai modifikuota T7 DNR polimerazė

Δ Lys 118 - Arg 145 1 vienetas/μl

Neorganinė mielių pirofosfatazė 0,01 vieneto/μl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM β-merkaptoetano-  
lio, 50 μg/ml jaučio serumo albumino

Šis tirpalas inkubuojamas kambario temperatūroje 5 min.

Užbaigimo reakcijose gaunami šie keturi reakcijos mišiniai:

	G	A	T	C	
5X Seg Buf (žiūr. anksčiau)	0,6	0,6	0,6	0,6	μl
4 dNTP( 3 mM kiekvienam dATF, dCTF ir 6 mM dITF)	0,3	0,3	0,3	0,3	μl
H <sub>2</sub> O	1,9	1,9	1,9	1,9	μl
ddGTF 0,03 mM	0,2				μl
ddATF 0,2 mM		0,2			μl
ddTTF 0,2 mM			0,2		μl
ddCTF 0,2 mM				0,2	μl
	<hr/>				
	3	3	3	3	μl

Šie reakcijos mišiniai inkubuojami 37 °C temperatūroje 3

min, po to 3  $\mu$ l žymės įvedimo reakcijos mišinio pridedama į kiekvieną reakcijos užbaigimo mišinį. Gautas tirpalas inkubuojamas 37 °C temperatūroje 60 min.

Kiekvieną užbaigimo reakciją baigdavo pridedami 5  $\mu$ l 90% formamido, 20 mM EDTA, 0,2% bromfenolio mėlio, ksilodacianolio, pH 8,0.

Mėginius kaitino iki 75 °C 2 minutes, užnešdavo į poliakrilamido gelį (8% poliakrilamido, 0,3% bisakrilamido) 7 M šlapalo 100 mM Tris-borato, pH 3,9 ir leido elektroforezę, esant 2000 V įtampai 2 valandas. Gelis fiksuojamas 50% metanoliu ir 10% acto rūgštimi 30 min, džiovino ir naudojo juostelės ekspozicijai autoradiografą.

#### Prietaisas

Žvelgiant į II pav., matyti, kad prietaisas 100, skirtas automatizuotai DNR sekos analizei, susideda iš reaktoriaus 102, turinčio anksčiau aprašytus reagentus 104, pavyzdžiui, DNR polimerazę, mangano ar geležies jonus, chelatus ir pirofosfatazę. Šis prietaisas taip pat turi talpą geliui 106, skirtą DNR produktų išfrakcionavimui pagal jų molekulinį svorį, ir gelių šifravimo prietaisą 108, skirtą DNR produktų aptikimui, kai pastarieji migruoja per gelį (parodyta punktyrinėmis strėlėmis 107). Be to, dar yra kompiuterinė įranga, <sup>110</sup>skirta DNR produktų juostų intensyvumo ir juostų pozicijų viena kitos atžvilgiu paskaičiavimui.

Jeigu DNR produktai susikaupę viename takelyje, tai kompiuterinė įranga padeda išskaičiuoti DNR seką remiantis juostų intensyvumu ir pozicijomis. Šios funkcijos realizacijai naudojamos standartinės kompiuterinės programos.

Kai kurie kiti realizacijos variantai yra sekančių išradi-  
mo punktų apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Viengrandinės DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atliekamos šios stadijos: anksčiau paminėtos viengrandinės DNR gavimas, anksčiaus paminėtos viengrandinės DNR ir pradmens, sugebančio hibridintis su šia DNR, renatūracija, gaunant renatūracijos mišinį, ir anksčiau paminėto renatūruoto mišinio inkubacija su dezoksiribonukleozidtrifosfatu, DNR polimeraze ir pirmuoju grandinės augimo stabdymo agentu, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ši inkubacija vykdoma tokiomis sąlygomis, kurioms esant, anksčiau paminėta polimerazė iššaukia anksčiau paminėto pradmens pailginimą (elongaciją) ir tuo būdu gaunama pirmų DNR produktų pirma serija, kurioje produktai skiriasi pailginto pradmens ilgiu, be to, kiekvienas anksčiau paminėtas pirmasis DNR produktas savo pailgintame gale turi anksčiau paminėtą grandinės augimo stabdymo agentą. Kiekvieno anksčiau paminėto pirmojo DNR produkto kiekis apytikriai vienodas visiems DNR produktams, besiskiriantiems 1-20 bazių ilgiu.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atliekamos papildomos stadijos: anksčiau paminėtų pirmų DNR produktų frakcionavimas gelyje pagal molekulinį svorį, gaunant pirmą juostų seriją, kurioje kiekviena pirmos serijos juosta atitinka atitinkamo molekulinio svorio anksčiau paminėtą pirmą DNR produktą, ir kurioje kiekvienos pirmos serijos kaimyninės juostos intensyvumas apytikriai vienodas visoms anksčiau paminėtoms pirmos serijos juostoms,

ir anksčiau paminėtos pirmos serijos kiekvienos juostos padėties nustatymas.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad anksčiau paminėtame renatūruotame mišinyje naudojamas vienas -trys papildomas grandinės augimo stabdymo agentas, kurio kiekvieno koncentracija skiriasi nuo kito grandinės augimo stabdymo agento koncentracijos, o anksčiau paminėta DNR polimerazė sąlygoja papildomų DNR produktų vienos-trijų papildomų serijų produkciją, kur kiekvienos papildomos serijos kiekvienas papildomas DNR produktas savo pailgintame gale turi vieną iš anksčiau paminėtų papildomų grandinės augimo stabdymo agentų. Kiekvieno iš nurodytų papildomų DNR produktų, turinčių vieną ir tą patį grandinės augimo stabdymo agentą, kiekis apytikriai vienodas visiems ilgiams 20 bazių ribose ir žymiai skiriasi nuo kiekio visų DNR produktų, turinčių kitą grandinės augimo stabdymo agentą ir esančių kitoje serijoje, tačiau turinčių apytikriai tokį patį molekulinį svorį.

