

(19)



(10) **LT IP1519 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP1519**

(51) Int. Cl. (2006): **C12N 9/14**
C12N 9/16
C12N 15/00
C12N 15/09
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: **336751, 1989 04 12, US**
5010087, 1991 10 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 Žabolienės kontora METIDA, Verslo
centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Tirpalas, komplektas, oligonukleotidinio praimerio pailginimo būdas, DNR
amplifikacijos būdas

(57) Referatas:

—

TIRPALAS, KOMPLEKTAS, OLIGONUKLEOTIDINIO PRADMENS (PRAIMERIO)
ILGINIMO BŪDAS, DNR AMPLIFIKACIJOS BŪDAI

A P R A Š Y M A S

Šio išradimo prielaidos

Šis išradimas padarytas remiant vyriausybei, įskaitant Energijos departamento dotaciją, o taip pat JAV Nacionalinės Sveikatos tarnybos dotacijas Nr.DE-G02-88EP60688 ir Nr. AI-06045. JAV vyriausybė turi kai kurias teises į šį išradimą.

Ši patentinė paraiška yra dalinė tąsa JAV patentinės paraiškos Nr.2I80I03, pateiktos 1988 m.liepos 12d., pavadinimu "DNR sekos analizės būdas" /Tabor ir kt./, kuri čia naudojama kaip prototipas.

Šis išradimas skirtas praimerio (pradmens) prailginimo būdų įgyvendinimui DNR sekos analizės arba grandininės polimerazės reakcijos pagalba.

Praimerio prailginimo reakcijoje oligonukleotidinis praimeris, homologiškas viensiūlei šabloninei DNR, pavyzdžiui geno-
mo DNR, "atkaitinamas" (anylinamas) su šablonine DNR. Į mišinį po atkaitinimo toliau dedama DNR-polimerazė. Esant nukleozidų trifosfatams ir sąlygoms, kuriose DNR-polimerazė prailgina praimerį, susidaro šabloninei DNR komplementarus DNR siūlas. DNR sekos analizės reakcijoje praimeris ilginamas dalyvaujant grandinę nutraukiančiam agentui, pavyzdžiui, didezoksinukleozido trifosfatui, tam, kad įvykdyti specifinį bazės atžvilgiu praimerio ilginimo nutraukimą, žr. Senger ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci., v. 74, p.5463, 1977. Polimerazės grandininėje reakcijoje naudojami du praimeriai, kiekvienas iš jų homologiškas dvisiūlės DNR molekulės priešingos orientacijos siūlams. Po praimerių prailginimo jie atskiriami nuo savo šablonų ir papildomi praimeriai atkaitinami su šablonais ir prailgintais prameriais. Po to prailginami papildomi praimeriai. Atskyrimo, atkaitinimo ir prailginimo stadijos kartojamos tikslu ampflifikuoti šabloninės DNR kopijų kiekį, Saiki ir kt., Science, v. 239, p.487, 1988.

Trumpas išradimo aprašymas

Šis išradimas susijęs su tirpalu arba agentų komplektu, naudojamu ilginant oligonukleotidinį praimerį, turintį pirmą viensiūlę sritį šabloninėje molekulėje, turinčioje antrą viensiūlę sritį, priedo, pirma ir antra sritys yra homologiškos. Šis tirpalas arba agentų komplektas turi pirmą agentą, leidžiantį reakcijos mišinyje įvykdyti praimerio viensiūlės srities prailginimą ant antros šablono viensiūlės srities, ir antrą agentą, leidžiantį reakcijos mišinyje sumažinti pirofosfato kiekį iki

mažesnio lygio, negu tas, kuris gaunamas ilginimo metu nedalyvaujant antrajam agentui.

