

(19)



(10) **LT IP1531 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP1531**

(51) Int. Cl. (2006): **C12N 9/12**  
**C12P 19/00**  
**C12Q 1/68**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 06**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 09 25**

(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: **003227, 1987 01 14, US**  
**4355129, 1988 01 13, 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:

**DNR molekulės nukleotidinių bazių sekos nustatymo būdas**

(57) Referatas:

—

## DNR molekulės nukleotidinių bazių sekos nustatymo būdas

Šis patentas yra patentinės paraiškos Stanley Tabor ir kt. "T7 DNR Polimerazė", paduotos 1987 sausio 14 d., registracijos Nr. 003 227, ir į kurią yra nurodoma šiame aprašyme, tęsinys.

Šis išradimas liečia DNR polimerazes, tinkamas DNR sekoms.

DNR seka įjungia keturių viengubų DNR fragmentų generaciją, kurie turi vieną pastovų ir vieną kintantį galus. Pastovus galas visada baigiasi specifine nukleotidine baze (arba guaninas (G), arba adeninas (A), arba timinas (T), arba citozinas (C)). Keturios fragmentų eilės išskiriamos pagal savo ilgį aukštos skiriamosios galios poliakrilamido gelyje; kiekviena gelio zona atitinka DNR sekos specifiniam nukleotidui, ir tokiu būdu identifikuojama duotos nukleotidinės bazės vieta sekoje.

Paprastai yra naudojami du DNR sekos sudarymo būdai. Vienas būdas (Maksamo ir Hilberto sekos sudarymas) įjungia cheminį DNR fragmentų išskaidymą, kurių kiekvienas pažymėtas unikaliu radioizotopu savo pastoviam gale, ir kiekviena reakcija sukelia specifinį skilimą ties viena ar daugiau baze (G, A, T arba C). Kitas būdas (didezoksi sekos sudarymas) įjungia DNR grandinės fermentinę sintezę. Vykdomos keturios skirtingos sintezės, ir kiekviena reakcija veda prie specifinės bazės (C, A, T ar G) įstatymo į sekos galą, užbaigiant didezoksinukleotidų seką. Pastarasis būdas yra tinkamesnis, kadangi DNR fragmentai tolygiai pažymimi (lyginant su jų galų žymėjimo metodu), ir tokiu būdu ilgesni DNR fragmentai turi didesnį radioaktyvumą. Be to, vietoje žymėjimo izotopu  $^{32}\text{P}$ , nukleotidai gali būti žymimi izotopu  $^{35}\text{S}$ , kas pagerina matavimų tikslumą, ir reakcijos produktus labai paprasta identifikuoti, kadangi kiekviena linija atitinka arba C, arba A, arba T arba G. Fermentas, naudojamas didžiausiai didezoksi sekai, yra platus *Escherichia coli* DNR polimerazės fragmentas (Klenovo fragmentas). Kita naudojama polimerazė yra atvirkštinė AMV transkriptazė.

### Trumpas išradimo esmės aprašymas

Pagal vieną iš išradimo aspektų, numatomas DNR molekulės nukleotidinės sekos nustatymas, įjungiantis DNR molekulės aneliaciją su pradmens molekule, kuri gali hibridintis su

DNR molekulė; atskirų aneliuoto mišinio dalių mažiausiai keturiuose induose su skirtingais dezoksinukleozidotrifosfatais inkubaciją su procesyvine DNR polimeraze, kada polimerazė pasilieka surišta su didesne negu 500 bazių DNR molekulė prieš disocijaciją, esant aplinkos sąlygoms, paprastai sudaromoms DNR sekos sudarymo reakcijose, kai polimerazė turi aktyvumą 50 vnt. egzonukleazės 1 mg polimerazės, ir vieną iš DNR sintezės terminacijos agentų, kurie užbaigia DNR sintezę prie specifinės nukleotidinės bazės. Šis agentas užbaigia sintezę ties specifinėmis nukleotidinėmis bazėmis kiekviename inde. DNR inkubacijos reakcijos produktai išskirstomi pagal savo dydį tokiu būdu, kad galima nustatyti bent dalį DNR nukleotidinės sekos.

Pagal pageidaujamus šio išradimo realizavimo principus polimerazė pasilieka surišta su DNR molekulė mažiausiai 500 bazių, po ko įvyksta disocijacija; ši polimerazė tapati fagu T7 (t. y. fago, kurio DNR kaip subvieneto reikalauja šeimininko tioredoksino. Taip, pvz. T7 tipo fagas yra T7, T3, F1, F11, H, WS1, gh-1, Y, A1122 arba SF6, Studier: Virology, 95, 70, 1979) užkrėstų ląstelių polimerazei; ši polimerazė yra neatpažįstama didezoksinukleotidiniais analogais; ši polimerazė yra modifikuojama tokiu būdu, kad turi mažesnę aktyvumą, negu 50 vnt. egzonukleazės aktyvumo 1 mg polimerazės, geriau - mažiau kaip 1 vnt., dar geriau - mažiau kaip 0,1 vnt., o geriausiai - iš viso neaptinkamą egzonukleazės aktyvumą; polimerazė gali naudoti pradmenis iki 10 bazių ilgio arba pageidautina iki 4 bazių; šis pradmuo įjungia nuo 4 iki 40 nukleotidinių bazių ir yra viengrandinė DNR arba RNR; aneliacijos etapas įjungia duotos DNR molekulės ir pradmens pašildymą iki didesnės kaip 65°C temperatūros, pageidautina nuo 65 iki 100°C, ir pašildyto mišinio atšaldymą iki žemesnės kaip 65°C temperatūros, pageidautina iki 0-30°C; inkubacijos etapas įjungia pulsacijos ir skiedimo etapą, kur pulsacijos etapas įjungia aneliuoto mišinio maišymą su visais keturiais skirtingais dezoksinukleozidotrifosfatais ir su procesyvine DNR polimeraze, kai bent vienas iš dezoksinukleozidotrifosfatų yra pažymėtas; labiausiai pageidautina, kai pulsacijos etapas vykdomas sąlygose, kuriose polimerazė nerodo savo procesyvinių savybių, ir kai jis trunka nuo 30 sek. iki 20 min. esant temperatūrai nuo 0 iki 20°C, arba kai mažiausiai vienas iš nukleotidotrifosfatų yra užbaigiantis nukleotidas; ir skiedimo periodas įjungia grandinę užbaigiančio agento įvedimą į keturis skirtingus mėginius po

pulsacijos etapo; skiedimo etapas trunka nuo 1 iki 60 min., esant temperatūrai nuo 30 iki 50°C; užbaigimo agentas yra didezoksinukleotidas arba ribojantis dezoksinukleozidofosfat; vienas iš keturių dezoksinukleotidų yra DPTP arba deazaguanozinas; žymėti pradmenys naudojami tam, kad išvengti pulsacijos etapo, ir pageidautina, kad žymėtas pradmuo būtų radioaktyvus ar fluorescuojantis; duota polimerazė negali būti procesyvi antros aplinkos, kuri paprastai naudojama DNR sekų sudarymo pulsacijos reakcijoje, sąlygose.

Pagal kitus šio išradimo aspektus numatoma: a) dviskaidulinių DNR molekulių su nukirptais galais iš tiesios DNR molekulės, neturinčios 3' galo, gavimo būdas, naudojant nepriklausančią nuo egzonukleazės aktyvumo procesyvinę DNR polimerazę; b) DNR sekos amplifikacija, kuri įjungia pirmojo ir antrojo pradmens aneliaciją su priešingomis dvigubos DNR grandinių sekomis ir aneliuoto mišinio inkubaciją su procesyvine DNR polimeraze, kurios aktyvumas mažesnis už 500 vnt. egzonukleazės aktyvumo 1 mg polimerazės, pageidautina mažiau kaip 1 vnt., kai pirmasis ir antrasis pradmuo sukimba su priešingomis DNR grandinėmis; pagal pageidautinus šio išradimo principus, šie pradmenys turi 3' galus, nukreiptus viens į kitą; būdą, kuris papildomai įjungia, po inkubacijos etapo, gaunamos DNR denatūraciją, pirmojo ir antrojo pradmens aneliaciją su sudaroma DNR ir aneliuoto mišinio inkubaciją su polimeraze; denatūravimo ciklas, aneliacija ir inkubacija kartojami pageidautina 10-40 kartų; c) klonuotų DNR fragmentų mutagenezės būdas "in vitro", įjungiantis klonuojamąjį fragmentą ir DNR skaidulos sintezę, naudojant procesyvinę DNR polimerazę, kurios aktyvumas yra mažesnis, negu 1 vnt. egzonukleazės aktyvumo 1 mg. polimerazės; d) aktyvios T7 tipo DNR polimerazės gamybos būdas iš klonuojamų DNR fragmentų, kontroliuojant promotoriams (žr. žemiau) toje pačioje ląstelėje, kurioje indukuojami genai tik tada, kai ląstelės randasi augimo logaritminėje arba stacionarioje fazėje, ir polimerazės išskyrimas iš ląstelės; klonuoti fragmentai kontroliuojami promotoriais, kuriems reikalinga T7 RNR polimerazė; e) genas, koduojantis T7 tipo DNR polimerazę, ir šis genas genetiškai užkoduotas ir sukelia natūralios egzonukleazės aktyvumo sumažėjimą; modifikuojama histidininė grupė (His), o geriausiai - His-123 geno 5; f) geno, koduojančio genetiškai modifikuojamą polimerazę, produktas; g) T7 tipo DNR polimerazės valymo nuo ląstelių, įjungiančių aktyvuojantį duotą polimerazę vektorių,

būdas, įjungiantis ląstelių lizavimo ir polimerazės perleidimo per jonų mainų kolonėles, kolonėlę DE52 DEAE, fosfoceliuliozinę kolonėlę ir hidroksiacetatinę kolonėlę etapus; pageidautina kad iki šio etapo polimerazė būtų nusodinta amonio sulfato pagalba; be to pateiktas būdas įjungia polimerazės praleidimo etapą per kolonėlę Sefadeks DEAE A50; ir jonų mainų kolonėlė yra DE52EAE; h) egzonukleazės, esančios DNR polimerazės tirpale, veikimo inaktyvacijos būdas, įjungiantis šio tirpalo inkubaciją inde, kuriame yra deguonis, redukuojantis agentas ir pereinamasis metalas; i) DNR sekos sistemą, įjungiančią procesyvinę DNR polimerazę, nustatomą kaip aprašyta aukščiau, turinčią 500 endonukleazės aktyvumo vnt. 1 mg polimerazės, kur polimerazė gali veikti pirmos aplinkos sąlygose, ir neveikli antros aplinkos sąlygose; ir reagentas, parinktas iš užbaigimo agentų, reikalingas šiai sekai, bei dTTP; j) DNR fragmento 3' galo žymėjimo metodas, įjungiantis DNR fragmento inkubaciją su procesyvine DNR polimeraze, kurios aktyvumas yra mažesnis kaip 500 egzonukleazės aktyvumo vnt. 1 polimerazės mg. bei žymėtą dezoksinukleotidą; g) klonuoto DNR fragmento mutagenezės būdas "in vitro", įjungiantis pradmenį ir modelį, ir pradmuis ir modelis turi netaisyklingai suporuotas bazes, bei pradmens papildymas procesyvine DNR polimeraze; ir l) klonuoto DNR fragmento mutagenezės būdas "in vitro", įjungiantis klonuojamąjį fragmentą ir DNR grandinės sintezę naudojant procesyvinę DNR polimerazę, kurios aktyvumas yra mažesnis kaip 50 egzonukleazės aktyvumo vnt., sąlygose, sukeliančiose neteisingą nukleotido bazės įjungimą.

Šiame išradime DNR polimerazė, kuri yra procesyvinė, yra skaitoma neatpažįstama, ir ji gali naudoti trumpus pradmenis. Be to ši polimerazė neturi asociatyvinės endonukleazės aktyvumo. Tai idealios aukščiau aprašytų būdų charakteristikos, liečiančios konkrečiai DNR sekos sudarymo reakcijas, kadangi fono radioaktyvumo lygis poliakrilamidiniuose geliuose yra nepastebimas, ir praktiškai neegzistuoja dirbtinės energetinės zonos, kas leidžia lengvai identifikuoti DNR seką. Be to, tokia polimerazė leidžia naudoti naujus ilgų DNR fragmentų sudarymo būdus, kas smulkiau bus aprašyta toliau.

Kitos šio išradimo savybės ir pranašumai bus aiškūs iš šio aprašymo ir išradimo apibrėžties.

### Pageidautinų išradimo principų realizavimo aprašymas

Trumpas piešinių aprašymas:

Pieš. 1-3 - vektorių pTrx-2, mGP1-2 ir pGP5-5 schematinis pavaizdavimas;

Pieš. 4 - T7 DNR polimerazės selektyvaus oksidavimo grafinis pavaizdavimas;

Pieš. 5 - modifikuotos T7 polimerazės galimybės sintetinti DNR, esant eten-dATF, grafinis pavaizdavimas;

Pieš. 6 - genominės DNR fermentinės amplifikacijos, naudojant modifikuotą T7 DNR polimerazę, schematinis pavaizdavimas;

Pieš. 7,8 ir 9 - atitinkamai nukleotidinės sekos pTrx-2, dalių pGP5-5 ir mGP1-2;

Pieš. 10 - schematinis pGP5-6 pavaizdavimas.

Pieš. 11 - pagrindinė DNR sekvenavimo strategija, pagal Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, 7.1.1, 1987.

### DNR polimerazė

Paprastai DNR polimerazė, atitinkanti šį išradimą, yra procesyvinė, nepasižymi asociatyvinės egzonukleazės aktyvumu, natskirama nuo įvesto nukleotidinio analogo ir gali naudoti nedidelius oligonukleotidus (tokius, kaip keturių, šešių ir aštuonių nukleotidų sekos) kaip specifinius pradmenis. Toliau šios savybės aprašomos smulkiau.

### Procesyvumas

Procesyvumas suprantamas kaip DNR polimerazės savybė nenutraukiamam daugelio nukleotidų įvedimui, naudojant tą patį pradmenį - modelį natskiriant nuo modelio, DNR sekos sudarymo sąlygose. Procesyvumo lygis priklauso nuo polimerazių tipo: kai kurios iki disocijacijos apjungia tik kelias bazes (pvz. Klenovo fragmentas (maždaug 15 bazių), T4 DNR polimerazė (maždaug 10 bazių), T5 DNR polimerazė (maždaug 180 bazių), atvirkštinė transkriptazė (maždaug 200 bazių)) (Das ir kt. , T. Biol. Chem., t. 254, psl. 1227, 1979; Bambara ir kt. T. Biol. Chem., t. 253, psl. 423, 1978), tuo tarpu kai kitos polimerazės, atitinkančios šį išradimą, neapsiriboja mažiau kaip 500 bazių, ir netgi ne mažiau kaip 1000 bazių, esant atitinkamoms aplinkos sąlygoms. Tokios sąlygos turi įjungti visų keturių dezoksinukleozidofosfatų tiekimą ir inkubacijos temperatūrą nuo 10 iki 50°C.