4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad be to dar atliekamos stadijos: visų anksčiau paminėtų DNR produktų frakcionavimas gelyje pagal molekulinį svorį, kurio metu gaunamos nuo dviejų iki keturių juostų serijos, kuriose atitinkamai kiekviena anksčiau paminėta serijos juosta atitinka DNR produktą, turintį tą patį grandinės augimo stabdymo agentą, kaip ir kiekviena kita anksčiau paminėtos serijos juosta, ir atitinkamą molekulinį svorį. Kiekvienos kaimyninės juostos, priklausančios tai pačiai serijai, intensyvumas apytikriai vienodas, tačiau žymiai skiriasi nuo kitos kaimyninės juostos intensyvumo, ir kiekvienos serijos kiekvienos juostos intensyvumo ir padėties nustatymas.

5. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad be to dar į anksčiau paminėtą renatūruotą mišinį pridedama mangano arba geležies jonų, ir pastarieji anksčiau paminėti jonai padaro anksčiau paminėtą polimerazę nediskriminuojama anksčiau paminėtų grandinės augimo stabdymo agentų atžvilgiu.

6. Būdas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad DNR polimeraze pasirenkama T7 tipo DNR polimerazė, E. coli DNR polimerazės I diddysis fragmentas ir Taq polimerazė.

7. Būdas pagal bet kurį iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad anksčiau paminėtu grandinės augimo stabdymo agentu yra didezoksinukleozidtrifosfatas.

8. Būdas pagal bet kurį iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s dar tuo, kad į anksčiau paminėtą renatūruotą mišinį, pridedama chelato.

9. Priemonių rinkinys, naudojamas nustatant DNR nukleotidinę seką, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jo sudėtį įeina DNR polimerazė, grandinės augimo stabdymo agentas ir mangano arba geležies jonai.

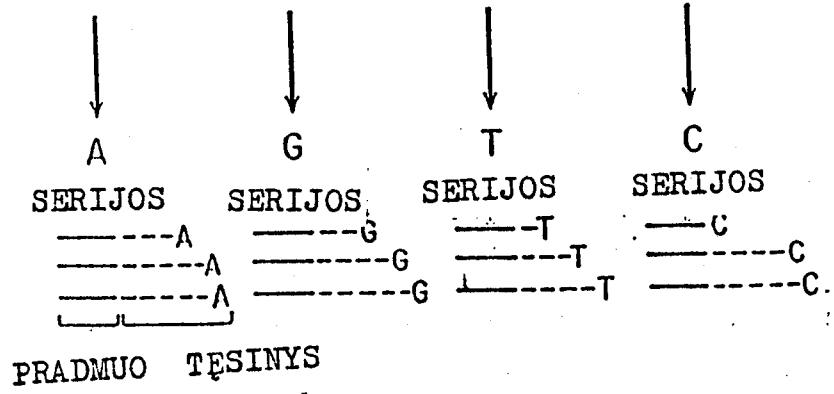
10. Rinkinys pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad anksčiau paminėta polimerazė yra T7 tipo DNR polimerazė, Klenovo polimerazė arba Taq polimerazė, o anksčiau paminėtu grandinės augimo stabdymo agentu yra didezoksinukleozidtrifosfatas.

11. Rinkinys pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jo sudėtį įeina pirofosfatazė.

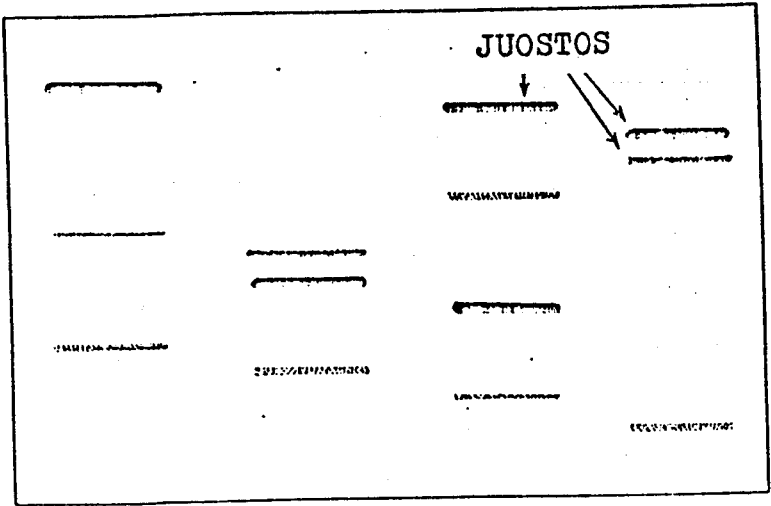
MATRICA 3' — GACTACCTAGGAT — 5'