Tirpalu vadinamas vandeninis ir/arba buferizuotas skystis, turintis aukščiau aprašytus komponentus. Šie komponentai egzistuoja tirpale koncentracijose, pakankamose, kad įvykdyti priklausomą nuo jų funkciją. Pavyzdžiui, pirmas agentas egzistuoja koncentracijoje, pakankamoje tam, kad sumažinti pirofosfato kiekį tirpale. Agentų komplektu vadinama konteineris, kuriame atskirai laikoma viena, dvi arba keletas tirpalo komponentų. Pavyzdžiui, pirmi ir antri agentai saugomi atskiruose konteineriuose, tinkamų sumaišymui tirpalų pavidalu.

Oligonukleotidinio praimerio ilginimu vadinama reakcija, kurioje oligonukleotidinis praimeris, turintis viensiūlę sritį, atkaitinamas, arba jis natūraliai egzistuoja atkaitintoje būklėje su kitos nukleininės rūgšties molekule, kuri tarnauja šablonu, ant kurio oligonukleotidinis praimeris, pridėjus nukleozido trifosfatų, gali būti prailgintas, kad sudaryti nukleininę rūgštį, homologinę šabloninei nukleino rūgščiai. Bendrai, pailginimas užbaigiamas įdėjus DNR- arba RNR-polimerazės tam, kad kovalentiniu būdu prijungti nukleotidus prie praimerio.

Reakcijos mišiniu gali būti bet kuris tirpalas arba kieta fazė, skirta prailginimo reakcijos įvykdymui. Aplačiai, tai skystas buferis, turintis nukleozid- arba dezoksinukleozidtrifosfatus ir metalų ionus, būtinus prailginimo reakcijai. Šis mišinys gali taip pat turėti bet kuriuos standartinius buferinius agentus, o DNR sekos analizės reakcijos atveju - vieną arba keletą didezoksinukleozidtrifosfatų, arba ekvivalentinį grandinės nutraukimo agentą.

Pirofosfato kiekio sumažinimas suprantamas kaip pirofosfato kiekio reakcijos mišinyje sumažėjimas iki kiekio, kuris turi didesnę ar mažesnę efektą praimerio pailgėjimui ant šablono. Tai yra, pirofosfato koncentracija yra pakankamai žema, kad sumažinti pirofosforolizę iki nepastebimo lygio (mažiau, negu 10% pirofosforolizės lygio, esant 300 μ M pirofosfato). Geriausiam variante pirofosfato koncentracija sumažinama mažiau, negu 25 μ M, o dar geriau - mažiau 5 μ M. Šioje fazėje numatomas panaudojimas tokio agento, kaip pirofosfatazė, kuris sustabdo pirofosfato sintezę, o taip pat pašalina jį iš tirpalo.

Homologiškumu vadinama tai, kad šios dvi vienasios sritys sugeba sudaryti pakankamus nekovalentininius ryšius tarp savo atitinkamų nukleotidų, kad sudarytų stabilią dvisiulę struktūrą sąlygomis, naudojamomis nukleotidų "atkaitinimui" ir praimerio prailginimo reakcijos įvykdymui.

Optimaliuose variantuose pirmas agentas yra DNR-polimerazė, parinkta iš klenou, taq-polimerazės, I7 tipo DNR-polimerazės (t.y. polimerazė, analogiška polimerazei fazėje, kurioje DNR-polimerazė kaip subbloko reikalauja tioredoksin šeimininko, pavyzdžiui, DNR-polimerazė T7- arba DNR-polimerazė iš T3, Φ I, Φ II, H, W31, gh-1, Y, AAl1 22 arba Sp6), DNR-polimerazės T4, DNR-polimerazės T5, DNR-polimerazės Φ 29 ir atvirkštinės transkriptazės; Antras agentas yra fermentas, geriausiam variante pirofosfatazė, pavyzdžiui, pirofosfatazė atspari kaitinimui temperatūrų intervale nuo 60° iki 95°C.