Procesyvumas stipriai padidėja, aplinkoje esant *E. coli* viengrandinio surišimo baltymui (SSb).

Esant procesyviniams fermentams, sekos susidarymo terminacija vyks tik prie tų bazių, kurios įjungia sekos užbaigimo agentus, kaip didezoksinukleotidas. Jeigu DNR polimerazė neprocesyvinė, tai sekos sudarymo reakcijos eigoje atsiras dirbtinės zonos pozicijose, atitinkančiose nukleotidui, kur disocijuoja polimerazė. Dažna disocijacija sudaro energetinių zonų foną neteisingose vietose ir trukdo teisingos DNR sekos sudarymui. Ši problema dalinai išsprendžiama inkubuojant reakcijos mišinį ilgą laiko tarpą (30-60 min) esant aukštai koncentracijai substratų, kurie "pakelia" dirbtinių zonų molekulinį svorį iki aukšto lygio viršutinėje gelio dalyje, kuri nutolusi nuo tos zonos, kurioje registruojama DNR seka. Tai nėra idealus problemos sprendimas, kadangi egzistuoja didelė tikimybė, kad neprocesyvinė DNR polimerazė atsiskirs nuo modelio kompaktinės antrinės struktūros zonose. Pakartotinis pradmens ilginimo inicijavimas šiuose taškuose yra neefektyvus, ir paprastai sukelia zonų susidarymą vienoje vietoje visiems keturiems nukleotidams, kas sudaro kliūtį DNR sekai.

#### Analoginis skirtumas

DNR polimerazės, atitinkančios duotą išradimą, neskiria didezoksinukleotidinių analogų ir normalių nukleotidų. Kitaip sakant, analogo įjungimo tikimybė panašiai tokia pati, kaip ir normalaus nukleotido, arba bent jau sudaro 1/10 normalaus analogo įjungimo tikimybės. Polimerazės, atitinkančios išradimą, nelabai skiria ir kai kuriuos kitus analogus. Tai labai svarbu, kadangi kartu su keturiais normaliais dezoksinukleozidotrifosfatais (dGTF, dATF, dTTF ir dCTF) sekos sudarymo reakcijose yra reikalingi ir kiti nukleotidinių darinių tipai, kaip: radioaktyvūs ar fluorescuojantys žymėti nukleozidotrifosfatai, paprastai naudojami sintetiniams grandinėms žymėti izotopais  $^{35}\text{S}$  ir  $^{32}\text{P}$ , bei kiti cheminiai reagentai. Kai DNR polimerazė neskiria analogų, yra galimybė įjungti analogą, kaip normalų nukleotidą. Žymėtiems nukleozidotrifosfatams tai labai svarbu, siekiant gauti efektyvų sintezuotų DNR grandinių žymėjimą, palaikant radioaktyvumo minimumą. Be to, tokių fermentų atveju galimi mažesni analogų lygiai, kas daro sekos sudarymo reakciją pigesne, lyginant su skiriančio fermento atveju.

Skiriančios polimerazės rodo kitą atpažinimo laipsnį, kai jos polimerizuoja procesyvinu būdu, ir sintezė vyksta, pereinant antrinės struktūros sudaromą kliūtį. Esant tokioms kliūtims, bus pastebimas gelyje skirtingų radioaktyvių zonų variabilumas, kuris gali sukelti sekos identifikavimo sunkumus.

### Egzonukleazės aktyvumas

DNR polimerazė, atitinkanti šį išradimą, turi mažiau kaip 50%, pageidautina mažiau kaip 1%, o geriausiai - mažiau kaip 0,1% normalaus ar gamtinio egzonukleazės asocijuoto aktyvumo lygio (aktyvumo lygis vienai polimerazės molekulei). Normalus arba gamtinis aktyvumas suprantamas nemodifikuotos T7 tipo polimerazės egzonukleazės aktyvumas. Paprastai asociatyvinis aktyvumas sudaro 5000 vienetų egzonukleazės aktyvumo miligramui polimerazės, kaip aprašyta žemiau, modifikuojant metotiką Chase ir kt. (T. Biol. Chem., t. 243, psl. 4545, 1974). Egzonukleazės padidina DNR sintezės tikslumą naujų sintezuotų bazių pagalba, kurios neteisingai poruojasi su modelio bazėmis. Toks asociatyvinės egzonukleazės aktyvumas kenksmingas DNR sekos sintezės reakcijų tvarkai. Jis pakelia minimalią reikalingą koncentraciją pradinių nukleotidinių darinių, kurie turi būti įvesti į reakciją, kadangi, kai krenta nukleotidinė koncentracija, polimerazės aktyvumas sumažėja ir tampa egzonukleazės aktyvumo eilės, kas veda prie negrynos DNR sintezės ar net prie sintezuotos DNR degradacijos.

Labiausiai svarbu tai, kad asociatyvinės egzonukleazės aktyvumas sukels DNR polimerazės aktyvumo kritimą zonose su antrinės struktūros kliūtimis. Kai polimerazė priartėja prie tokios struktūros, sintezės greitis mažėja proceso vykimo eigoje. Asociatyvinė egzonukleazė iššauks naujai sintezuotos DNR eksciziją, neveikiant polimerazei. To pasekoje gali vykti daugkartiniai sintezės ir ekscizijos ciklai. Tai gali sukelti galutinę polimerazės vykdomą sintezę (be neigiamo poveikio sekos susidarymo reakcijai); arba polimerazė gali būti atskirta nuo sintezuotos grandinės (kas veda prie dirbtinės zonos susidarymo toje pačioje pozicijoje visose keturiose sekos sudarymo reakcijose); arba grandinės užbaigimo agentas gali būti dažnai įjungiamas, kas sukelia skirtingų sekos fragmentų intensyvumo gelyje variabilumą. Tai vyksta todėl, kad grandinės terminacijos agento įjungimo dažnumas bet kuriame nustatytame taške didėja, didėjant polimerazės galimybėms įvesti grandinės



užbaigimo agentą, ir tokiu būdu DNR polimerazė pasižymės žymiai didesniu grandinės užbaigimo agento įjungimo aktyvumu neaktyviuose taškuose, negu kitose taškuose.

Ideali sekos sudarymo reakcija sudaro vienodo intensyvumo zonas visame gelyje. Tai labai svarbu optimaliam rentgeno fotojuostos eksponavimui kiekvienam radioaktyviam fragmentui. Jeigu radioktyvių zonų intensyvumas skiriasi, silpnesnės zonos gali būti neaptiktos. Tam, kad gauti tolygų visų fragmentų radioaktyvumo intensyvumą, DNR polimerazė turi sugaišti vienodą laiką kiekvienoje DNR vietoje, vienodai įvedant ar pašalinant nukleotidus bet kuriame taške. Tai būna tada, kai DNR polimerazei trūksta asociatyvinės egzokleazės aktyvumo, kad būtų galima per modelio ilgį kiekvienoje sekos vietoje įvesti grandinės užbaigimo nukleotidą.

#### Trumpi pradmenys

DNR polimerazė, atitinkanti šį išradimą, gali naudoti pradmenis, susidedančius iš 10 bazių ir mažesnius, o taip pat ilgesnius pradmenis, pageidautina susidedančius iš 4-20 bazių. Galimybė naudoti trumpus pradmenis suteikia visą eilę svarbių pranašumų DNR sekai. Trumpesni pradmenys pigesni ir juos lengviau sintezuoti, negu įprastus 15-20 ilgio pradmenis. Be to, jie greičiau sukimba su DNR modelio papildomais taškais, kas padidina sekos susidarymo greitį. Toliau, galimybė naudoti trumpus (ne ilgesnius kaip 6-7 bazių) oligonukleotidinius pradmenis DNR sekoje įgalina pasiekti proceso operatyvumą sudarant ilgų DNR fragmentų sekas, kas neįmanoma kitais atvejais.

Taip, pvz. gali būti sukurta sistema, susidedanti iš 80 heksamery, iš kurių nei vienas nepapildomas nei viename klonavimo vektoriaus taške. Statistiškai viena iš 80 heksamerynių sekų teks vidutiniškai kiekvienoms 50 bazių per visą DNR fragmento ilgį. 3000 bazių sekos nustatymui reikės tik penkių ciklų. Pirmasis "universalus" pradmuo (pvz. New England Biolabs 1211, seka 5'GTAAAACGACGGCCAGT3') naudojamas maždaug 600 bazių sekai nuo vieno intarpo galo. Naudojant duotos sekos sudarymo reakcijos rezultatus, gali būti parinktas sekantis pradmuo iš duotos sistemos homologinės srities nustatomos sekos galo srityje. Antro ciklo metu bus nustatytos sekančios 600 bazių, naudojant duotą pradmenį. Šios procedūros pakartojimas penkis kartus leis pilnai nustatyti 300 bazių seką, nenaudojant subklonavimo ir kokių nors naujų oligonukleotidinių pradmenų cheminės

syntezės. Tokių trumpų pradmenų naudojimas gali būti padidintas, įjungiant į sekos susidarymo reakciją T7 tipo baltyminės sekos genus 2,5 ir 4.

DNR polimerazės, atitinkančios šį išradimą (t. y. turinčios visas aukščiau minėtas savybes), įjungia T7 tipo modifikuotas polimerazes. Tai DNR polimerazės, kurioms reikia šeimininko tioredoksino kaip subvieneto, ir jos faktiškai identiškos DNR modifikuotai polimerazei T7 ar ekvivalentiniams fermentams, išskirtiems iš giminingo fago, tokio, kaip T3, F1, F11, H, W31, gh-1, Y, A1122 ir SP6. Kiekvienas iš šių fermentų gali būti modifikuotas tokiu būdu, kad turės savybes, analogiškas T7 modifikuoto fermento savybėms. Minėtus fermentus galima išskirti iš ląstelių, užkrėstu fagu, bet geriausiai jį išskirti iš ląstelių kurios jį intensyviai gamina. Faktiškai identiška suprantama taip, kad duotas fermentas gali turėti aminorūgštinius pakaitalus, kurie neturi įtakos bendroms fermento savybėms. Pageidaujamas aminorūgštinis pakaitalas yra toks, kuris modifikuoja natūralų fermentą, anuliudamas jo egzonukleazės aktyvumą. Šią modifikaciją galima atlikti genetiniame arba cheminiame lygyje (žr. žemiau).

#### Polimerazės T7 klonavimas

Kaip šio išradimo pavyzdį reikia aprašyti T7 DNR polimerazės klonavimą, intensyvų gaminimą, išvalymą, modifikaciją ir panaudojimą. Šis procesyvinis fermentas susideda iš dviejų poli-peptidų, sudarančių kompleksą su stochiometrinio santykiu 1 su 1. Vienas jų yra T7 fago geno 5 koduotas baltymas 84000 daltonų (Modrich ir kt., T. Biol. Chem., t. 150, psl 5515, 1975), kitas yra *E. coli* koduotas tioredoksinas 12000 daltonų (Tabor ir kt., T. Biol. Chem., t. 262, 16, 216, 1987). Tioredoksinas yra papildomas baltymas ir prijungia geno 5 baltymą (neprocesyvinė DNR polimerazė) prie pradmens modelio. Natūrali DNR polimerazė turi labai aktyvią asocijuotą su ja 3'-5' egzonukleazę. Šis aktyvumas leidžia naudoti polimerazę DNR sekoje, ir ji gali būti inaktyvuota ar modifikuota prieš polimerazės panaudojimą. Tai labai lengvai realizuojama, kaip aprašyta žemiau, chemiškai, lokaliai oksiduojant egzonukleazės sritį, arba genetiškai, modifikuojant polimerazės geno koduojančią zoną, kuri koduoja minėtą egzonukleazės aktyvumą.

### pTrx-2

Siekiant klonuoti *E. coli* geną *trx A* (tiorredoksina), laukinio tipo *E. coli* DNR dalinai buvo suskaldoma Sau 3A pagalba ir gauti fragmentai, susiūti su T7 DNR, suskaldytos BamH1 pagalba, buvo išskiriami iš štamo T7ST9 (Tabor ir kt. Tiorredoksininės ir Glutaredoksininės sistemos, Struktūra ir funkcija, psl 285-300, Kaven Press; ir Tabor ir kt., žr. aukščiau). Ši susiūta DNR buvo pernešta į ląsteles *E. coli* *trxA*<sup>-</sup>, mišinys buvo pasėtas ląstelėse *trxA*<sup>-</sup>, ir buvo išskirti gauti fagai T7. Kadangi fagas T7 negali būti auginamas be *E. coli* *trxA* aktyvaus geno, tai tik fagai, turintys geną *trxA* galėjo sudaryti kolonijas. Klonuoti genai *trxA* buvo fragmente HincII 470 bazinių porų.

Tam, kad būtų galimas intensyvus tiorredoksino gaminimas, kaip konstruktorius buvo paimta plazmidė PTrx-2. Fragmentas HincII iš 470 bazinių porų, turintis geną *trxA*, buvo išskirtas standartiniu būdu (Maniatis ir kt. Klonavimas, A Laboratory Manuals, Cold Spring Harbor Labs, Niujorkas) ir susiūtas su plazmidės pBP 322 dariniu, turinčiu promotorių Ptac (ptac-12, Amann ir kt., t. 25, Geno 167, 1983). Kaip parodyta pieš. 2, ptac-12, įjungiantis β-laktamazę ir šaltinį ColE1, buvo sudaromas PvuII, sudarant fragmentą iš 2290 pagrindinių porų (bp), kuris paskui buvo susiuvamas su dviem tandeminėmis *trxA* kopijomis (fragmentas HincII), naudojant pramonės gaminamas jungimo grandis (polijungiančios grandys SmaI-BamIII), sudarant pTrx-2. Ši pilna nukleotidinė seka pTrx-2 parodyta pieš. 7. Tiorredoksino gavimas kontroliuojamas promotoriumi tac, ir tokiu būdu gali būti specifiškai indukuotas, pvz. 1PTG (izopropil-β-D-tiogalaktozidas) pagalba.