PRADMUO 5' → 3'

DNR POLIMERAZĖ + GRANDINĖS AUGIMO STABDYMO AGENTAI



GELIO ELEKTROFOREZĖ

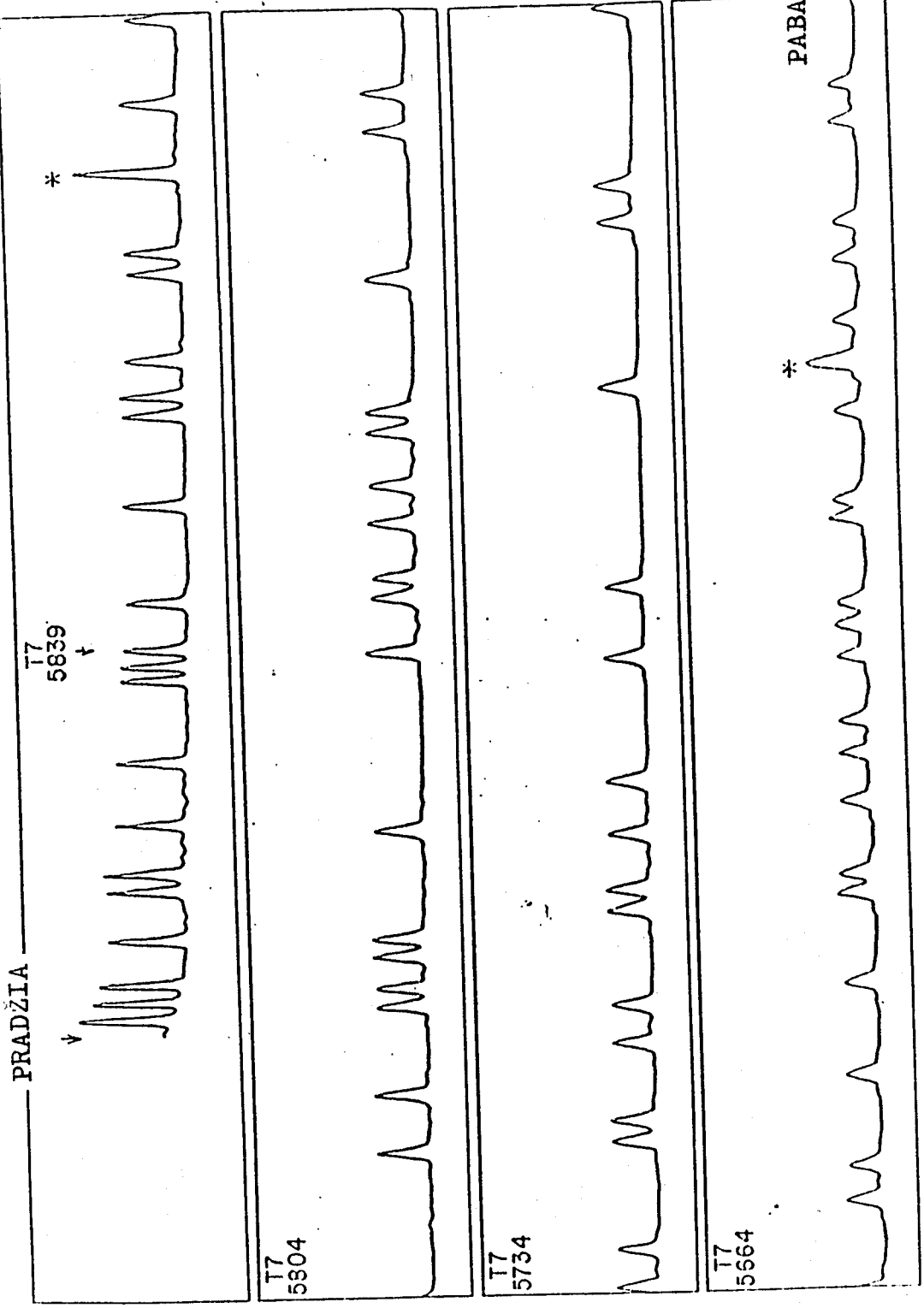


NUKLEOTIDŲ SEKA, NUSTATYTA PAGAL JUOSTŲ PADETĮ

A takelis G takelis T takelis C takelis