Šio išradimo antrasis aspektas - siūlomas patobulintas būdas prailginimui oligonukleotidinio praimerio, turinčio viensiulę sritį molekulėje-šablone, turinčioje antrą viensiulę sritį;

Šis būdas siūlo pirmo agento įvedimą tam, kad užtikrinti ant šablono praimerio ilgėjimą. Patobulinimą sudaro įvedimas antro agento, kuris sugeba sumažinti pirofosfato kiekį iki mažesnio lygio negu tas, kuris gaminasi prailginimo metu be antrojo agento.

Optimaliuose variantuose į šitą būdą įeina mažiausiai vieno arba dviejų oligonukleotidinių praimerių, turinčių viensiūles sritis ir mažų mažiausiai vienos arba dviejų šabloninių molekulių, turinčių viensiūles sritis, įvedimas, o taip pat praimerių ir šablonų viensiūlių atkarpų atkaitinimas, reikalingas "atkaitinto" mišinio suformavimui. Praimerio pailginimui į gautą atkaitintą mišinį dedama pirmo ir antro agento. Į atkaitintą mišinį galima taip pat dėti didezoksinukleozidtrifosfato. Į šį būdą įeina taip pat praimerių atskyrimas nuo šablonų po jų pailginimo ir praimerių gavimo, jų pailginimo ir atskyrimo stadijų pakartojimas.

Artimu aspektu, atitinkamai šiam išradimui, siūlomas DNR amplifikacijos būdas, į kurį įeina polimerazės grandininės reakcijos realizavimas, dalyvaujant agentui, sugebančiam reakcijoje sumažinti pirofosfato kiekį. Optimaliam variante šis agentas yra pirofosfatazė.

Dar vienu artimu aspektu, sutinkamai su šiuo išradimu, siūloma DNR amplifikacijos būdas, į kurį įeina DNR-polimerazės №29 tirpalo, skirto DNR amplifikacijai, ir agento, sugebančio mažinti tirpale pirofosfato kiekį, panaudojimas.

Užsakovas nustatė, jog pirofosforolizė, kai sumažėja oligonukleotidinės grandinės ilgis, yra griauantis veiksnys praimerio ilginimo reakcijoje. Pirofosforolizę sukelia pirofosfatas.

Pavyzdžiui, polimerazės grandininė reakcija, kaip ji aprašyta Cetus (Europinė patentinė paraiška Nr. O 258 017), Saiki ir kt., Science, v.239, p. 487, 1988, inhibuojasi netgi prie labai mažų pirofosfato koncentracijų. Pirofosforolizė gali būti sustabdyta įvedant agentą, sugebantį pašalinti pirofosfatą, tai, pavyzdžiui, pirofosfatazę. Pirofosfatazės pridėjimas žymiai paspartina polimerazės grandininę reakciją ir rodo žymiai aukštesnius rezultatus, negu naudojant šį būdą be pirofosfatazės. Lygiai taip pat, pirofosfatazės pridėjimas į DNR-sekos analizės reakciją, sąlygoja didelį susidariusių ploiakrilamidiniame gelyje, kuris naudojamas sekos analizės reakcijos produktų identifikavimui, juostų intensyvumo tolygumą. Toks tolygumas sąlygojamas tuo, jog išvengiama pirofosforolizės dėka vykstančio specifinių DNR produktų irimo.

Kitos šio išradimo išskirtinės savybės ir privalumai išryškės iš duodamo žemiau optimalių variantų aprašymo ir iš išradimo apibrėžties punktų.

Optimalių realizavimo variantų aprašymas

Sutinkamai su šiuo išradimu, galima panaudoti bet kurį agentą, kuris sugeba inhibuoti pirofosforolizės reakciją. Viena iš pirofosforolizės inhibavimo procedūrų yra pridėjus pirofosfatazės suskaldymas bet kurio pirofosfato, kuris susidaro polimerazės reakcijos eigoje. Netgi pridėjus pirofosfatazės pėdsakus (viena tūkstantoji moliarinė DNR-polimerazės molekulių dalis tirpale) į praimerio pailginimo reakciją, išvengiant pirofosforolizės, pilnai stabilizuojasi oligonukleotidiniai fragmentai, gaunami polimerazės reakcijos eigoje. Tokį agentą

būtina pridėti koncentracijoje, pakankamoje tam, kad reakcijos mišinyje katalizuoti pirofosfato hidrolizę tokiu greičiu, kuris leistų išvengti pirofosfato akumuliacijos iki lygio, vedančio į pirofosforolizę, arba leistų išvengti pirofosfato akumuliacijos bet kuriuo kitu būdu. Būtinąs agento kiekis lengvai nustatomas standartiniais būdais.