### pGP5-5 ir mGP1-2

Kai kurie T7 geniniai produktai yra letalūs *E. coli*. Buvo išdirbta aktyvacijos sistema, palengvinanti letalių genų klonavimą ir aktyvavimą, pagrįsta indukuotu T7 RNR polimerazės aktyvavimu. Geno 5 baltymas yra kai kuriuose *E. coli* štamuose letalus; ir tokios sistemos pavyzdys aprašomas darbe Tabor ir kt. Proc. Nat. Acad. Sci., t. 82, 1074, 1985, kur T7 genas kontroliuojamas promotoriu F10, ir aktyvuojamas tik kai T7 RNR polimerazė yra ląstelėje.

pGP5-5 (pieš. 3) buvo padaryta standartiniais metodais, naudojant sintetines jungiančias grandis BamHI T7 fragmento nuo 14306 (NdeI) iki 16869 (AhaIII), turinčio geną 5, sujungimui su T7 fragmentu (560 bp) nuo 5667 (HincII) iki 6166 (Fnu4HI), įjungiantį kaip F1,1A ir F1,1B promotorius, kurie atpažįstami T7 RNR polimerazės pagalba, taip ir fragmentą 3kbBamHI - HincII pACYC177 (Chang ir kt., T. Bacteriol, 134, 1141, 1979). Ši T7 intarpų ir jungiančiųjų grandžių nukleotinė seka parodyta pieš 8. Šioje plazmidėje genas 5 aktyvuotas tik tada, kai T7 RNR polimerazė randasi ląstelėje.

Kaip parodyta pieš. 3, T7 RNR polimerazė yra fago mGP1-2 vektoriuje. Ji analogiška pGP1-2 (Tabor ir kt.), išskyrus tai, kad T7 fragmentas nuo 3133 (HaeIII) iki 5840 (HinfI), turintis T7 RNR polimerazę, susiuvamas naudojant jungiančias grandis (atitinkamai Bgl II ir Sal I) su M13 mp8, nukirptos BamHI-Sol pagalba, patalpinant polimerazės geną taip, kad jis būtų promotoriaus lac kontroliuojamas. Pilna mGP1-2 nukleotidinė seka parodyta pieš 9. Kadangi pGP5-5 ir pTrx-2 turi skirtingą replikavimo kilmę (atitinkamai P15A ir ColE1), tai jie gali būti transformuojami į vieną ląstelę. pTrx-2 aktyvuoja didesnę tioredoksino kiekį, esant 1PTG. mGP1-2 gali kartu koegzistuoti kaip dvi plazmidės, ir gali būti naudojamas T7 RNR polimerazės aktyvavimui iš pGP5-5 gaminant T7 RNR polimerazę promotoriaus lac, pvz. 1PTG, indukavimo dėka.

#### T7 DNR polimerazės per intensyvi gamyba

Egzistuoja keli trxA ir geno 5 geninių produktų galimo intensyvaus gaminimo ir pertvarkymo keliai. Visuose juose gali būti naudojamas vieni ir tie patys štamai ir plazmidės. Pagal pageidautiną būdą, du genai kartu aktyvuojami toje pačioje ląstelėje. (Tai sąlygota tuo, kad genas 5 jautrus proteazei, jeigu nėra surištas tioredoksinu). Kaip aprašyta toliau, procedūra įjungia abiejų genų patalpinimą dviejose plazmidėse toje pačioje ląstelėje. Kaip vienas iš variantų abu genai gali būti toje pačioje plazmidėje. Labai svarbu, kad T7 genas 5 būtų kontroliuojamas indukuojamo promotoriaus, tokio, kaip F1, 1A, F1B ir F10.T7, kadangi net ir nedidelių poli-peptidų kiekio sintezė, kartu paėmus yra toksiška *E. coli*. Turima galvoje, kad gaminama ne daugiau kaip 500 geninio produkto molekulių per laiko vienetą, kai aktyvuojantis geną promotorius neaktyvus. Dažniausiai naudojama T7 RNR polimerazės aktyvacijos sistema, nors galimos ir kitos aktyvacijos sistemos, kurios naudoja

indukuojamus promotorius. Kai kurie promotoriai, pvz. plac, net neindukuoti leidžia gaminti daugiau kaip 500 baltymo molekulių, tokiu būdu ląstelės, kurios turi letalinius genus, kontroliuojamus tokių promotorių, auga blogai ir netinka šiame išradime aprašytiems būdams realizuoti. Galima, aišku gaminti šiuos produktus ląstelėse, kurioms jie nėra letalūs; tokiu atveju tinka ir tokio tipo promotoriai, kaip plac.

Pagal antrąjį būdą, kiekvienas genas gali būti klonuojamas atskirai ir stipriai aktyvuojamas. Naudojant šitą būdą, ląstelės, kuriose vyksta didelė atskiro polipeptido gamyba, sumaišomos ekstraktų gamybai, ir taip du polipeptidai sudaro T7 DNR polimerazę.

#### Pavyzdys 1: T7 DNR polimerazės gamyba

Linijos mGP1-2 (ATCC 40303) paruošimui naudojamas *E. coli* štamai 71.18 (Messing ir kt., Acad. Sci., 74, psl. 3642, 1977). Šis štamai 71.18 saugomas 50% glicerine esant  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, ir užsėjamas lėkštelėje su standartine minimalia agaru terpe. Viena kolonija auginama per naktį 25 ml standartinės terpės M9 esant  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, ir viena kolonija mGP1-2 gaunama darant minėtos linijos 71.18 ląstelių titrą. Ši linija naudojama inokuliacijai 10 ml  $\times$  2XLB (2% Bakto-Triptono, 1% mielių ekstrakto, 0,5% NaCl, 8 mmol NaOH), turinčio JM103, išauginto iki  $A_{590}=0,5$ . Ši kultūra užtikrina fago liniją kultūros mGP1-2 paruošime. Po 3-12 val 10 ml kultūros centrifuguojama, ir viršutinis sluoksnis užkrečiamas didele (2 l) kultūra, ir šios didelės kultūros  $4 \times 500$  ml 2XLB kiekis inokuliuojamas  $4 \times 5$  ml štamai 71.18 ląstelėmis, išaugintomis M9, ir sukratoma, esant  $37^{\circ}\text{C}$ . Kai didžioji kultūra užauginama iki  $A_{590}=4,0$  (maždaug per 3 val.) ji inokuliuojama 10 ml paviršiniu sluoksniu, turinčio užkrečiamąjį lizatą mGP1-2. Užkrėstos ląstelės po to auginamos per naktį esant  $37^{\circ}\text{C}$ . Sekančią dieną ląstelės pašalinamos centrifuguojant, ir išplaukęs sluoksnis tinka K38/pCP5-5/pTrx-2 (ATCC 67287) indukavimui (žr. žemiau). Šis sluoksnis gali būti saugomas esant  $4^{\circ}\text{C}$  maždaug šešis mėnesius, esant titrui  $\sim 5 \times 10^{11}$  f/ml. Esant tokiam titrui 1 l fago užkrės 12 l ląstelių esant  $A_{590}=5$  su infekcijos išplitimu 15. Jeigu titras žemas, tai fagas mGP1-2 gali būti koncentruojamas nuo išplaukusio sluoksnio tirpinant NaCl (60g/l) ir PEG-60 (65 g/l) mišinyje, ko pasekoje mišinys gali būti nusodinamas esant  $0^{\circ}\text{C}$  1-72 valandų bėgyje, o po to cetrifuguojamas (7600 aps/min, 20 min). Nuosėdos, turinčios fagą mGP1-2, pakartotinai suspenduojamos maždaug 1/20 M9 terpės pradinio tūrio.

K38/pGP5-5/pTrx-2 yra *E. coli* štamai, (genotipas HfrC) turintys dvi sulyginamas plazmides pGP5-5 ir pTrx-2. pGP5-5 plazmidė kilusi iš P15A replikacijos ir turi atsparų kanomicinui (Km) geną. pTrx-2 kilusi iš ColE1 replikacijos ir turi atsparų ampicilinui (Ap) geną. Šios plazmidės įvedamos į K38 standartiniais metodais, atitinkamai atrenkant Km<sup>R</sup> ir Ap<sup>R</sup>. Ląstelės K38/pGP5-5/pTrx-2 saugomos 50% glicerine, esant -80°C temperatūrai. Prieš panaudojimą jos užsėjamos lėkštelėje su 50 mkg/ml ampicilino ir kanomicino, auginamos per naktį 37°C, ir viena kolonija auginama 10 ml terpės LB, turinčios 50 mkg/ml ampicilino ir kanomicino, esant 37°C 4-6 val. 10 ml ląstelių kultūra naudojama 500 ml terpės LB, turinčios 50 mkg/ml ampicilino ir kanomicino, inokuliacijai, po ko kratoma esant 37°C per naktį. Sekančią dieną kultūra (500 ml) naudojama inokuliuoti 12 l 2XLB-KPO<sub>4</sub> terpės (2% Bakto-Triptono, 1% mielių ekstrakto, 0,5% NaCl, 20 mmol KPO<sub>4</sub>, 0,2% dekstrozės ir 0,2% kazamino rūgšties, pH=7,4), ir auginama aeruojant fermentatoriuje esant 37°C. Kai kultūra pasiekia A<sub>590</sub>=5,0 (t.y. ląstelių logaritminę ar stacionarią augimo fazę), ląstelės užkrečiamos mGP1-2 su užkrėtimo koeficientu 10 ir įvedamas IPTG (galutinė koncentracija 0,5 mmol). IPTG indukuoja tioredoksino ir T7 RNR polimerazės gamybą mGP1-2, po ko indukuojamas klonuotos DNR polimerazės gaminimas. Ląstelės papildomai auginamos 2,5 val. maišant ir aeruojant, po ko jos surenkamos. Ląstelės suspenduojamos 1,5 l 10% sacharozės tirpale (20 mmol Tris-HCl; pH=8,0), į kurią pridėta 25 mmoliai etilendiamintetracto rūgšties (EDTA) ir vėl auginamos. Po to ląstelės vėl suspenduojamos 200 ml 10% sacharozės tirpale (20 mmol Tris-HCl; pH=8,0), į kurią pridėta 1,0 mmolio EDTA ir užšaldomos skystame azote (N<sub>2</sub>). Iš 12 litrų indukuotų ląstelių gaunama 70 g sausos biomasės, kurioje yra maždaug 700 mg geno 5 baltymo ir 100 mg tioredoksino.

K38/pTrx-2 ATCC 67286 (K38, turintis tik pTrx-2) gamina didelius tioredoksino kiekius, ir jis įvedamas kaip "aktyvatorius" į K38/pGP5-5/pTrx-2 ekstraktą, siekiant užtikrinti, kad valymo pradžioje būtų tioredoksino perteklius lyginant su geno 5 baltymu. Ląstelės K38/pTrx-2 saugomos 50% glicerine, esant -80°C temperatūrai. Prieš naudojimą jos užsėjamos lėkštelėje su 50 mkg/ml ampicilino, auginamos 24 val. 37°C, ir viena kolonija auginama 25 ml terpės LB, turinčios 50 mkg/ml ampicilino, per naktį esant 37°C. 25 ml ląstelių kultūros naudojama 2 l terpės 2XLB inokuliacijai, ir kratoma esant 37°C. Kai

ląstelės pasiekia  $A_{590}=3,0$ , indukuojama promotoriaus ptac gamyba, atitinkamai gaminamas ir tioredoksinas įvedant IPTG (galutinė koncentracija 0,5 mmol). Šios ląstelės kratant dar auginamos 37°C temperatūroje 12-16 val., po to surenkamos, suspenduojamos 600ml 10% sacharozės tirpale (20 mmol Tris-HCl; pH=8,0), į kurią pridėta 25 mmoliai EDTA ir vėl auginamos. Po to ląstelės vėl suspenduojamos 40 ml 10% sacharozės tirpale (20 mmol Tris-HCl; pH=8,0), į kurią pridėta 0,5 mmolio EDTA ir užšaldomos skystame azote ( $N_2$ ). Iš 2 litrų ląstelių gaunama 16 g sausos biomasės, kurioje yra 150 mg tioredoksino.

Kiekybinėje polimerazės analizėje kaip substratas naudojama veršelio užkrūčio liaukos DNR grandinė (6 mmoliai). Ji gaunama prieš naudojimą denatūruojant dvigubą DNR spiralę 50 mmolių NaOH esant 20°C 15 min. bėgyje, vėliau neutralizuojant HCl. Bet kuri išvalyta DNR gali būti naudojama kaip modelis kiekybinėje analizėje, bet pageidautina, kad DNR ilgis būtų didesnis kaip 1000 bazių.

Naudojama standartinė T7 DNR polimerazės analizė yra aprašytos metodikos modifikacija (Grippe ir kt. T. Biol. Chem., t. 246, psl. 6867, 1971). Standartinis reakcijos mišinys (tūris - 200 mkl) turi 40 mmol Tris-HCl, pH=7,5, 10 mmol  $MgCl_2$ , 5 mmol ditiotroitolo, 100 nmol denatūruotos užkrūčio liaukos DNR, 0,3 mmol dCTF, dATF, dGTF IR  $[^3H]dTTF$  (20 cpm/pm), 50 mkg/ml BSA ir skirtingus T7 DNR polimerazės kiekius. Inkubacija trunka 30 min (5-60 min) esant 37°C (10-45°C). Reakcija užbaigiama, įvedant 3 ml šalto (0°C) mišinio iš 1-normalinės HCl ir 0,1 mol pirofosfato. Neištirpusio rūgštyje produkto radioaktyvumas matuojamas pagal Hinkle ir kt. metodiką (T. Biol. Chem., t. 259, psl. 5523, 1974). DNR nusodinama ant ledo per 15 min. (5-12 min.), po ko filtruojant nusodinama stiklo pluošto filtruose. Filtrai penkis kartus perplaunami 40 ml šaltu (0°C) mišiniu iš 0,1 mol HCl ir 0,1 mol pirofosfato, ir po to dar du kartus - šaltu (0°C) 90% etanoliu. Po džiovinimo nustatomas filtrų radioaktyvumas, naudojant bevandenį scinciliuojantį tirpalą.

Vienas polimerazės aktyvumo vienetas katalizuoja 10 nmol nukleotidų įvedimą į tirpstantią rūgštyje formą 30 min. bėgyje esant 37°C ir nurodytoms aukščiau sąlygoms. Natūrali T7 DNR polimerazė ir modifikuota T7 DNR polimerazė (žr. žemiau) turi vienodą specifinį polimerazės aktyvumą ( $\pm 20\%$ ), kuris yra diapazone nuo 5000 iki 2000 vnt./mg natūraliai

polimerazei ir nuo 5000 iki 50000 vnt./mg modifikuotai polimerazei, priklausomai nuo kiekybinės analizės standartinių sąlygų paruošimo ir panaudojimo.

T7 DNR polimerazė nuo ekstraktų išvaloma nusodinimo ir chromatografijos metodais. Žemiau pateikiamas tokio valymo pavyzdys.