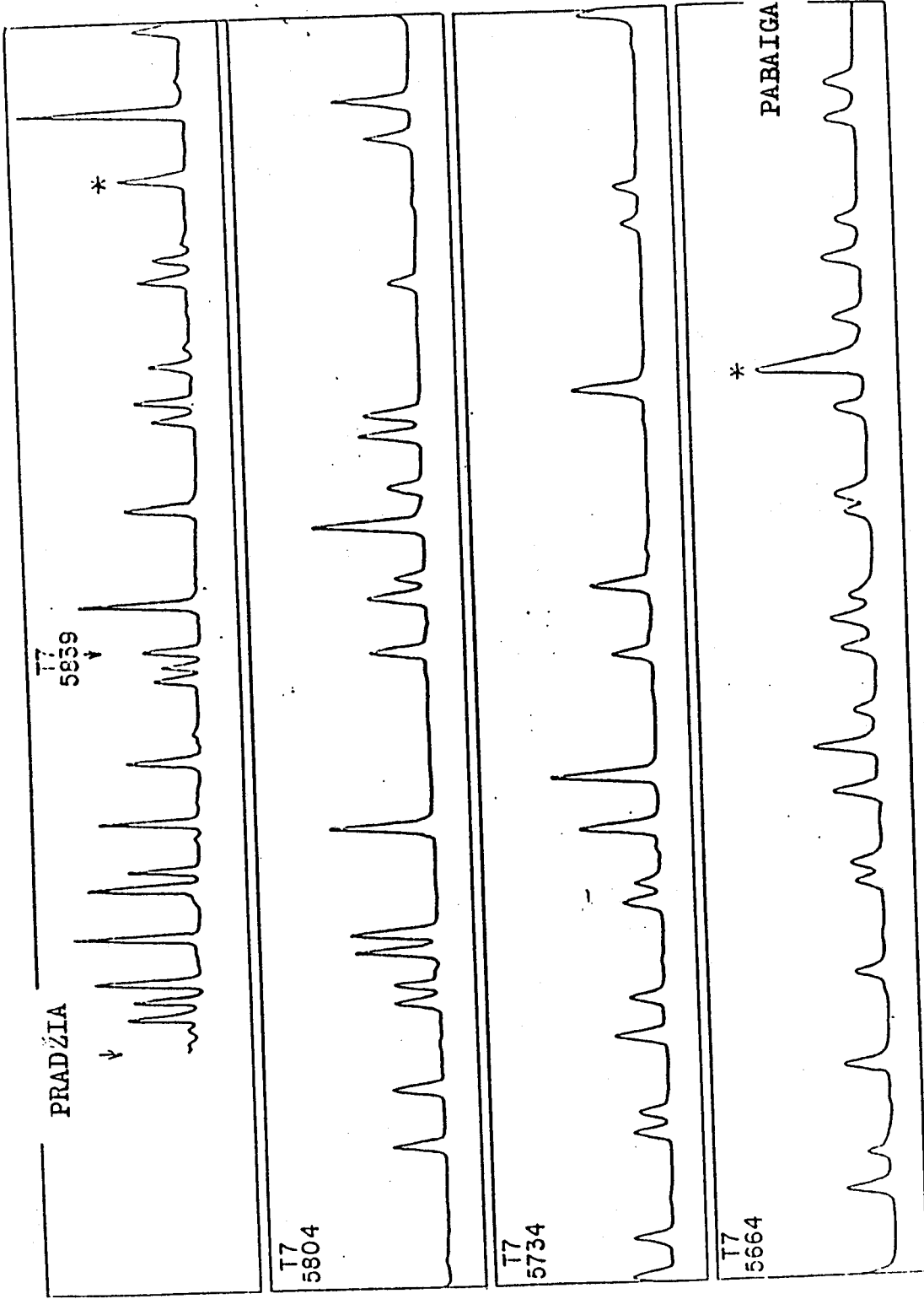
198

42



195

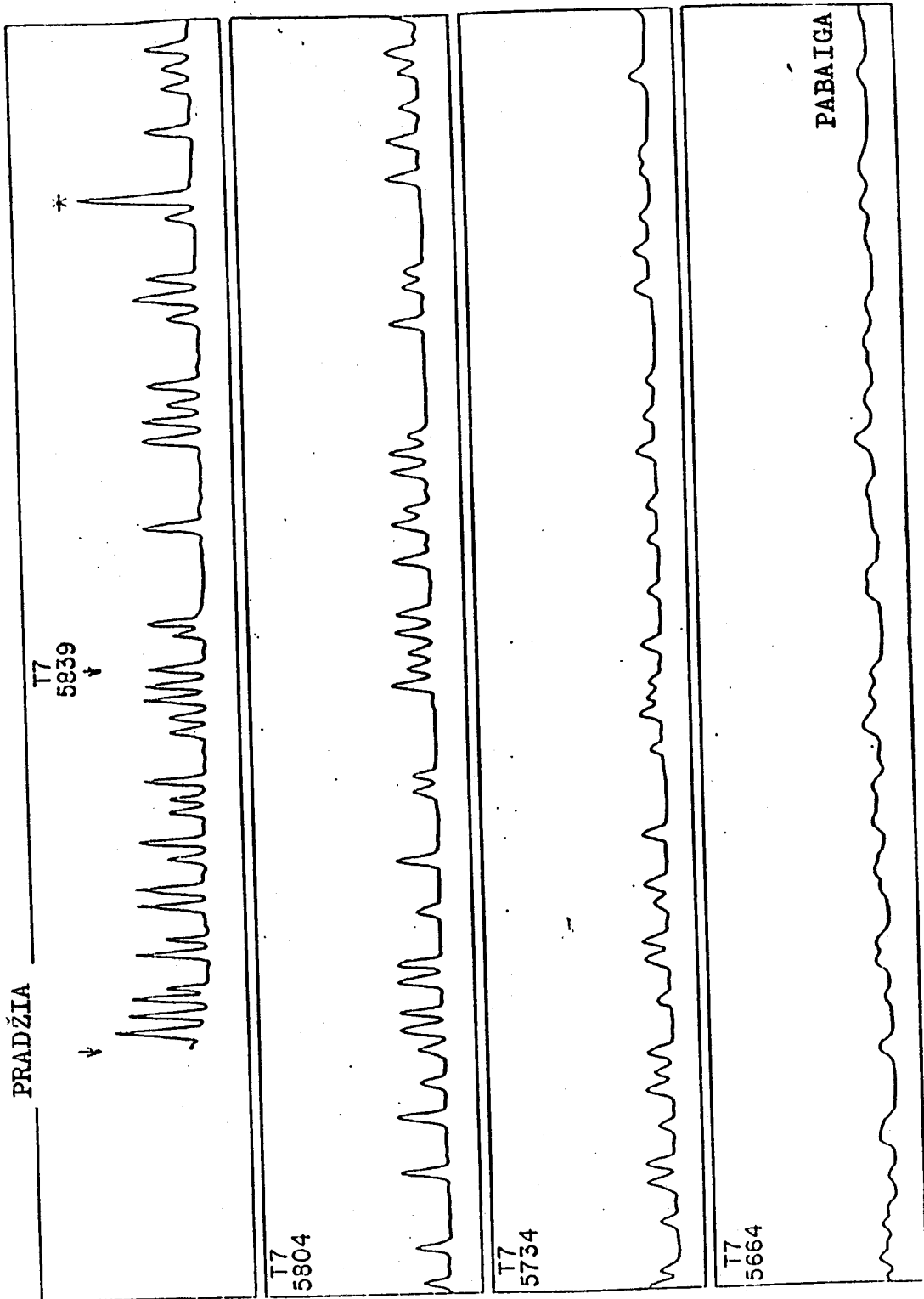
43





002

h4



T7  
5639  
PRADŽIA  
y

T7  
5804

T7  
5734

T7  
5664  
PABAIGA

T7  
5839  
↓

PRADŽIA  