Žemiau pateikiamas pirofosfatazės panaudojimo polimerazės grandininėje reakcijoje pavyzdys. Į šį pavyzdį nereikia žiūrėti kaip į šio išradimo apribojimą; bet kuriam šios srities specialistui aišku, kad bet kuri praimerio prailginimo reakcija pridėjus agento, kaip aprašyta aukščiau, bus efektyvesnė. Lygiai taip pat, pirofosfatazės panaudojimas pateikiamuose žemiau pavyzdžiuose neapriboja pateiktą išradimą; kiti agentai, sumažinantys praimerio ilginimo reakcijoje pirofosfato perteklių, gali būti lengvai nustatomi bet kurio šios srities specialisto. Santykinės praimerio, DNR-polimerazės ir pirofosfatazės koncentracijos, reikalingos šio išradimo ribose, lengvai nustatomos standartinių eksperimentų pagalba ir gerai žinomos bet kuriam šios srities specialistui.

Vienas šio išradimo privalumų yra tas, jog pirofosfatazė yra atspari aukštomis temperatūroms, kadangi aukštos temperatūros yra naudojamos grandininėje polimerazės reakcijoje. Pavyzdžiui, temperatūros nuo 95 iki 100°C, nors, bendrai, naudojamos temperatūros nuo 65 iki 95°C. Todėl, tinkamiausiam variante, naudojamas pirofosfatas, atsparus kaitinimui temperatūroje nuo 65 iki 95°C. Toksai pirofosfatas gali būti lengvai gaunamas iš bet kurių bakterijų, kurios auga ir lengvai dauginasi prie aukštų temperatūrų, pavyzdžiui, *Thermus aqua-*

ticus. Dauguma bakterijų turi natūralias pirofosfatazes ir, tokiu būdu, tos, kurios randasi aukštų temperatūrų aplinkoje gali būti pritaikomos kaip šio fermento šaltinis.

Pirofosfatazės panaudojimas polimerazės grandininėje reakcijoje, žemiau aprašytoje Taq-polimerazei, leidžia reakciją įvykdyti iki galo, tai yra, užtikrinti visų pridėtų dezoksinukleozidtrifosfatų sunaudojimą. Tai leidžia realizuoti diagnostinius metodus, panaudojančius polimerazės grandininę reakciją ir tinkančius automatizacijai. Reakcijos eigos analizei gali būti reikalingas fosfato susidarymo išmatavimas, arba DNR susidarymo iš dezoksinukleozidtrifosfatų išmatavimas (pavyzdžiui panaudojant rūgštinį nusodinimą), priedo abu jie yra paprasti ir greiti analizei; tuo pačiu atkreipta gelio panaudojimo būtinumas aptinkant polimerazės grandininės reakcijos produktą.

I PAVYZDYS: Polimerazės grandininė reakcija su pirofosfataze

Šiame pavyzdyje DNR, vadinama Trx-FMI3 (realiai naudojama DNR nevaidina lemiamo vaidmens), amplifikavo įvedant tiesioginį ir atvirkštinį praimerį, panaudojant polimerazės grandininę reakciją sekančiu būdu. Bendrai, šis būdas aprašytas Saiki ir kt., žr. aukščiau. Trx-F DNR 0,4 pikomolių koncentracijoje sumaišė su 1 μ l triso /IM, pH 8,5/, 10 μ l magnio chlorido /3mM/, 10 μ l tiesioginio praimerio /10 pikomolių; iš ALN/, 20 μ l atvirkštinio praimerio /10 pikomolių, firma New England Biolebe/, 2 μ l želatinos /0,5%/ ir 55 μ l destiliuoto vandens. Po to pridėjo 0,5 μ l taq-polimerazės /12 vienetų, firma US Biokemikelz, Klivlend, Ogaio/ ir tirpalą pakaitino vieną minutę iki 94°C, iki 50°C vieną minutę ir iki 72°C dvi minutes. Šitą kaitinimo