Užšaldytų ląstelių ekstraktas (200 ml K38/pGP5-5/pTrx-2 ir 40 ml K38/pTrx-2) atšildomas per naktį 0°C temperatūroje. Ląstelės sumaišomos, ir pridedama 5 ml lizocimo (15 mg/ml) bei 10 ml NaCl (5 mol). Po 45 min., esant 0°C, ląstelės patalpinamos į ledo vonią, esant 37°C, ir laikomos tenai, kol temperatūra nukrenta iki 20°C. Po to ląstelės užšaldomos skystame azote (N<sub>2</sub>). Papildomai pridedama 50 ml NaCl (5 mol), ir ląstelės atšildomos vandens vonioje 37°C temperatūroje. Po atšildymo ląstelės atsargiai maišomos 0°C temperatūroje 60 min. bėgyje. Lizatas centrifuguojamas vieną valandą Beckman 45Ti rotoriuje (35000 aps/min). Iškilęs sluoksnis (250 ml) yra frakcija I. Joje yra 700 mg geno 5 baltymo ir 250 mg tioredoksino (tioredoksino ir geno 5 baltymo santykis sudaro 2:1).

90 g amonio sulfato ištirpinama 250 ml frakcijos I ir maišoma 60 min. Suspensija 60 min. paliekama nusistovėjimui, ir gautos nuosėdos išskiriamos centrifuguojant 8000 aps/min 60 min bėgyje. Išskirtos nuosėdos tirpinamos 300 ml 20 mmol Tris-HCl pH=7,5/5 mmol 2-merkaptoetanolio/0,1 mmol EDTA/10% glicerino mišinyje (buferis A). Tai frakcija II.

Paruošiama kolonėlė Batman DE52 DEAE (12,6 cm<sup>2</sup> × 18 cm) ir praplaunama buferiu A. Frakcija II dializuojama per naktį dukart pakeičiant 1 l buferio A, kol frakcijos II elektrolaidumas bus lygus buferio A, kuriame yra 100 mmol NaCl, elektrolaidumui.

Dializuota frakcija II tiekama į kolonėlę 100 ml/val greičiu ir perplaunama 44 ml buferio A, kuriame yra 100 mmol NaCl. Baltymai eliuojami 3,5 l NaCl gradientu nuo 100 iki 400 mmol buferyje A, kuris tiekiamas 60 ml/val greičiu. Frakcijos, turinčios T7 DNR polimerazę eliuojamos esant 200 mmol NaCl, apjungiamos. Tai frakcija III (190 ml).

Paruošiama kolonėlė Batman PII su fosfoceliulioziniu užpildymu (12,6 cm<sup>2</sup> × 12 cm) ir praplaunama 20 mmol KPO<sub>4</sub>, pH=7,4/5 mmoliai 2-merkaptoetanolio/0,1 mmolio EDTA/10% glicerino mišiniu (buferis B). Frakcija III skiedžiama du kartus (380 ml) buferiu B, po ko paduodama į kolonėlę 60 ml/val greičiu ir praplaunama 200 ml buferio B,



kuriame yra 100 mmol KCl. Baltymai eliuojami 1,8 l KCl gradientu nuo 100 iki 400 mmol buferyje B, kuris tiekiamas į kolonėlę 60 ml/val greičiu. Frakcijos, turinčios T7 DNR polimerazę, eliuojamos 300 mmol KCl, ir apjungiamos, sudarydamos frakciją IV (370 ml).

Paruošiama kolonėlė DEAE-Sephadeks A-50 ( $4,9 \text{ cm}^2 \times 15 \text{ cm}$ ) ir praplaunama 20 mmol Tris-HCl, pH=7,0/0,1 mmoliai ditioneitolu/0,1 mmolio EDTA/10% glicerino mišiniu (buferis C). Frakcija IV dializuojama dukart pakeičiant 1 l buferio C, kol frakcijos IV elektrolaidumas bus lygus buferio C, kuriame yra 100 mmol NaCl, elektrolaidumui. Dializuota frakcija IV tiekiamas į kolonėlę 40 ml/val greičiu ir perplaunama 150 ml buferio C, kuriame yra 100 mmol NaCl. Baltymai eliuojami 1 l NaCl gradientu nuo 100 iki 300 mmol buferyje C, kuris tiekiamas į kolonėlę 40 ml/val greičiu.

Frakcijos, turinčios T7 DNR polimerazę, eliuojamos 210 mmol NaCl, ir apjungiamos, sudarydamos frakciją V (120 ml).

Paruošiama hidroksilapatitinė kolonėlė BioRed HTP ( $4,9 \text{ cm}^2 \times 15 \text{ cm}$ ) ir praplaunama 20 mmol  $\text{KPO}_4$ , pH=7,4/10 mmoliai 2-merkaptioetanolio/2 mmoliai natrio citrato/10% glicerino mišiniu (buferis D). Frakcija V dializuojama dukart pakeičiant 500 ml buferio D. Dializuota frakcija V tiekiamas į kolonėlę 30 ml/val greičiu ir perplaunama 100 ml buferio D. Baltymai eliuojami 900 ml  $\text{KPO}_4$  gradientu nuo 0 iki 180, pH=7,4, buferyje D, kuris tiekiamas į kolonėlę 30 ml/val greičiu. Frakcijos, turinčios T7 DNR polimerazę, eliuojamos 500 mmol  $\text{KPO}_4$ , ir apjungiamos, sudarydamos frakciją VI (130 ml). Ji įjungia 270 mg homogeninės T7 DNR polimerazės.

Frakcija VI dializuojama 20 mmolių  $\text{KPO}_4$ , pH=7,4/0,1 mmol ditioneitolu/0,1 mmolio EDTA/50% glicerino mišiniu. Ši koncentruota frakcija VI (~ 65 ml, 4 mg/ml) ir saugoma esant  $-20^\circ\text{C}$ .

Išskirta T7 polimerazė turi asocijuotą nukleazės aktyvumą. Kaip buvo nurodyta aukščiau, jis turi būti inaktyvuotas. Cheminis inaktyvacijos būdas pateiktas žemiau.

Koncentruota frakcija VI dializuojama per naktį, naudojant 20 mmolių  $\text{KPO}_4$ , pH=7,4/0,1 mmol ditioneitolu/10% glicerino mišiniu, siekiant pašalinti EDTA. Po dializės koncentracija privedama iki 2 mg/ml naudojant 20 mmolių  $\text{KPO}_4$ , pH=7,4/0,1 mmol ditioneitolu/10% glicerino tirpalo pagalba, ir mėginiai po 30 ml (2g/ml) supilstomi į 50 ml

propileno mėgintuvėlius. (Mėginiuose 2 mg/ml T7 DNR polimerazės koncentracija sudaro 22 mkmol).

Prieš pat naudojimą paruošiamos šviežios ditionitrito (DTT) ir divalentės geležies amonio sulfato  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  porcijos, ir jos pridedamos į 30 ml T7 DNR polimerazės mėginį iki koncentracijos 5 mmol DTT (0,6 ml 250 mmol linijos) ir 20 mmol  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,6 ml 1 mmol linijos). Modifikacijos eigoje T7 DNR polimerazės ir geležies moliarinės koncentracijos sudaro maždaug 20 mkmol, o DTT koncentracija sudaro 250-kartinį moliarinį perteklių.

Modifikacija atliekama prisotintoje deguonies aplinkoje, esant 0°C temperatūrai, sekančiai. Reakcinis mišinys patalpinamas ant ledo eksikatoriuje, kuris prapučiamas oru ir po to užpildomas deguonimi. Šis ciklas kartojamas tris kartus. Reakcija gali vykti ir ore (20% deguonies), bet tada greitis bus 2/3 kartus mažesnis.

Egzonukleazės aktyvumo kritimas laike parodytas pieš. 4. Paruošiama žymėta  $^3\text{H}$  dviguba DNR (6 cpm/pmol) ir bakteriofago T7, kaip aprašyta Richardson darbe (T. Molec. Biol, 15, 49, 1966). Prieš naudojimą, denatūruojant dvigubą žymėtą  $^3\text{H}$  DNR 50 mmol NaOH 20°C 15 min bėgyje, po ko neutralizuojama HCl, gaunama vienguba žymėta  $^3\text{H}$  T7 DNR grandinė. Naudojama kiekybinė egzonukleazės analizė yra modifikuota procedūra, aprašyta Chase ir kt. darbe (žr. aukščiau). Standartinis reakcinis mišinys (galutinis tūris 100 mkl) įjungia 40 mmol Tris-HCl pH=7,5, 10 mmol  $\text{MgCl}_2$ , 10 mmol DTT, 60 mmol žymėtos  $^3\text{H}$  viengubos T7 DNR (6 cpm/pmol), ir skirtingus T7 DNR polimerazės kiekius. Žymėta  $^3\text{H}$  dviguba T7 DNR taip pat gali būti naudojama kaip substratas. Be to, kiekybinėje analizėje gali būti naudojama bet kuri radioaktyviai pažymėta DNR, tiek vienguba, tiek ir dviguba. Taip pat gali būti naudojama žymėta 3'-galinė vienguba ar dviguba DNR. Po 15 min inkubacijos 37°C reakcija užbaigiama, įvedant 30 mkl BSA (10 mg/ml) ir 25 mkl TCA (100% svoris/tūris). Kiekybinė analizė gali būti atlikta esant 10-45°C temperatūrai per 1-60 min. DNR nusodinama ant ledo per 15 min (1 min - 12 val), po to centrifuguojama prie 12000g 30 minučių (5 min - 3 val). 100 mkl išplaukusio sluoksnio naudojama netirpstančio vandenyje produkto radioaktyvumui nustatyti, įpilant 400 mkl vandens ir 50 ml vandeninio scinciliacinio tirpalo.

Vienas vienetas egzozonukleazės aktyvumo katalizuoja rūgštinę soliubizaciją 10 nmol nukleotido 30 min. bėgyje, esant nurodytoms kiekybinės analizės sąlygoms. Natūrali T7 DNR polimerazė turi santykinį egzozonukleazės aktyvumą 500 vnt/mg, kas buvo nustatyta aukščiau minėtos kiekybinės analizės pagalba. T7 DNR modifikuotos polimerazės aktyvumas priklauso nuo cheminio modifikacijos tipo, bet idealiau atveju jis 10-100 kartų mažesnis negu natūralios T7 DNR polimerazės ir sudaro 500-50 ar mažiau vnt./mg, kas nustatyta aukščiau minėtos kiekybinės analizės pagalba. Naudojant dvigubos DNR substratą, egzozonukleazės aktyvumas yra maždaug 7 kartus didesnis.

Esant aprašytoms sąlygoms, egzozonukleazės aktyvumas eksponentiškai mažėja su skilimo pusperiodžiu 8 valandos. Vieną kartą per dieną tolygiam deguonies paskirstymui reakcinio indo turinys permaišomas, nes kitaip reakcija vyks greičiau paviršiuje, kur deguonies koncentracija didesnė. Kartą per dieną pridedama 2,5 mmol DTT (0,3 ml 250 mmol linijos į 30 ml reakcinio mišinio) oksiduotam DTT papildyti.

Po 8 valandų T7 DNR egzozonukleazinis polimerazės aktyvumas krinta 50%, polimerazės aktyvumui praktiškai nesikeičiant. Šis 50% kritimas gali būti iššauktas visišku egzozonukleazės aktyvumo inaktyvavimu pusėje polimerazės molekulių, o ne bendru visų molekulių egzozonukleazės aktyvumo sumažėjimu. Taip, po aštuonių valandų visos molekulės turi normalų polimerazės aktyvumą, pusė molekulių turi normalų egzozonukleazės aktyvumą, o kita pusė - <0,1% pradinio egzozonukleazės aktyvumo.

Kada modifikuojasi 50% molekulių (per 8 val.), fermentas yra tinkamas (nors dar neoptimalus) DNR sekos sudarymui. Optimaliai DNR sekos sudarymo kokybei reikalinga reakcija, kurios metu modifikuojama daugiau kaip 99% molekulių (egzozonukleazės aktyvumas turi sudaryti mažiau kaip 50 vnt.), kam reikia keturių dienų.

Po keturių dienų reakcinis mišinys dializuojamas per du ciklus pakeičiant 250 ml 20 mmol  $KPO_4$  pH=7,4/0,1 mmol DTT/0,1 mmol EDTA/50% glicerino mišinio, siekiant pašalinti geležį. Modifikuota T7 DNR polimerazė (4 mg/ml) saugoma -20°C.

T7 DNR polimerazės cheminės modifikacijos reakcijos mechanizmas priklauso nuo aktyvių deguonies jonų, susidarančių esant pereinamiesiems redukuojantiems metalams,

kaip  $\text{Fe}^{+2}$ , ir molekuliniam deguoniui. Galimas reakcijos mechanizmas, vedantis prie hidroksilinių radikalų susidarymo, pateiktas žemiau

- 1)  $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2$
- 2)  $2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- 3)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$

Lygtyje 1, redukuojančių metalo jonų oksidacija veda prie peroksidinio radikalo susidarymo. Šis radikalas gali dalyvauti pernešimo reakcijoje susidarant vandenilio peroksidui (lygtis 2). Ir, pagaliau, vandenilio peroksidas gali reaguoti su redukuojančiais metalo jonais, sudarant hidroksilo radikalus  $\text{OH}^\cdot$  (lygtis 3). Oksiduotas metalo jonas grįžta į redukuotą formą, redukuojančių reagentų, kaip DTT, pagalba.

Šie chemiškai aktyvūs jonai gali inaktyvuoti baltymus, negrįžtamai modifikuodami specifines aminorūgščių grupes. Toks pakenkimas pastebimas geno 5 SDS-PAGE fragmente, gauto CNBr arba tripsino pagalba. Kai kurie fragmentai išnyksta, pastebimas skersinis didelės molekulinės masės produktų susiuvimas, ir kai kurie fragmentai suskaidomi į du mažesnius fragmentus.

Kaip buvo nurodyta aukščiau, redukuojantis agentas (pvz. DTT, 2-merkaptoetanolas) ir pereinamasis metalas (pvz. geležis) yra pagrindiniai modifikavimo reakcijos elementai. Reakcija vyksta ore, bet ji tris kartus pagreitėja esant 100% deguonies aplinkai. Ši reakcija vyks lėtai ir nesant įvedamų pereinamųjų metalų terpėje dėl šių metalų pėdsakų (1-3 mkmol) buvimo buferiniuose preparatuose.

Modifikacijos reakcijos inhibitoriai gali būti anaerobinės sąlygos (pvz.  $\text{N}_2$ ), ir metalų chelatus sudarantys junginiai (pvz. EDTA, citratas, nitrilotriacetatas). Be to, fermento katalazė gali inhibuoti reakciją, kas patvirtina didelę deguonies jonų reikšmę gaunant modifikuotą T7 DNR polimerazę.