↓



T7  
5804



T7  
5734



T7  
5664

PABAIGA

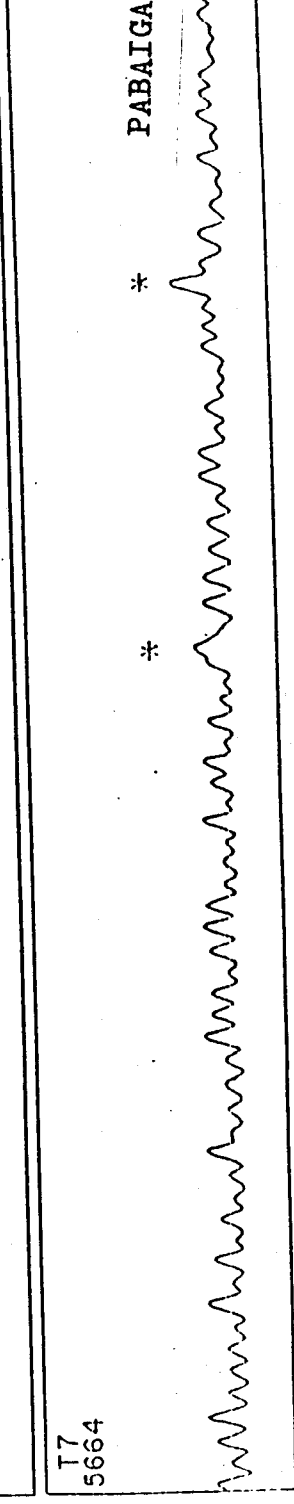
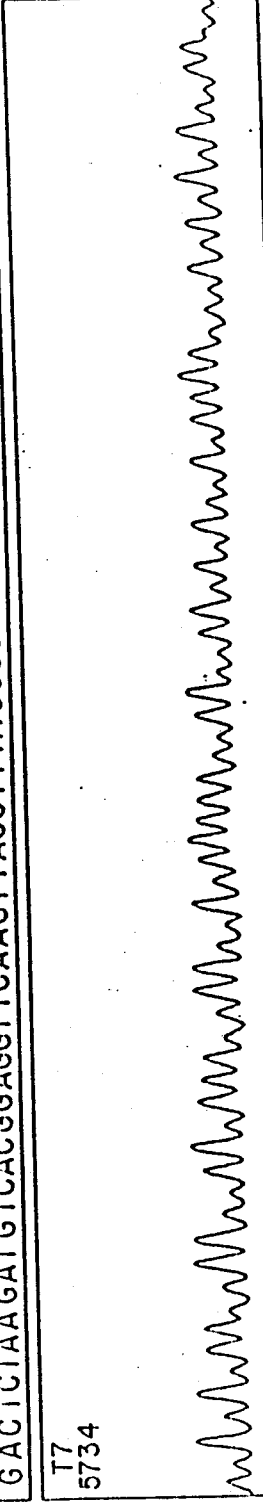
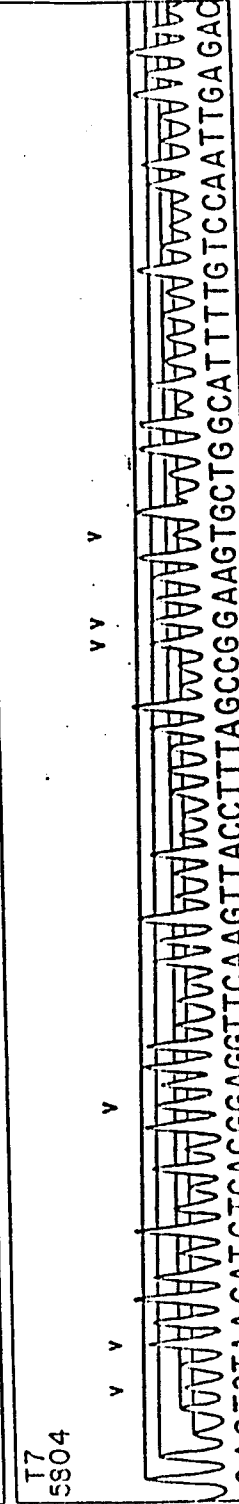
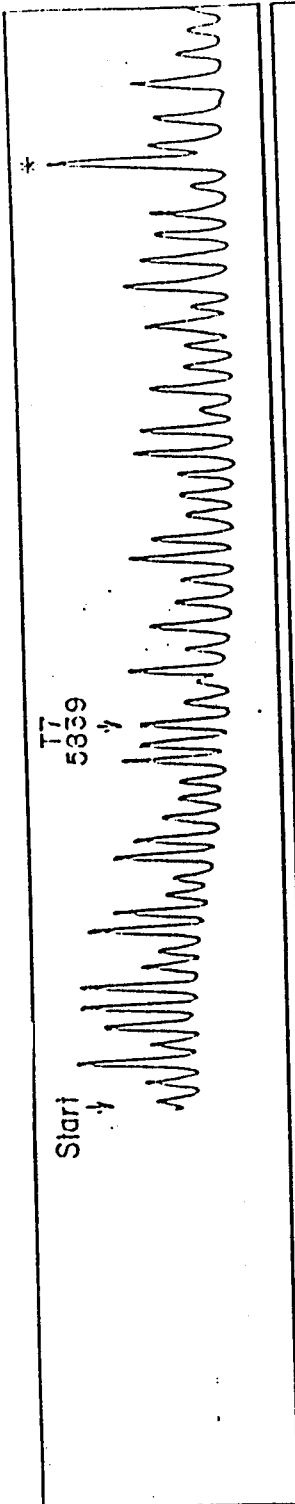