ciklą pakartojo 40 kartų. Identiškas reakcijas vykdė be pirofosfato ir su juo įvairiose koncentracijose /12 μ M, 37 μ M, 333 μ M ir 1 mM/, ir esant pirofosfatui /neorganinė mielių pirofosfatazė, gauta iš firmos Sigma, katalogas NT-4503, naudojama be valymo arba po valymo monoQ FPLC kolonoje/. Kitu pirofosfatazės šaltiniu yra mielių Worington neorganinė pirofosfatazė, be papildomo valymo. Bendrai, sunaudojama 0,001 vietų neorganinio mielių /4 kg/ pirofosfato aukščiau aprašytoje reakcijoje. Šitas kiekis, žinoma, gali būti žymiai didesnis, bet gali būti ir mažesnis. Standartinių tyrimų pagalba lengvai nustatomos koncentracijos ribos. Koncentracija turi būti pakankama tam, kad sumažinti pirofosfato kiekį maždaug iki mažiau, negu 5 - 50 μ M.

Aukščiau pateiktoje reakcijoje pirofosfatas inhibavo polimerazės grandininę reakciją 25 μ M ir didesnėje koncentracijoje. Pirofosfatazė stabdė šį inhibavimą ir stimulavo polimerazės grandininės reakcijos produktų išėigą maždaug du kartus.

2 PAVYZDYS: Atsparios kaitinimui pirofosfatazės gavimas

Čia pateikiamas neorganinio pirofosfato iš *Thermus aquaticus* ląstelių valymo pavyzdys. *T. aquaticus* ląstelės gautos iš Amerikos Kultūrų rinkinio. 10 litrų ląstelių auginta 70°C temperatūroje, naudojant terpę pagal Hena ir kt., J. Bacterid., v. 127, p. 1550 (1976). Ląstelės buvo surinktos /N 20g/, vėl suspenduotos į 40 ml 10% sacharozės, 50 mM Tris HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA; per tris praėjimus per French-press jos buvo lizuotos, ląstelių nuolaužos buvo pašalintos panaudojant centrifū-

gavimą Beckman rotoriuje 50 Tr, 30000 aps/min, 60 min. Tam, kad atskirti DNR, viršutinis sluoksnis buvo paveiktas streptomicino sulfatu. Į 40 ml viršutinio sluoksnio buvo įdėta 4 ml 40% streptomicino tirpalo, 30 min maišyta ir 30 min centrifuguota 8000 aps/min greičiu. Gautas viršutinis sluoksnis paveiktas amonio sulfatu. 60% amonio sulfate joks pirofosfatazės aktyvumas nesėdo, viskas sėdo prie 70% amonio sulfato; Į viršutinio sluoksnio 19 ml buvo įdėta 7,2 g amonio sulfato /60 %/, 30 min maišyta ir 8000 aps/min greičiu sukta 30 min. Į viršutinį sluoksnį pridėta 3 g amonio sulfato /70 %/, maišyta 30 min ir 8000 aps/min greičiu sukta 30 min. Tabletė vėl suspenduota į 20 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10% glicerino, 10 mM 2-merkaptoetanolio (Buferis A), o po to per naktį 2 litruose buferio A buvo vykdoma dializė. Dializės produktas buvo perleistas per koloną DE52 DEAE (100 ml), subalansuotą A buferyje, praplautas 300 ml Buferio A + 50 mM NaCl, o po to perleistas per litrą buferio A gradiento, turinčio nuo 50 mM iki 500 mM NaCl. Pirofosfatazę eliuavo Buferyje A, turinčiame 125 mM NaCl. Eliuatą /60 ml/ dializavo 2 l 20 mM KPO_4 , pH 7,4, 1 mM EDTA, 10 mM 2-merkaptoetanolio, 10% glicerino /Buferis B/ ir pakrovė ant fosfoceliuliozinės kolonos /100 ml/, sulygintos Buferyje B. Visas pirofosfatazės aktyvumas išteka per koloną. Šią srovę po to dializavo 20 mM Tris HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA, 10% glicerino /Buferis C/ ir užnešė ant mono Q FPLC kolonos buferyje C. Gradientą Buferyje C, turinčiame 100 mM NaCl - - 250 mM NaCl, leido per koloną ir pirofosfatazės aktyvumą eliuavo prie 180 mM NaCl koncentracijos. Frakcijas su pirofosfata-