Pagal šio būdo variantą galima T7 geno 5 mutacija, siekiant specifiškai inaktyvuoti egzokleazinę baltymo dalį. T7 mutavusio geno 5 išvalytas baltymas, apvalytas nuo kitokio tipo mutantų, yra idealus naudoti DNR sekoje be tolimesnės egzokleazinio aktyvumo inaktyvacijos oksidavimo pagalba, ir atitinkamai, be antrinio pažeidimo, kuris galimas, kai vykdoma cheminė baltymo modifikacija.

Genetiškai modifikuota T7 DNR polimerazė gali būti išskirta atsitiktinės geno 5 mutagenezės būdu, ir toliau atrenkant tuos mutantus, kurie praranda egzozonukleazės aktyvumą, neprarandant polimerazės aktyvumo. Mutagenėzė vykdoma sekančiu būdu. Genas 5, turintis viengubą DNR (pvz. klonuotas pEMEL-8, plazmidėje, turinčioje pradinį viengubos DNR replikantą) ir kontroliuojamas promotoriumi - T7 RNR polimeraze, paruošiamas standartiniu būdu, po ko apdorojamas dvejais skirtingais mutagenais: hidrozinu, kuris sukelia C ir T mutacijas, ir skruzdžių rūgštimi, kuri sukelia G ir A mutacijas (Myers ir kt., 229, Science 242, 1985). DNR paveikiama mutageno doze, kuri pakeičia vidutiniškai vieną bazę vienoje plazmidės molekulėje. Po to į vienskaidulines mutagenizuotas plazmides įvedamas uneveršalus 17 nukleotidų pradmuo (žr. aukščiau) ir naudojamas kaip modelis priešingų DNR grandinių sintezėje. Šios sintezuotos grandinės turi netvarkingai įjungtas bazes vietose, kuriose buvo modelių mutageninės bazės. Toliau ši dviguba mutagenizuota DNR naudojama štamo K38/pGP1-2, kuris yra štamas K38 su plazmide pGP1-2 (Tabor ir kt., žr. aukščiau), transformacijai. Paveikus šiluma, šis štamas aktyvuoja T7 RNR polimerazę. Ląstelių transformacija vykdoma lėkštelėse su 200 kolonijų, esant 30°C.

Ląstelių atrinkimas, kurios turi T7 DNR polimerazę be egzozonukleazės aktyvumo, pagrįstas sekančiu atradimu. DNR polimerazės 3'-5' egzozonukleazė tarnauja kaip koreguojantis faktorius. Kai bazės įvestos neteisingai, egzozonukleazė pašalins naujai įvedamą bazę, kuri bus atpažinta kaip "anomalinė". Toks yra dATF analogo - eteno-dATF atvejis, kuris lengvai įvedamas T7 DNR polimerazės pagalba vietoje dATF. Vienok, esant T7 DNR polimerazės 3'-5' egzozonukleazei, šis analogas taip pat greitai, kaip ir įvedamas, bus ir pašalinamas, ko pasekoje bus susintetinta ne visai gryna DNR. Kaip parodyta pieš. 6, naudojant sukeičiamą kopolimerą poli-d(AT) kaip modelį, natūrali T7 DNR polimerazė katalizuoja DNR sintezę tik esant dATF, bet ne eteno-dATF. Skirtingai nuo to, modifikuota T7 DNR polimerazė dėl to, kad joje nėra asociacijuotos egzozonukleazės, stabiliai įveda eteno-dATF į DNR seką greičiu, sulyginamu su dATF įvedimo greičiu. Taip, naudojant kaip modelį poli-d(AT) ir kaip pradines medžiagas dATF ir eteno-dATF, nustatyta, kad

natūrali T7 DNR polimerazė nesugeba sintetinti DNR pagal šitą modelį, tuo tarpu kaip modifikuota T7 DNR polimerazė gali naudoti šį modelį DNR sintezėje.

Lizavimo ir didelio kolonijų skaičiaus atrankos procedūros aprašytos Ractz darbe (Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2274, 1975). Ląstelės 638/pCP1-2, transformuotos plazmidėmis, turinčiomis mutagenizuotą geną 5, pernešamos iš Petri lėkštelės, kurioje buvo 200 jų kolonijų, ant filtrinio popieriaus gabalėlio. Diskai iš šio filtrinio popieriaus laikomi 42°C 60 min bėgyje, siekiant indukuoti T7 RNR polimerazę, kuri atitinkamai aktyvina geno 5 baltymo sintezę. Šio geno pagalba sintetinamas tiorodoksinas. Ant filtrinio popieriaus, siekiant sulizuoti ląsteles, užlašinamas lizocimas. Po ląstelių lizavimosi, filtrinio popieriaus diskai inkubuojami poli-d(AT)[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]TTF ir eteno-dATF 37° temperatūroje 60 min bėgyje. Po to šie diskai perplaunami rūgštimi neijungtos [ $^{32}\text{P}$ ]ATF pašalinimui. DNR nusėda ant filtrinio popieriaus, tuo tarpu kaip nukleotidas lieka ištirpęs rūgštyje. Po to praplautas filtrinis popierius naudojamas fotojuostos eksponavimui. Kolonijos, kurios indukuoja aktyvią T7 DNR polimerazę su apribotu egzonukleazės aktyvumu, įjungs netirpstantį rūgštyje  $^{32}\text{P}$ , ir bus juostoje užfiksuotos. Kolonijos su natūralia T7 DNR polimeraze, bus eksponuotoje juostoje nematomos.

Pozityvios kolonijos paimamos iš Petri lėkštelės, kurioje auga pradinės kolonijos. Ląstelės, kurios turi potencialiai pozityvius klonus, indukuojamos dideliame tūrio kiekyje (1 litras), ir T7 DNR polimerazė išvaloma nuo kiekvieno preparato iki egzonukleazės, asocijuotos su kiekvienu mutantu, lygio. Tie mutantai, kurie turi mažą egzonukleazės aktyvumą, yra tinkami DNR sekos sudarymui.

T7 geno 5 mutantus su mutavusia baltymų egzonukleazės sritimi galima išskirti ir tiesioginės mutagenezės būdu. Žemiau pateikiamas tokios procedūros pavyzdys.

T7 DNR polimerazė su sumažintu egzonukleazės aktyvumu išskiriama iš natūralios T7 DNR polimerazės pagal jos sintezės galimybes antrinės struktūros zonose. Taip, esant modifikuotai DNR polimerazei, DNR sintezė iš žymėto pradmens ant modelio, turinčio antrinę struktūrą, duos rezultate žymiai labiau ištemptas grandines, negu naudojant nemodifikuotą arba natūralią DNR polimerazę. Tai gali tarnauti kaip kriterijus, atrenkant DNR polimerazės molekules konversijai į modifikuotą formą.

Pateikta aukščiau procedūra naudojama T7 DNR pakeistos polimerazės atrinkimui paveikus eile cheminių reagentų. Trijų reakcijų rezultate gaunama modifikuota fermento forma. Iš pradžių paveikiama geležimi ir redukuojančiu agentu kaip aprašyta aukščiau. Sekantys du cheminio poveikio etapai įjungia fermento reakciją su fotooksiduojančiais dažais (metileno mėliu), tuo pat metu eksponuojant. Šie dažai turi būti kruopščiai titruojami, ir net esant optimalioms sąlygoms, egzonukleazės aktyvumo inaktyvacijos specifiškumas turi būti mažesnis lyginant su aukštu geležies indukuoto oksidacinio proceso specifiškumu. Kadangi šie dažai labai specifiniai histidininių grupių modifikacijoje, tai veda prie to, kad histidininės grupės yra pagrindinės grupės, esančios aktyviuose egzonukleazės taškuose.

T7 geno 5 baltyme yra 23 histidininės grupės. Aštuonios iš šių grupių yra baltymo aminojunginių zonoje, kur, pagal homologiją su dideliu *E. coli* DNR polimerazės fragmentu, gali būti egzonukleazinė sritis (Ollis ir kt. Nature, 313, 818, 1984). Kaip bus aprašyta žemiau, septynios iš aštuonių histidininių grupių mutuoja individualiai, atitinkamų oligonukleotidų, kurie vėliau įvedami į geną 5, sintezės pagalba.. Jie atitinka mutantams 1, ir 6-10 lentelėje 1.

Šios mutacijos sukeliamos pGP5-5 T7 geno (Tabor ir kt., Biol. Chem., 282, 1987) ir vektoriaus M13p18 taško SmaI ir HindIII pirmojo klonavimo pagalaba, sudarant mGP5-2. (Naudojamas vektorius ir pradinis genas 5 nėra svarbūs vykdant šią procedūrą). Vienguba mGP5-2 DNR gaunama iš štamo, kuris įjungia dezoksiuracilą vietoje dezoksitimidino (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 82, 488, 1985). Ši procedūra įjungia tikrai sintezuotos grandinės (mutantinės) griežtą atranką pagal gyvybingumą, transfekuojant ją į laukinio tipo *E. coli*, kadangi kita grandinė, turinti uracilą, dažniausiai degraduoja.

Mutantiniai 15-20 bazių ilgio oligonukleotidai, sintezuojami standartiniais būdais. Kiekvienas oligonukleotidas aneliuojamas su modeliu, kuris ištempiamas natūralios T7 DNR polimerazės pagalba, ir susiuvamas naudojant T7 DNR ligazę. Kovalentiškai surištos žiedinės molekulės išskiriamos elektroforezės gelyje pagalba, esant terpėje 0,5 mkg/ml etilbromido. Rezultate gautos išvalytos molekulės naudojamos gautų ir išskirtų pagal mutacijas *E. coli* 71.18 DNR transformacijai.

Žemiau pateikiami duomenys apie oligonukleotidų panaudojimą genetinių mutantų su pakeista geno 5 egzonuklezine zona, generacijoje. Aminorūgščių ir pagrindinių porų skaičiai paimti iš Dunn ir kt., T. Molec. Biol. 166, 477, 1983. Atitinkamai parodytos ir mutavusio geno 5 zonų sekos.

Laukinio tipo seka:

109 (aa) 122 123  
 Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ser His Ala Leu Glu  
 CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG TCT CAC GCT TTG GAG

Mutacija 1: His 123 -> Ser 123

Naudojamas pradmuo: 5' CGC TTT GGA TCC TCC GCT TTG 3'

Mutanto seka:

123  
 Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ser Ser Ala Leu Glu  
 CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG TCT TCC TCC TTG GAG

Mutacija 2: Delecija Ser 122 ir His 123

Naudojamas pradmuo: 5' GGA AAA CGC TTT GGC GCC TTG GAG GCG 3'

Δ  
 6 bazių delecija

Mutanto seka:

122 123  
 Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly ... ... Ala Leu Glu  
 CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGC --- --- GCC TTG GAG

Mutacija 3: Ser 122, His 123 -> Ala 122, Glu 123

Naudojamas pradmuo: CGC TTT GGG GCT GAG GCT TTG G 3'

Mutanto seka:

122 123  
 Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ala Glu Ala Leu Glu  
 CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG GCT GAG GCT TTG GAG

Mutacija 4: Lys 118, Arg 119 -> Glu 118, Glu 119

Naudojamas pradmuo: 5' 5' G CCC GGG GAA GAG TTT GGG TCT ACA GC 3'

Mutanto seka:

118 119  
 Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Glu Glu Phe Gly Ser His Ala Leu Glu  
 CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGG GAA GAG TTT GGG TCT CAC GCT TTG GAG

Mutacija 5: Arg 111, Ser 112, Lys 114 -> Glu 111, Ala 112, Glu 114

Naudojamas pradmuo: 5' G GGT CTT CTG GAA GCC GGC GAG TTG CCC GG 3'

Mutanto seka:

111 112 114  
 Leu Leu Glu Ala Gly Glu Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ser His Ala Leu Glu  
 CTT CTG GAA GCC GGC GAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG TCT CAC GCT TTG GAG

Mutacija 6: His 59, His 62 -> Ser 59, Ser 62

Naudojamas pradmuo: 5' ATT GTG TTC TCC AAC GGA TCC AAG TAT GAC 3'

Laukinio tipo seka:

aa: 55 59 62  
 Leu Ile Val Phe His Asn Gly His Lys Tyr Asp Val  
 CTT ATT GTG TTC CAC AAC GGT CAC AAG TAT GAC GTT

T7 bp: 14515



## Mutanto seka:

55                      59                      62  
Leu Ile Val Phe Ser Asn Gly Ser Lys Tyr Asp Val  
CTT ATT GTG TTC TCC AAC GGA TCC AAG TAT GAC GTT

## Mutacija 7: His 82 -&gt; Ser 82

Naudojamas pradmuo: 5' GAG TTC TCC CTT CCT CG 3'

## Laukinio tipo seka:

aa: 77                      82  
Leu Asn Arg Glu Phe His Leu Pro Arg Glu Asn  
TTG AAC CGA GAG TTC CAC CTT CCT CGT AGA AAC

T7 bp: 14581

## Mutanto seka:

82  
Leu Asn Arg Glu Phe Ser Leu Pro Arg Glu Asn  
TTG AAC CGA GAG TTC TCC CTT CCT CGT AGA AAC

## Mutacija 8: Arg 96, His 99 -&gt; Leu 96, Ser 99

Naudojamas pradmuo: 5' CTG TTG ATT TCT TCC AAC CTC 3'

## Laukinio tipo seka:

aa: 93                      96                      99  
Val Leu Ser Arg Leu Ile His Ser Asn Leu Lys Asp Thr Asp  
GTG TTG TCA CGT TTG ATT CAT TCC AAC CTC AAG GAC ACC GAT

T7 bp: 14629

## Mutanto seka:

96                      99  
Val Leu Ser Leu Leu Ile Ser Ser Asn Leu Lys Asp Thr Asp  
GTG TTG TCA CTG TTG ATT TCT TCC AAC CTC AAG GAC ACC GAT

## Mutacija 9: His 190 -&gt; Ser 190

Naudojamas pradmuo: 5' CT GAC AAA TCT TAC TTC CTT 3'

## Laukinio tipo seka:

aa: 185                      190  
Leu Leu Ser Asp Lys His Tyr Phe Pro Pro Glu  
CTA CTC TCT GAC AAA CAT TAC TTC CTT CTT GAG

T7 bp: 14905

## Mutanto seka:

190  
Leu Leu Ser Asp Lys Ser Tyr Phe Pro Pro Glu  
CTA CTC TCT GAC AAA TCT TAC TTC CTT CTT GAG

## Mutacija 10: His 218 -&gt; Ser 218

Naudojamas pradmuo: 5' GAC ATT GAA TCT CGT GCT GC 3'

## Laukinio tipo seka:

aa: 214                      218  
Val Asp Ile Glu His Arg Ala Ala Trp Leu Leu  
GTT GAC ATT GAA CAT CGT GCT GCA TGG CTG CTC