6 PAV.

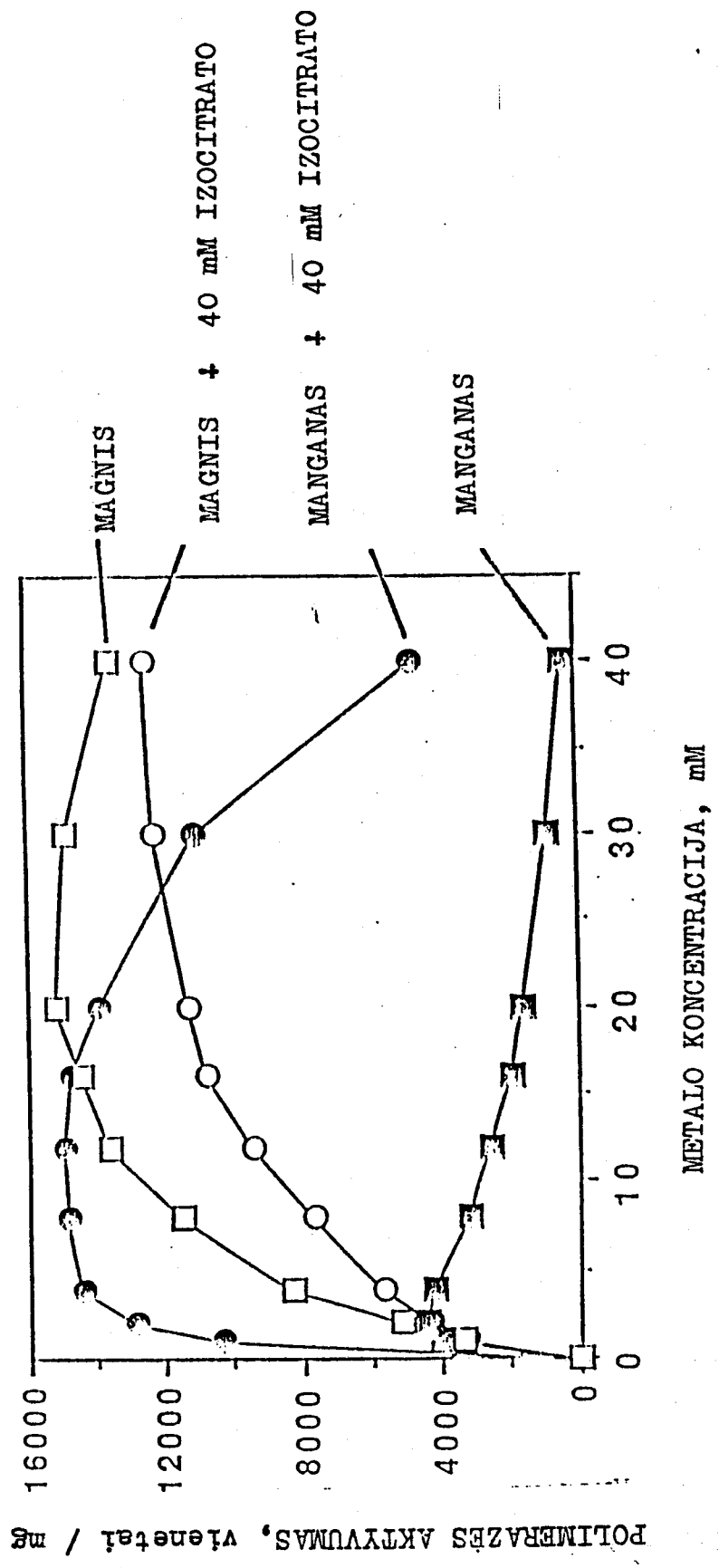
46

202

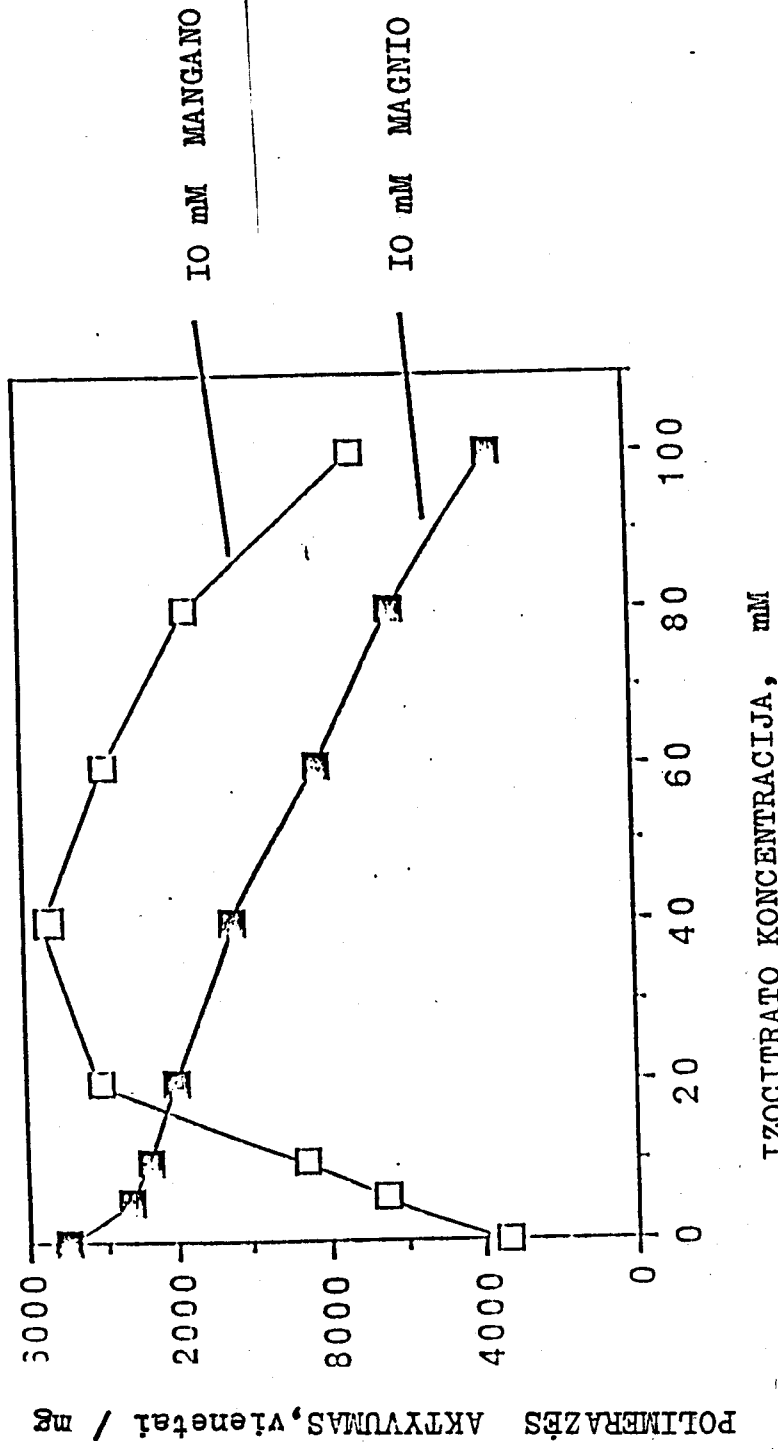