zės aktyvumu dializavo 20 mM KPO_4 , pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 50% glicerino ir saugojo -20°C .

Šis pirofosfatazės aktyvumas nepažeidžiamas polimerazės grandininės reakcijos 40 ciklų eigoje, priedo, kiekviename cikle yra 1 min trukmės kaitinimo iki 95°C stadija. Priedo, pirofosfatazė ne hidralizavo dNTP ir reakcijos mišinyje tokiu dNTP nesiinhibavo. Pirofosfatazės aktyvumas analizuotas būdu, aprašytu Chen ir kt., Anal. Chem., v. 28, p. 1756 (1956) ir Joss, J. Biol. Chem., v. 241, p. 1938 (1966).

Kiti realizacijos variantai

Kiti realizacijos variantai randami žemiau pateiktuose išradimo apibrėžties punktuose. Pavyzdžiui, fermentai, kurie greičiau naudoja proteininį praimerį, negu DNR-praimerį, kuris polimerizuoja dvisiūlę DNR, pavyzdžiui DNR-polimerazė $\Phi 29$, gali būti panaudoti DNR amplifikavimui nebūtinai naudojant denatūruojančias kaitinimo stadijas arba pakartotinio "atkaitinimo" stadijas, Blanko ir kt., DNR replikacija ir mutagenėzė, A. .M., Sk. 12, 1988. Pirofosfatazės arba jos ekvivalento panaudojimas tokioje amplifikacijos reakcijoje padidins DNR, amplifikuojamos šioje sistemoje, išėigą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Tirpalas, naudojamas oligonukleotidinio praimerio (pradmens) ilginimui, turintis pirmą viensiūlę sritį molekulėje-matricoje, turinčioje antrą viensiūlę sritį, homologišką aukščiau paminėtai pirmai viensiūlei sričiai, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d turi DNR-polimerazę, parinktą iš Taq-polimerazės, T7 tipo DNR-polimerazės, DNR-polimerazės T4, DNR-polimerazės φ29, DNR-polimerazės T5 ir atvirkštinės transkriptazės; ši polimerazė sugeba reakcijos mišinyje ilginti praimerio pirmą viensiūlę sritį ant antros viensiūlės srities matricoje; tirpalas turi agentą, sugebantį reakcijos mišinyje sumažinti pirofosfato kiekį iki mažesnio lygio, negu tas, kuris gaminasi ilgėjimo metu nesant šiam agentui.

2. Tirpalas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d tipo T7 DNR-polimerazė yra DNR-polimerazė T7.

3. Tirpalas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d agentas yra fermentas.

4. Tirpalas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d fermentas yra pirofosfatazė.

5. Tirpalas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d pirofosfatazė išlaiko pakankamą aktyvumą sumažinant pirofosfato kiekį reakcijos mišinyje prie temperatūrų nuo 60 iki 95°C.