T7 bp: 14992

## Mutanto seka:

218  
Val Asp Ile Glu Ser Arg Ala Ala Trp Leu Leu  
GTT GAC ATT GAA TCT CGT GCT GCA TGG CTG CTC

## Mutacija 11: aminorūgščių nuo 118 iki 123 delecija

Naudojamas pradmuo: 5' C GGC AAG TTG CCC GGG GCT TTG GAG GCG TGG G 3'

Δ

18 bazių delecija

Laukinio tipo seka:

|                                                                         |     |         |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 109 (aa)                                                                | 118 | 122 123 |
| Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ser His Ala Leu Glu |     |         |
| CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG TCT CAC GCT TTG GAG |     |         |

14677 (T7 bp)

Mutanto seka:

|                                                                         |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
|                                                                         | 117 | 124 |
| Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly ..(6 amino rūgštys).....Ala Leu Glu |     |     |
| CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGG ..(18 bazių delecija)...GCT TTG GAG |     |     |

Mutacija 12: His 123 -> Glu 123

Naudojamas pradmuo: 5' GGG TCT GAG GCT TTG G 3'

Mutanto seka:

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
|                                                                         | 123 |
| Leu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Pro Gly Lys Arg Phe Gly Ser Glu Ala Leu Glu |     |
| CTT CTG CGT TCC GGC AAG TTG CCC GGA AAA CGC TTT GGG TCT GAG GCT TTG GAG |     |

Mutacija 13: Arg 131, Lys 136, Lys 140, Lys 144, Arg 145 ->

Glu 131, Glu 136, Glu 140, Glu 144, Glu 145

Naudojamas pradmuo:

5' GGT TAT GAG CTC GGC GAG ATG GAG GGT GAA TAC GAA GAC GAC TTT GAG GAA ATG  
CTT GAA G 3'

Laukinio tipo seka:

|                                                                                     |     |     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---------|
| 129 (aa)131                                                                         | 136 | 140 | 144 145 |
| Gly Tyr Arg Leu Gly Glu Met Lys Gly Glu Tyr Lys Asp Asp Phe Lys Arg Met Leu Glu Glu |     |     |         |
| GGT TAT CGC TTA GGC CAG ATG AAG GGT GAA TAC AAA GAC GAC TTT AAG CGT ATG CTT GAA G   |     |     |         |

14737 (T7 bp)

Mutantinė seka:

|                                                                                     |     |     |     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|---------|
| 129                                                                                 | 131 | 136 | 140 | 144 145 |
| Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Met Glu Gly Glu Tyr Glu Asp Asp Phe Glu Glu Met Leu Glu Glu |     |     |     |         |
| GGT TAT GAG CTC GGC CAG ATG GAG GGT GAA TAC GAA GAC GAC TTT GAG GAA ATG CTT GAA G   |     |     |     |         |

Kiekvieno mutantinio geno 5 baltymas gaminamas užkrečiant mutantiniu fagu K38/pGP1-2, kaip aprašyta žemiau. Šios ląstelės auginamos esant 30°C temperatūrai iki  $A_{590}=1,0$ . Temperatūra pakeliama iki 42°C per 30 min., tuo indukuojant T7 RNR polimerazę. Įvedama 0,5 mmol IPTG, ir kiekvieno fago lizatas įvedamas esant  $moi=10$ . Užkrėstos ląstelės auginamos 37°C temperatūroje 90 min. Po to šios ląstelės surenkamos ir iš jų paruošiamas ekstraktas, kuris naudojamas standartinėse T7 geno 5 apdoravimo procedūrose.

Ekstraktai dalinai apvalomi praleidžiant juos per fosfoceliuliozinę ir DEAE-A-50 kolonėles, po ko vykdoma jų kiekybinė analizė, nustatant polimerazės ir egzonukleazės aktyvumą, kaip aprašyta aukščiau. Rezultatai pateikti lentelėje 1.

Lentelė 1

T7 mutantų geno 5 egzonukleazės ir polimerazės aktyvumo apibendrinti duomenys

| Mutantas                                                                                                          | Egzonukleazės aktyvumas % | Polimerazės aktyvumas % |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| [Laukinis tipas]                                                                                                  | [100] <sup>a</sup>        | [100] <sup>b</sup>      |
| Mutantas 1<br>(His 123 -> Ser 123)                                                                                | 10 - 25                   | >90                     |
| Mutantas 2<br>(ΔSer 122, His 123)                                                                                 | 0,2 - 0,4                 | >90                     |
| Mutantas 3<br>(Ser 122, His 123 -><br>Ala 122, Glu 123)                                                           | < 2                       | >90                     |
| Mutantas 4<br>(Lys 118, Arg 119 -><br>Glu 118, Glu 119)                                                           | < 30                      | >90                     |
| Mutantas 5<br>(Arg 111, Ser 112, Lys 114 -><br>Glu 111, Ala 112, Glu 114)                                         | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 6<br>(His 59, His 62 -><br>Ser 59, Ser 62)                                                               | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 7<br>(His 82 -> Ser 82)                                                                                  | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 8<br>(Arg 96, His 99 -><br>Leu 96, Ser 99)                                                               | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 9<br>(His 190 -> Ser 190)                                                                                | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 10<br>(His 218 -> Ser 218)                                                                               | > 75                      | >90                     |
| Mutantas 11<br>(ΔSer 118, Arg 119, Phe120, Gly 121,<br>Ser 122, His 123)                                          | < 0,02                    | >90                     |
| Mutantas 12<br>(His 123 -> Glu 123)                                                                               | < 30                      | >90                     |
| Mutantas 13<br>(Arg 131, Lys 136, Lys 140, Lys 144,<br>Arg 145 -> Glu 131, Glu 136, Glu<br>140, Glu 144, Glu 145) | < 30                      | >90                     |

a) Egzonukleazės aktyvumas matuotas viengubai [ $^3\text{H}$ ]T7 DNR. 100% egzonukleazės aktyvumas atitinka 5000 vnt./mg.

b) Polimerazės aktyvumas matuotas viengubai veršelio užkrūčio liaukos DNR. 100% polimerazės aktyvumas atitinka 8000 vnt./mg.

Iš septynių testuotų histidinių tik vienas (His 123: mutantas 1) turi fermentinį aktyvumą, būdingą T7 DNR modifikuotai polimerazei. Toks T7 geno 5 baltymas išvalomas naudojant chromatografines kolonėles su DEAE-celiulioze, fosfoceliulioze, DEAE-Sefadeksu ir hiroksilapatitu. Gauta produkto polimerazinis aktyvumas yra beveik normalus (>90% natūralaus fermento aktyvumo), o egzonukleazės aktyvumas sumažintas 4-10 kartų.

Buvo sukurtas šio mutanto variantas, kuriame nebuvo tiek His 123, tiek Ser 122. Toks geno 5 išvalytas baltymas pasižymi 200-500 kartų mažesniu egzonukleazės aktyvumu, bet išsaugo >90% polimerazės aktyvumo.

Šie duomenys patvirtina, kad His 123 yra T7 geno 5 baltymo egzonukleazės aktyvioje zonoje. Be to, gali būti kad His 123 faktiškai yra grupė, modifikuota oksidacijos pagalba, kadangi nustatyta, kad toks oksidinimas modifikuoja histidino grupės liekaną ir kituose baltymuose (Levinc, T. Biol. Chem., t. 258, 11823, 1983; Hodgson ir kt., Biochemistry, t. 14, 5294, 1975). Mutanto 11 liekamasis egzonukleazės aktyvumas yra tos pačios eilės, kaip modifikuojant cheminiu būdu.

Nors His grupės mutacijos ir aprašytos, tačiau ir gretimų taškų mutacijos gali taip pat duoti mutantinius fermentus, atitinkančius šį išradimą, pvz. Lys ir Arg taškuose (mutantai 4 ir 15). Analogiškai, nors ir mutacija kai kuriuose His grupėse nežymiai veikia į egzonukleazės aktyvumą, tai dar nereiškia, kad šios mutacijos neturi reikšmės egzonukleazės aktyvumui.

Ypač efektyvios yra tos mutacijos, kurių metu pašalinamos 2 ar daugiau aminorūgščių, pageidautina 6-8 aminorūgšys, pvz. His 123 srityje. Kitos mutacijos papildomai sumažins egzonukleazės aktyvumą, ar ir visai jį pašalins.

Žemiau pateikiamas mutavusių štamų panaudojimo pavyzdys. Štamas, turintis pGP5-6 (mutacija 11) buvo pateiktas saugojimui (ATCC) (žr. žemiau). Šis štamas buvo išaugintas kaip aprašyta aukščiau, ir indukuotas, kaip aprašyta Tabor ir kt. darbe (T. Biol. Chem., t.

262, 16212, 1987). Ląstelės K38/pTrx-2 gali būti įvestos, siekiant padidinti genetiškai modifikuotos T7 DNR polimerazės išeigą.

Minėtas saugojimui pateiktas štamai taip pat turi plazmidę pGP1-2, kuri aktyvuoja T7 RNR polimerazę. Ši plazmidė aprašyta Tabor ir kt. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, t. 82, psl. 1074, 1985) yra buvo pateikta saugojimui (ATCC) 1985 kovo 22 d. ir pažymėta numeriu 40,175.

Kaip parodyta pieš. 10, pCP5-6 įjungia sekančius segmentus:

1. Polisuojiančios grandies seką EcoR1-Sac1-Sma1-BamHI nuo M13 mp10 (21 bp).
2. T7 14309-16747 bp, kuris turi T7 tipo geną 5, su sekančiomis modifikacijomis:  
14703 bp T7 iš A pakeista į G, sudarant tašką Sma1,  
14304-14321 bp T7 išimtos (18 bp).
3. Sujungiančios grandies seką Sal1-Pst1-Hind III nuo M13 mp10 (15 bp).
4. pBR322 29 bp (taškas Hind III) - pBR322 375 bp (taškas BamHI).
5. 22855 bp T7 - 22927 bp T7, kuris turi F10 T7 RNR polimerazės promotorių su jungiančiomis grandimis BamHI, esančiomis kiekvienme gale (82 bp).
6. pBR322 375 bp (taškas BamHI) - pBR322 4321 bp (taškas EcoR1).

#### DNR sekos sudarymas, naudojant modifikuotą T7 tipo DNR polimerazę

DNR sintezės reakcijos, naudojant modifikuotą T7 tipo DNR polimerazę, įgalina gauti baigtų sekų fragmentus su vienodu radioaktyvumu zonoje, kurios ilgis nuo kelių iki tūkstančių bazių. Praktiškai yra neaptinkamas joks foninis aktyvumas, apsprendžiamas terminacija taškuose, nepriklausančiuose nuo grandinės užbaigimo agento įvedimo.

Sekos sudarymo reakcijos, naudojant T7 tipo modifikuotą DNR polimerazę, susideda iš pulsacijos ir skiedimo etapų. Pulsacija suprantama kaip trumpo žymėto DNR fragmento sudarymas; skiedimas suprantamas kaip šio fragmento ilginimas iki užbaigimo agento įvedimo. Kiekvienas etapas skiriasi nuo įprastų DNR sekos sudarymo reakcijų. Pulsacijos etape inkubuojama 0-37°C temperatūroje 0,5 - 4 min bėgyje, bei esant trijų nukleotidtrifosfatų (pvz. dCTF, dGTF ir dTTF) didelioms koncentracijoms ir likusio žymėto nukleotidtrifosfato (pvz. [<sup>35</sup>S]dATF) ribotai koncentracijai. Šiose sąlygose modifikuota polimerazė negali parodyti savo procesyviškumo, ir susintetintų radioaktyvių fragmentų populiacija

ijungs molekules nuo kelių iki kelių šimtų bazių ilgio. Pulsacijos tikslas yra pažymėti kiekvieną pradmenį, naudojant maksimalų radioaktyvumą ir minimalius nukleotidų radioaktyvumo lygius. Šiame pavyzdyje dvi pulsacijos reakcijos sąlygos (maža temperatūra, pvz. 0-20°C, ir ribota dATF koncentracija, pvz. 0,1 mkmol-1mkmol) yra kliūtis T7 tipo DNR polimerazės procesyvimui pasireikšti. Kiti svarbūs mišinio komponentai sukels analogiškus efektus, pvz. jeigu bus sumažinta kitų nukleotidų koncentracija ar padidintas reakcijos aplinkos joninis aktyvumas. Jeigu pradmuo yra jau pažymėtas, pulsacijos etapas yra nereikalingas.

Skiedimo etape inkubuojama esant 45°C 1-30 min. bėgyje esant aukštoms visų keturių nukleozidtrifosfatų koncentracijoms (50-500 mkmol) ir nustatytoms užbaigimo agentų, pvz. didezoksinukleozidtrifosfatų, koncentracijoms (1-50 mkmol), ko pasekoje DNR sintezė baigiama po vidutiniškai 50-600 bazių įjungimo. Skiedimo tikslas yra ištempti kiekvieną žymėtą pradmenį esant procesyvinėmis sąlygomis vykdomai DNR sintezei, su kiekvieno ištempimo užbaigimu taisyklinguose taškuose keturiose skirtingose reakcijose, naudojant kiekvieną iš keturių didezoksinukleozidtrifosfatų. Dvi skiedimo reakcijos sąlygos (aukšta temperatūra, pvz. 30-50°C, ir aukštos visų keturių didezoksinukleozidtrifosfatų koncentracijos, pvz.. didesnės už 50 mkmol) leidžia pasireikšti T7 tipo DNR polimerazės procesyvinėms savybėms; todėl ta pati polimerazės molekulė bus sintetinama iš pradmens-modelio, kol nebus įjungtas didezoksinukleotidas. Esant temperatūrai 45°C sintezė bus vykdoma >700 nukleotidų/sek. greičiu. Tokiu būdu, sekos sudarymo reakcijose skiedimo etapas baigsis mažiau kaip per sekundę. Ssb procesyviškai didės sekos sudarymo reakcijos metu naudojant, pvz. dTTP, arba esant žemoms temperatūroms, arba esant aukštai joninei galiai, arba esant mažoms trifosfatų koncentracijoms.

[ $\alpha^{35}\text{S}$ ]dATF, arba [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATF, arba fluorescenciškai pažymėti nukleotidai gali būti naudojami DNR sekos sudarymo reakcijose, naudojant T7 tipo modifikuotą DNR polimerazę. Jeigu fluorescencinis analogas yra 5' galo tipo pradmuo, reikalingas pulsacijos etapas.