PRADŽIA



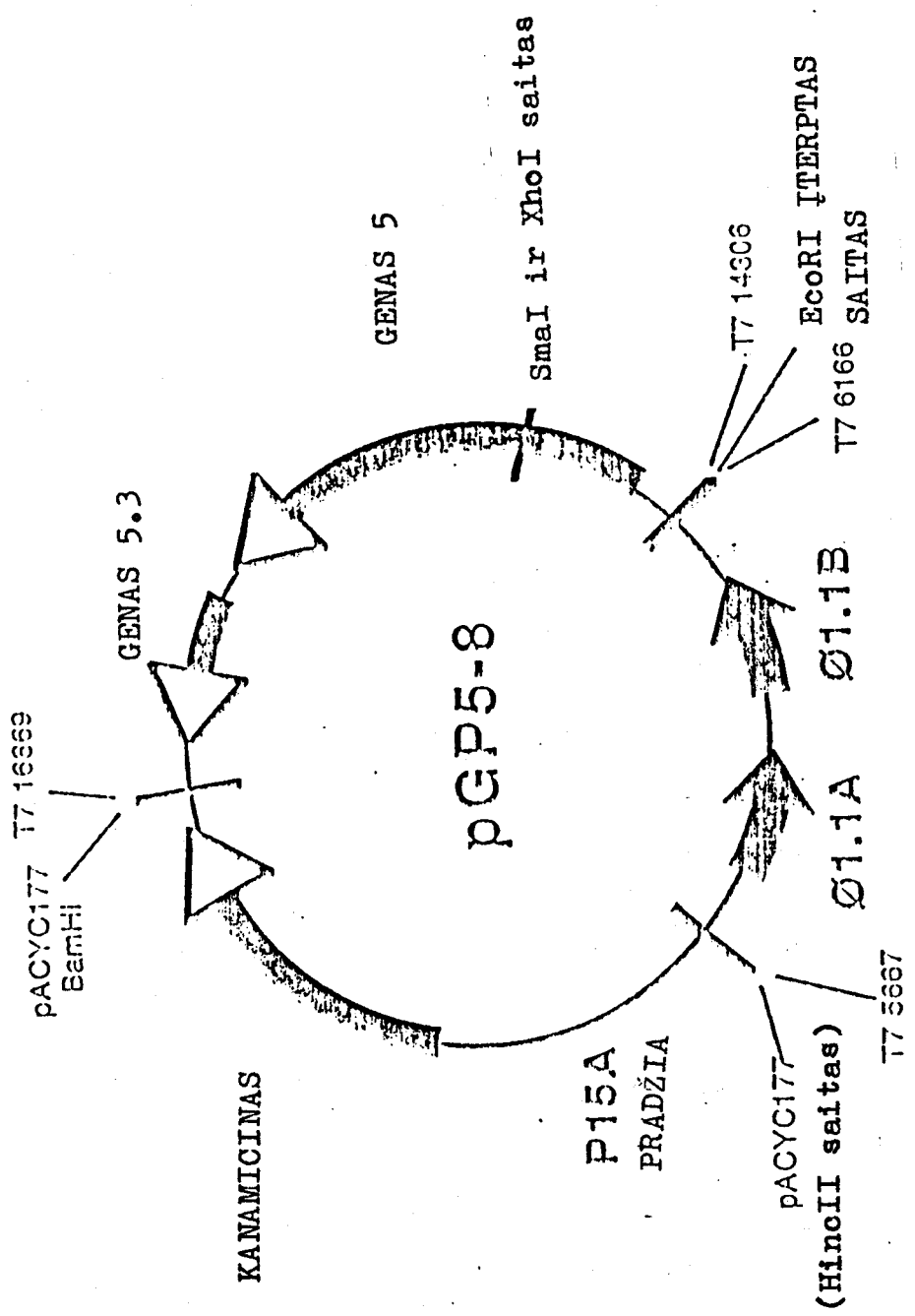
7 PAV.



8 PAV.