6. Kompletas, naudojamas ilginimui oligonukleotidinio praimerio, turinčio pirmą viensiūlę sritį molekulėje-matricoje, turinčioje antrą viensiūlę sritį, homologinę pirmai viensiūlei sričiai, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d turi DNR-polimerazę, parinktą iš Taq-polimerazės, T7-tipo DNR-polimerazės, DNR-polimerazės T4, DNR-polimerazės Φ 29, DNR-polimerazės T5 ir atvirkštinės transkriptazės, sugebančios reakcijos mišinyje vykdyti ilgėjimą pirmos viensiūlės srities ant aukščiau minėtos matricos antros viensiūlės srities; ir agentą, sugebantį reakcijos mišinyje sumažinti pirofosfato kiekį iki mažesnio lygio, negu tas, kuris gaminasi ilgėjimo metu nesant aukščiau minėto agento.

7. Kompletas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d T7 tipo DNR polimerazė yra DNR-polimerazė T7.

8. Kompletas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d agentas yra fermentas.

9. Kompletas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d fermentas yra pirofosfatazė.

10. Kompletas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d pirofosfatazė išlaiko pakankamą aktyvumą sumažinant pirofosfato kiekį reakcijos mišinyje prie temperatūrų nuo 60 iki 95°C.

II. Būdas prailginti oligonukleotidinį praimerį, turintį

pirmą viensiūlę sritį molekulėje-matricoje, turinčioje antrą viensiūlę sritį, homologišką pirmai viensiūlei sričiai, panaudojant DNR-polimerazę, parinktą iš Taq-polimerazės, T7 tipo DNR-polimerazės, DNR-polimerazės T4, DNR-polimerazės Φ 29, DNR-polimerazės T5 ir atvirkštinės transkriptazės, sugebančios vykdyti praimerio ilgėjimą ant matricos, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d aprūpina agentu, sugebančiu sumažinti pirofosfato koncentraciją iki žemesnio lygio, negu tas, kuris gaminasi ilgėjimo metu nesant aukščiau minėto agento.

I2. Būdas pagal II punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d papildomai aprūpina dviem oligonukleotidiniais praimeriais, turinčiais pirmas viensiūlės sritis, ir dvi homologiškas molekules-matricas, turinčias antras viensiūlės sritis, homologiškas pirmoms viensiūlėms sritims, o t.p. aukščiau minėtų praimerių "atkaitinimą" su molekulėmis-matricomis, tam, kad sudaryti "atkaitintą" mišinį.

I3. Būdas pagal I2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d aukščiau minėtą atkaitintą mišinį, kad vyktų praimerių ilgėjimas, aprūpina DNR-polimeraze ir aukščiau minėtu agentu.

I4. Būdas pagal I2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d vykdo priedo po prailginimo praimerių atskyrimo nuo molekulių-matricų stadiją, kad gauti vienasios molekules.

I5. Būdas pagal I4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d kartoja aprūpinimo dviem oligonukleotidiniais praimeriais stadiją, praimeriams ilgėjant ir dalijantis.

I6. DNR amplifikacijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d vykdo polimerazės grandininės reakcijos stadiją su DNR-polimeraze, parinkta iš Taq-polimerazės, T7 tipo DNR-polimerazės, DNR-polimerazės T4, DNR-polimerazės ϕ 29, DNR-polimerazės T5 ir atvirkštinės transkriptazės, dalyvaujant agentui, sugebančiam sumažinti pirofosfato kiekį aukščiau minėtoje reakcijoje iki mažesnio lygio, negu tas, kuris gaminasi aukščiau minėtos reakcijos metu nesant aukščiau minėto agento.

I7. Būdas pagal I6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d aukščiau minėtas agentas yra pirofosfatazė.

I8. Būdas pagal I6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d priedo vykdo aukščiau minėto "atkaitinto" mišinio aprūpinimą didezoksinukleozidtrifosfatu.

I9. DNR amplifikacijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d skirtą amplifikacijai DNR-polimerazės ϕ 29 ir DNR tirpalą aprūpina agentu, sugebančiu sumažinti aukščiau minėtam tirpale pirofosfato kiekį iki mažesnio lygio negu tas, kuris gaminasi aukščiau minėtam tirpale be agento.