Du komponentai apsprendžia vidutinį ištempimo dydį sintezės reakcijų eigoje. Pirmas yra pulsacijos reakcijos trukmė. Kadangi pulsacija vykdoma nesant grandinės užbaigimo agentams, tai kuo ilgesnis pulsacijos laikas, tuo daugiau ištempiami pradmenys. Esant 0°C

temperatūrai polimerazės ištempimas sudaro 10 nukleotidų/sek. Antras komponentas yra dezoksiribonukleozidtrifosfatų santykis su užbaigimo agentais skiedimo reakcijos metu. T7 tipo modifikuota DNR polimerazė nesikiria šių analogų, todėl vidutinis ištempimo ilgis skiedimo reakcijoje yra keturguba dezoksinukleozidtrifosfato koncentracija lyginant su užbaigimo agento koncentracija. Tam, kad sutrumpinti vidutinį ištempimo dydį, trumpinamas pulsacijos laikas, pvz.. iki 30 sek. ir/arba padidinama užbaigimo agento koncentracija arba sumažinama dezoksinukleozidtrifosfato koncentracija skiedimo reakcijoje. Siekiant padidinti ištempimo dydį, pulsacijos laikas padidinamas, pvz.. iki 3-4 min., ir/arba skiedimo reakcijoje sumažinama užbaigimo agento koncentracija (pvz.. iki 20-2 mkmol).

#### Pavyzdys 2: DNR sekos sudarymas, naudojant T7 DNR polimerazę

Žemiau pateikiamas sekos sudarymo pavyzdys, naudojant didezoksinukleotidus kaip terminacijos agentus.

9 mkl viengubos M13 DNR (mGP1-2, ATCC 40303 gauta standartiniais būdais) 0,7 mmol koncentracijos sumaišoma su 1 mkl sekos sudarymo pradmeniu (standartinis universalus, 17 bazių, 0,5 pmol/mkl) ir 2,5 mkl 5X aneliuojančio buferio (200 mmol Tris-HCl pH=7,5, 50 mmol MgCl<sub>2</sub>), pšildoma iki 65°C per 3 min. ir lėtai atšaldoma iki kambario temperatūros per 30 min. Pulsacijos reakcijoje 12,5 mkl šio aneliuoto mišinio sumaišoma su 1 mkl 0,1 mmol DTT, 2 mkl 3 mmol 3dNTF (dCTF, dGTF, dTTF) (P. L. Biochemicals, TE), 2,5 mkl [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]dATF (1500 Ci/mmol, New England Nuclear) ir 1 mkl T7 tipo DNR modifikuotos polimerazės, aprašytos pavyzdyje 1, (0,4 mg/ml, 2500 vnt/ml, t. y. 0,4 mkg, išskirtų iš ATCC 67287) ir inkubuojama, esant 0°C 2 min. maišant ir po to centrifuguojant mikrocentrifugoje 1 sek. Inkubacijos laikas gali sudaryti nuo 30 sek. iki 20 min., o temperatūra - nuo 0 iki 37°C. Sekų, pašalintų iš pradmens, nustatymui gali prireikti ir ilgesnio laiko tarpo. Mėginiai (4,5 mkl) išpilstomi į keturis mėgintuvėlius, kuriuose yra pašildyti iki 45°C skiedimo mišiniai. Keturi mėgintuvėliai, pažymėti kaip G, A, T, C turi kiekvieno iš didezoksi (dd) G, A, T, arba C pėdsekinius kiekius (P. L. Biochemicals). Žemiau pateikti specifiniai skiedimo tirpalai. Kiekviename mėgintuvėlyje buvo 1,5 mkl 1 mmol dATF, 0,5 mkl 5X aneliuojančio buferio (200 mmol Tris-HCl pH=7,5, 50 mmol MgCl<sub>2</sub>), ir 1,0 mkl 100 mkmol ddNTF (kur N yra atitinkamuose mėgintuvėliuose G, A, T arba C). Kiekviena

skiedimo reakcija inkubuojama esant 45°C (arba 30-50°C) 10 min. bėgyje, po to į kiekvieną mėgintuvėlį įvedama 6 mkl stop tirpalo (90% formaldehido, 10 mmol EDTA, 0,1% ksilol-cianolio) ir mėgintuvėlis padedamas ant ledo. Skiedimo reakcijos laikas gali sudaryti nuo 1 iki 30 min..

Sekos sudarymo reakcijos vykdomos 6 valandas standartiniame, 6% sekos sudarymo poliakrilamidiniame gelyje, užpiltame 7 mol šlapalu ir naudojant 30 W galingumą. Prieš reakciją mišinys pakaitinamas 75°C temperatūroje 2 min. bėgyje. Gelis fiksuojamas 10% acto rūgštimi 10% metanole, išdžiovinamas ir eksponuojamas per naktį į aukšto kontrastingumo Kodak tipo fotojuostą, reaguojančią į radioaktyvumą.

DNR seka gali būti nustatyta analizuojant juostas fotojuostoje. Toks sekos nustatymo pavyzdys parodytas pieš. 11. Sekos nustatymo būdas remiasi aukštos skiriamosios galios gelio elektroforezės metodika, naudojant denatūruotą poliakrilamidinį gelį, kuri įgalina išskirti viengubus oligonukleotidus iki nuo 300 iki 500 bazių ilgio, kurie skiriasi ilgiu pagal vienetininį dezoksinukleotidą. Praktikoje, kad nustatyti eiliškumą, įvedama serija žymėtų viengubų oligonukleotidų, kurie turi vieną fiksuotą galą ir kurie skiriasi ilgiu kitame gale per kiekvieną sekantį dezoksinukleotidą. Dezoksinukleotidų sekos nustatymas vykdomas generuojant keturiomis skirtingomis cheminėmis ar fermentinėmis reakcijomis visus dezoksinukleotidus, kurie savo kintančiuose galuose užbaigiami atitinkamai A, T, C arba G. Po to šių reakcijų oligonukleotidiniai produktai suskaldomi denatūruojant į gretimas skiriančio gelio vietas. Kadangi visi galimi oligonukleotidai yra tarp keturių vietų, DNR seka gali būti tiesiogiai nustatyta iš oligonukleotidų "kopėtelių", kaip iliustruojama pieš. 11.

### Pavyzdys 3: DNR sekų sudarymas, naudojant ribotas dNTFs koncentracijas

Šiame pavyzdyje pateikta DNR sekos mGP1-2 analizė, naudojant ribotas visų dezoksiribonukleozidrifosfatų koncentracijas pulsacijos reakcijos metu. Šis būdas turi visą eilę pranašumų prieš pavyzdžio 2 būdą. Visų pirma, pulsacijos reakcija vykdoma iki galo, tuo tarpu kai prieš tai aprašytame būde reakcija yra nutraukiama. Todėl šio pavyzdžio reakcija yra lengviau vykdyti. Antra, šiame būde kontroliuojamas molekulės ištempimas pulsacijos metu, ir tokiu būdu žymėjimo efektyvumas (pirmosios 50 bazių) išauga maždaug 10 kartų.



7 mkl 0,75 mmol koncentracijos viengubos M13 DNR (mGP1-2) sumaišoma su 1 mkl sekos sudarymo pradmeniu (17 bazių, 0,5 pmol/mkl) ir 2 mkl 5X aneliuojančio buferio (200 mmol Tris-HCl pH=7,5, 50 mmol MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol NaCl), pašildoma 65°C temperatūroje 2 min. ir lėtai atšaldoma iki kambario temperatūros per 30 min. Pulsacijos reakcijoje 10 mkl aneliuoto mišinio sumaišoma su 1 mkl 0,1 mmol DTT, 2 mkl 1,5 mmol 3dNTF (dCTF, dGTF, dTTF), 0,5 mkl [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]dATF ( $\alpha$  10 mkmol) (maždaug 10 mkmol, 1500 Ci/mmol, New England Nuclear) ir 2 mkl T7 tipo DNR modifikuotos polimerazės (0,1 mg/ml, 1000 vnt/ml, t. y. 0,2 mkg 2 vnt.) ir inkubuojama, esant 37°C 5 min. (Inkubacijos laikas gali sudaryti nuo 1 min. iki 60 min., o temperatūra - nuo 20 iki 45°C).

Pulsacijos reakcijos produktai (po 3,5 mkl) išpilstomi į keturis mėgintuvėlius, kuriuose yra 37°C temperatūros skiedimo mišiniai. Keturi mėgintuvėliai, pažymėti kaip C, A, T, G turi kiekvieno iš didezoksi C, A, T, arba G pėdsekinis kiekius. Žemiau pateikti specifiniai skiedimo tirpalai. Kiekviename mėgintuvėlyje buvo 0,5 mkl 5X aneliuojančio buferio (200 mmol Tris-HCl pH=7,5, 50 mmol MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol NaCl), 1 mkl 200 mkmol dNTF (dGTF, dATF, dTTF, dCTF) ir 1,0 mkl 20 mkmol ddNTF. Kiekviena skiedimo reakcija inkubuojama esant 37°C (arba 20-45°C) 5 min. (arba 1-60 min.) bėgyje, po to į kiekvieną mėgintuvėlį įvedama 4 mkl stop tirpalo (95% formaldehido, 20 mmol EDTA, 0,05 ksilolcianolio) ir mėgintuvėlis padedamas ant ledo, po ko vykdomos aprašytos aukščiau standartinės procedūros seką sudarančiame gelyje.

#### Pavyzdys 4: dTTF naudojimas vietoje dGTF DNR sekos sudaryme

Sekos sintezėje, sudarant DNR molekulėje antrines struktūras, prasminga naudoti dTTF (Mills ir kt. Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 2232, 1979) arba deazaguanozintrifosfatą (deaza-GTF, Mizusawa ir kt. Nuc. Acid. Res., 14, 1319, 1986). Buvo nustatyta, kad abu analogai gerai funkcionuoja su T7 tipo polimerais, ypač gerai funkcionuoja dTTF, esant SSb. Šios reakcijos vykdomos naudojant aukščiau aprašytą T7 modifikuotą polimerazę, arba skiedimo reakcija vykdoma 1-2 minutes ir/arba esant 20°C, tuo siekiant sumažinti egzonukleazės skilimą.

Modifikuota T7 DNR polimerazė efektyviai naudoja dTTF arba deaza-GTF vietoje dGTF. dTTF naudojamas vietoje dGTF tiek pulsacijos mišiniuose, tiek ir skiedimo

mišiniuose 2-5 kartus didesnėmis koncentracijomis negu dGTF. Skiedimo mišiniuose ddG naudojamas ddGTF, o ne ddITF

Skiedimo reakcijos, kurios vykdomos naudojant dTTF, yra jautrios egzonuklezės likusiam aktyvumui (maždaug 0,01 vnt.). Tam, kad išvengti šios problemos, skiedimo reakcijos laikas neturi viršyti 5 min., kai naudojamas dITF. Rekomenduojama, kad keturios reakcijos su dITF būtų vykdomos, kartu naudojant ir dGTF. Jeigu kartu naudojami abu šie junginiai, tai reikalingų mišinių skaičius gali būti minimizuojamas sekančiai: 1) pašalinant dGTF ir dITF iš skiedimo mišinių, kas reiškia, kad keturi skiedimo mišiniai gali būti naudojami skiedimo reakcijose tiek su dGTF, tiek su dITF; 2) įvedant dideles dGTF ir dITF koncentracijas (2 mkl su atitinkamai 0,5 mmol ir 1-2,5 mmol koncentracijomis) į atitinkamą pulsacijos mišinį. Tada šiuose pulsacijos mišiniuose bus mažos dCTF, dTTF ir  $[\alpha^{35}\text{S}]$ dATF koncentracijos ir aukštos dGTF ir dITF koncentracijos. Tokia modifikacija paprastai nekenkia sekos sudarymo reakcijų kokybei, bet sumažina reikalingų pulsacijos ir skiedimo mišinių kiekį reakcijose, kada naudojama dGTF ir dITF, iki šešių.

Ši sekos sudarymo reakcija vykdoma kaip ir pavyzdyje 3, tik su tuo skirtumu, kad du pulsacijos mišiniai įjungia: a) mišinį 3dNTF, kai yra dGTF: 1,5 mkmol dCTF, dTTF ir 1 mmol dGTF, ir b) mišinį 3dNTF, kai yra dITF: 1,5 mkmol dCTF, dTTF ir 2 mmol dITF. Šiose reakcijose dGTF pašalinama iš skiedimo mišinių (pvz.. skiedimo mišiniai įjungia 30 mkmol dATF, dTTF ir dCTF), o skiedimo reakcijos laikas, naudojant dITF neviršija penkių min.

### Deponavimas

Štamai K38/pGP5-5/pTrx-2, K38/pTrx-2 ir M13 mGP1-2 buvo priduoti saugojimui kaip ATCC su numeriais 67287, 67286 ir 40303. Šis deponavimas buvo atliktas 1987 sausio 13 d. Štamas K38/pGP1-2/pGP5-6 buvo pridotas saugoti kaip ATCC 1987 gruodžio 4 d., ir jam buvo suteiktas numeris 67571.

Pareiškėjai ir jų įgaliotieji asmenys atsako už duotų kultūrų pakeitimą, jeigu jos žūsta iki patento galiojimo pabaigos, penkis metus po kultūrų pareikalavimo, arba 30 metų, nepriklausomai kuris iš šių terminų ilgesnis, taip pat pripažįsta savo atsakomybę už tokio patento išdavimą, po to laiko kultūros bus galutinai prieinamos visuomenei. Iki to laiko

deponuotos kultūros bus prieinamos patentų Komisarui su pavadinimu 37 CFR, Sekcija 1-14, ir 35 USC, sekcija 112.

#### Kiti išradimo realizavimo principai

Kiti išradimo realizavimo principai aprėpiami pateiktoje toliau išradimo formulėje.

Kitos modifikuotų DNR polimerazių, pasižyminčių procesyvumu ir egz nukleazės aktyvumo nebuvimu, įjungia tiesioginę fermentinę DNR genominių sekų amplifikaciją. Tai aprašyta kitų polimerazių atveju Saiki ir kt. (Science 230, 1350, 1985) ir Scharf darbuose (Science, 233, 1076, 1986).

Kaip parodyta pieš. 6 specifinės DNR zonos fermentinė amplifikacija reikalauja kitų pradmenų naudojimo, kurie aneliuojasi su DNR sekos dominančioje zonoje 3' galais. Šios procedūros vykdymas reikalauja daugelio (10-40, pageidautina 16-20) DNR denatūravimo, aneliavimo ir sintezės ciklų. Naudojant tokią procedūrą galima amplifikuoti žmogaus genominės DNR specifinę zoną daugiau kaip 200 000 kartų. To rezultate specifinis geno fragmentas sudaro vieną penktąją, o ne pradinę vieną milijoninę, dalį. Tai labai palengvina tiek klonavimą, tiek ir tiesioginę genominės DNR analizę. Diagnostikoje tai gali pagreitinti analizę nuo kelių savaičių iki 1-2 dienų.

Skirtingai nuo Klenovo fragmento, kur amplifikacijos procesas apribojamas fragmentais, siekiančiais šimtus bazių ilgio, T7 tipo DNR modifikuotos polimerazės (pageidautina kartu su *E. coli* DNR surišančiuoju baltymu arba SSb, kad išvengti greito "atvirkšinio" viengubos DNR susidarymo) turi padėti DNR fragmentų, kurių ilgis keli tūkstančiai bazių, amplifikacijai.