9 PAV.

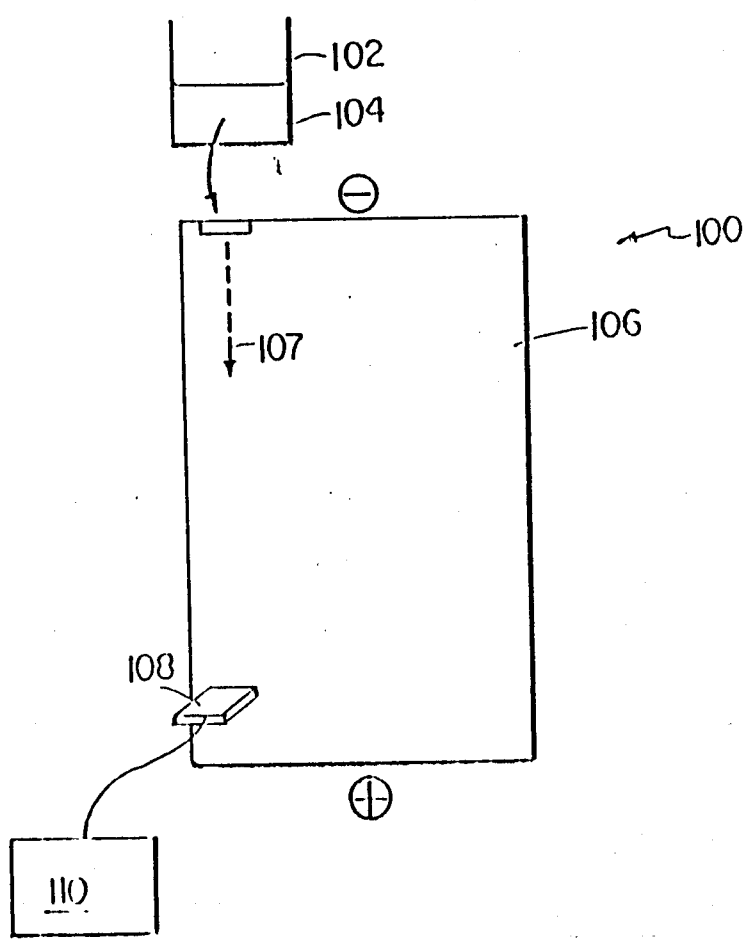


IO PAV.

25 246

70-9

5-1



II PAV.