Modifikuotos T7 tipo DNR polimerazės taip pat tinka standartiniams reakciniams mišiniams: a) 5' DNR fragmento galo užpildymui, kai fragmentai gaunami naudojant skaldymo fermentą, kad gauti dvigubą DNR be 3' galo; b) 3' galo žymėjimui ribojančiuose fragmentuose vykdant RNR kartografavimą SI nukleazės analizės pagalba arba DNR sekos sudarymui, naudojant Maksamo ir Hilberto cheminės modifikacijos procedūras; ir c) klonuotų DNR fragmentų mutagenezei "in vitro". Taip, pvz., cheminiu būdu susintetintas pradmuo, kuris turi specifines netaisyklingai suporuotas bazines, hibridzuojamas su DNR modeliu, po ko ištempiamas T7 tipo modifikuotos DNR polimerazės pagalba. Tokiu būdu

mutacija įjungiamą į sintetiną grandinę. Šios polimerazės privalumas yra sintezės iš pradmenų per visą DNR ilgį galimybė. Kaip šito variantas, mutagenezė gali būti vykdoma neteisingo įvedimo pagalba DNR sintezės metu (žr. aukščiau). Tai naudojama klonuotų DNR fragmentų specifinių zonų mutagenezei. Ypač svarbu tai, kad naudojamas fermentas neturi egzozonukleazės aktyvumo. Standartinis reakcinis mišinys suprantamas buferinis tirpalas, įjungiantis polimerazę ir reikalingus dezoksiribonukleozidus, ar kitus junginius.

## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. DNR nukleotidinės sekos nustatymo būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia: DNR molekulės aneliaciją su galinčia hibridizuotis su šia DNR molekule pradmens molekule; atskirų aneliuoto mišinio porcijų inkubaciją mažiausiai keturiuose induose, kurių kiekviename yra keturi skirtingi dezoksinukleozidtrifosfatai, procesyvinę DNR polimerazę, kai polimerazė lieka surišta prieš disocijaciją su ne trumpesne kaip 500 bazių DNR molekule sąlygose, kurios paprastai sudaromos DNR sekos sintezės reakcijose, ir kai minėta polimerazė turi mažesnę kaip 500 vienetų egzonukleazės aktyvumą vienam mg polimerazės, ir vieną iš keturių DNR sintezės užbaigimo agentų, kuris užbaigia sintezę prie tam tikros nukleotidinės bazės, kada kiekvienas minėtas agentas baigia DNR sintezę prie skirtingos nukleotidinės bazės; ir kiekvienos inkubacijos reakcijos DNR produktų frakcionavimą pagal jų dydį, ko rezultate gali būti nustatyta mažiausiai tam tikra minėtos DNR molekulės nukleotidų sekos dalis.

2. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė lieka surišta prieš disocijaciją su ne mažesne kaip 500 bazių DNR molekule.

3. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė lieka surišta prieš disocijaciją su ne mažesne kaip 1000 bazių DNR molekule.

4. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė yra polimerazė, aptinkama ląstelėse, užkrėstose T7 tipo fagu.

5. Būdas pagal Apibrėžties punktą 4, besiskiriantis tuo, kad minėtas T7 tipo fagas yra T7, T3, F1, F11, H, W31, gh-1, Y, A1122 arba SPC.

6. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė yra neatpažįstama didezoksinukleotidiniam analogams polimerazė.

7. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė yra modifikuota polimerazė, turinti mažesnę kaip 50 vienetų egzonukleazės aktyvumo 1 mg polimerazės.

8. Būdas pagal Apibrėžties punktą 7, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė yra modifikuota polimerazė, turinti mažesnę kaip 1 vienetas egzonukleazės aktyvumo 1 mg polimerazės.

9. Būdas pagal Apibrēzties punkta 7, besiskiriantis tuo, kad minēta polimerazē yra modifikuota polimerazē, turinti mažesni kaip 0,1 vieneto egzonukleazēs aktyvumo 1 mg polimerazēs.

10. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minēta polimerazē nerodo egzonukleazēs aktyvumo.

11. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minēta polimerazē gali naudoti 10 bazių porų ilgio ir ilgesnius pradmenis.

12. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minēta polimerazē gali naudoti 4 bazių porų ilgio ir ilgesnius pradmenis.

13. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minētas pradmuo įjungia 4-20 bazių porų ir minēta polimerazē gali naudoti 4-20 bazių porų ilgio pradmenis.

14. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minēta polimerazē yra neatpažįstama nukleotidiniams analogams, ir yra modifikuota polimerazē, turinti mažesni kaip 500 vnt. egzonukleazēs aktyvumo 1 mg polimerazēs, minētas pradmuo yra vienguba RNR arba DNR iš 4-10 bazių, ir minēta polimerazē gali naudoti 4-10 bazių ilgio pradmenis, ir inkubacija įjungia pulsacijos ir skiedimo etapus.

15. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad minētas pradmuo yra vienguba DNR arba RNR.

16. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad aneliacija įjungia minētos DNR molekulės ir pradmens pašildymą iki temperatūros, didesnės kaip 65°C, bei pašildyto mišinio atšaldymą iki 0-30°C.

17. Būdas pagal Apibrēzties punkta 1, besiskiriantis tuo, kad inkubacija įjungia pulsacijos ir skiedimo etapus.

18. Būdas pagal Apibrēzties punkta 17, besiskiriantis tuo, kad pulsacijos etapas įjungia aneliuoto mišinio sumaišymą su visais keturiais dezoksinukleozidtrifosfatais ir procesyvine DNR polimeraze, kai mažiausiai vienas dezoksinukleozidtrifosfatas yra žymėtas ir jo koncentracija yra ribota.

19. Būdas pagal Apibrēzties punkta 18, besiskiriantis tuo, kad minētas inkubacijos pulsacijos etapas vykdomas nuo 30 sekundžių iki 20 minučių.

20. Būdas pagal Apibrėžties punktą 18, besiskiriantis tuo, kad skiedimo etapas įjungia vieno minėto grandinės užbaigimo agento įvedimą į keturis skirtingus mišinio alikvotus po pulsacijos etapo.

21. Būdas pagal Apibrėžties punktą 20, besiskiriantis tuo, kad inkubacijos skiedimo etapas vykdomas nuo 1 iki 60 minučių.

22. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad grandinės užbaigimo agentas yra didezoksinukleotidas.

✓ 23. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad grandinės užbaigimo agentas yra vieną dezoksinukleozidtrifosfatą ribojantis lygis.

24. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad dezoksinukleozidtrifosfatas yra pasirenkamas tarp dITF arba diazaguanozino.

25. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad pradmuo yra pažymimas iki aneliacijos etapo.

26. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad inkubacija įjungia skiedimo etapą.

27. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad pradmuo yra fluorescentiškai pažymėtas.

✓ 28. T7 tipo DNR polimerazės gaminimo iš klonuotų fragmentų būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia koduojančių minėtą polimerazę genų, kontroliuojamų promotoriais, patalpimą vienoje ląstelėje, indukuotą minėtų genų aktyvavimą, kai ląstelė yra logaritminėje arba stacionarioje augimo fazėje, ir minėtos polimerazės išskyrimą iš minėtos ląstelės.

29. Būdas pagal Apibrėžties punktą 28, besiskiriantis tuo, kad vienas iš minėtų genų yra kontroliuojamas promotoriaus, kurio aktyvavimui reikalinga T7 RNR polimerazė.

30. Būdas pagal Apibrėžties punktą 28, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė yra T7 aktyvi DNR polimerazė, gauta iš dviejų klonuotų genų, ir kad vienas genas yra kontroliuojamas promotoriaus, kurio aktyvavimui reikalinga T7 RNR polimerazė.

✓ 31. T7 DNR polimerazės išvalymo nuo ląstelių, turinčio išreiškiantį šią polimerazę vektorių, būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia: minėtų ląstelių lizavimą ir praleidimą

pro skiriančiąją kolonėlę, DE52 DEAE kolonėlę, fosfoceliuliozinę kolonėlę ir hidroksiapatitinę kolonėlę.

32. Būdas pagal Apibrėžties punktą 31, besiskiriantis tuo, kad prieš praleidžiant per kolonėlę polimerazė nusodinama amonio sulfatu.

33. Būdas pagal Apibrėžties punktą 31, besiskiriantis tuo, kad įjungiami papildomi polimerazės praleidimo etapai per kolonėlę Sefadeks DEAE A-50.

34. Būdas pagal Apibrėžties punktą 31, besiskiriantis tuo, kad skiriančioji kolonėlė yra kolonėlė Sefadeks 150.

35. Produkuojamos rekombinantiniais metodais DNR polimerazės tirpalo egzonukleazės aktyvumo inaktyvacijos būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia minėto tirpalo inkubaciją inde, kuriame yra deguonis, redukuojantis agentas ir pereinamasis metalas.

2 ✓ 36. DNR sekos sudarymo sistema, įjungianti DNR polimerazę, kai polimerazė yra sujungta disocijacija, ir kai ši polimerazė turi mažesnę kaip 500 vienetų egzonukleazės aktyvumą 1 mg polimerazės, ir ši polimerazė parodo savo procesyvines savybes esant paprastai naudojamoms DNR sekos sudarymo reakcijos sąlygoms; ir reagentą, reikalingą minėtos sekos sudarymui, parenkamą tarp:

- a) dITP, ir
- b) sekos užbaigimo agentas.

37. Sistema pagal Apibrėžties punktą 36, besiskirianti tuo, kad minėtas reagentas yra dITP.

38. T7 tipo DNR polimerazę koduojantis genas, kuris yra genetiškai modifikuotas, siekiant sumažinti natūralios kilmės egzonukleazės aktyvumą.

39. T7 tipo DNR polimerazė, pagaminta geno, apibrėžto Apibrėžties punkte 38.

40. Dvigubos DNR iš linijinės DNR molekulės, turinčios grandinės zoną, kurioje minėtos molekulės 3' galas yra dvigubas ir turi 3' terminalą, gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia minėtos molekulės inkubaciją su procesyvine DNR polimeraze, kuri praktiškai neturi natūralios kilmės egzonukleazės aktyvumo.

41. DNR sekos amplifikacijos būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia pirmojo ir antrojo pradmens aneliaciją su priešingomis dvigubos DNR grandinėmis, ir aneliuoto



mišinio inkubavimą su procesyvine DNR polimeraze, kuri turi mažesnę kaip 500 vienetų egzonukleazės aktyvumą 1 mg polimerazės, ir kada pirmasis ir antrasis pradmenys aneliuojasi su priešingomis minėtos DNR sekos grandinėmis.

42. Būdas pagal Apibrėžties punktą 41, besiskiriantis tuo, kad pirmasis ir antrasis pradmuo turi 3' galus, po aneliacijos nukreiptus vienas į kitą.

43. Būdas pagal Apibrėžties punktą 41, besiskiriantis tuo, kad papildomai įjungia po inkubacijos etapo gautos DNR denatūraciją, pirmojo ir antrojo pradmenų aneliaciją su gauta DNR ir aneliuoto mišinio inkubaciją su minėta polimeraze.

44. Būdas pagal Apibrėžties punktą 43, besiskiriantis tuo, kad minėtas denatūracijos, aneliacijos ir inkubacijos ciklas kartojamas 10-40 kartų.

45. Būdas pagal Apibrėžties punktą 41, besiskiriantis tuo, kad egzonukleazės aktyvumas yra mažesnis kaip 1 vnt. 1 mg polimerazės.

46. DNR fragmento 3' galo žymėjimo būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia minėto DNR fragmento inkubaciją su procesyvine DNR polimeraze, kuri turi mažesnę kaip 500 vienetų egzonukleazės aktyvumą 1 mg polimerazės, ir su žymėtu dezoksinukleotidu.

47. DNR klonuoto fragmento mutagenezės "in vitro" būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia pradmens ir modelio panaudojimą, kada minėti pradmuo ir modelis turi neteisingai suporuotas bazes, ir minėto pradmens ištempimą naudojant procesyvinę DNR polimerazę.

48. DNR klonuoto fragmento mutagenezės "in vitro" būdas, besiskiriantis tuo, kad įjungia minėto fragmento panaudojimą ir DNR grandinės, naudojant procesyvinę DNR polimerazę, kuri turi mažesnę kaip 500 vienetų egzonukleazės aktyvumą 1 mg polimerazės, sintezę sąlygose, kurios sukelia neteisingą nukleotidinės bazės įvedimą.

49. Būdas pagal Apibrėžties punktą 12, besiskiriantis tuo, kad mišinys įjungia T7 tip geną 2.5 arba geną 4.

50. Būdas pagal Apibrėžties punktą 13, besiskiriantis tuo, kad mišinys įjungia T7 tip geną 2.5 arba geną 4.

51. Geną pagal Apibrėžties punktą 38, besiskiriantį tuo, kad jis turi modifikuotą His grupę.

52. Geną pagal Apibrėžties punktą 51, besiskiriantį tuo, kad minėta grupė yra T7 DNR polimerazės grupė His-125.

53. Geną pagal Apibrėžties punktą 51, besiskiriantį tuo, kad minėta His grupė yra pašalinta.

54. T7 DNR polimerazė, pagaminta geno, atitinkančio Apibrėžties punktus 52 arba 53.

55. Geną pagal Apibrėžties punktą 38, besiskiriantį tuo, kad amino rūgštys 118-123 yra pašalintos iš geno, koduojančio T7 tipo DNR polimerazę.

56. Sistema, įjungianti aibę iš mažiausiai 25 oligomerų, tinkamų DNR sekos sudarymui, kai kiekvienas oligomeras yra atskirame inde ir turi kitokią (negu kiti oligomerai) pagrindinę seką, susidedančią iš mažiau kaip 15 bazių.

57. Sistema pagal Apibrėžties punktą 56, besiskirianti tuo, kad minėti oligomerai (kiekvienas) turi nuo 6 iki 9 bazių.

58. Būdas pagal Apibrėžties punktą 1, besiskiriantis tuo, kad minėta polimerazė neparodo savo procesyvumo antros aplinkos sąlygose, paprastai naudojamose DNR sekos sudarymo proceso pulsacijos reakcijose.

59. Sistema pagal Apibrėžties punktą 36, besiskirianti tuo, kad minėta polimerazė neparodo savo procesyvumo antros aplinkos sąlygose, paprastai naudojamose DNR sekos sudarymo proceso pulsacijos reakcijose.

60. Būdas pagal Apibrėžties punktą 4, besiskiriantis tuo, kad minėtas T7 tipo fagas yra fagas T-7.