

(19)



(10) **LT 5262 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **5262**

(51) Int. Cl. ⁷: **C12N 9/00**
C12P 21/00

(21) Paraiškos numeris: **2004 108**

(22) Paraiškos padavimo data: **2004 12 17**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2005 06 27**

(45) Patento paskelbimo data: **2005 09 26**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: **—**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **—**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **—**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **—**

(30) Prioritetas: **60/531,064, 2003 12 19, US**

(72) Išradėjas:

Zhenyu ZHU, US

Shuang Yong XU, US

(73) Patento savininkas:

NEW ENGLAND BIOLABS, INC, 32 Tozer Road, Beverly, MA 01915, US

(74) Patentinis patikėtinis:

**Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Nikuojančių fermentų sukūrimo būdas

(57) Referatas:

Pateikiami būdai, skirti naujų grandinei specifinių nikuojančių endonukleazų identifikavimui, panaudojant mutagenizuotų restrikcijos endonukleazės genų *in vitro* atgalinius kryžminimus su jų laukinio tipo atitikmeniu ir gautų nikuojančių endonukleazų identifikavimą, nustatant jų skaidymo aktyvumą ir specifiškumą grandinei. Nikuojančių endonukleazų, identifikuočių šiuo būdu, pavyzdžiai yra NtBsaI ir Nb.BsaI, Nt.BsmAI ir Nb.BsmAI, ir Nt.BsmBI.

IŠRADIMO PAGRINDIMAS

Yra per 240 II tipo restrikcijos endonukleazių, pasižyminčių unikaliu specifiskumu, išskirtų iš bakterinės ir virusinės kilmės šaltinių, kurios yra naudojamos tyrimo ir diagnostikos tikslais. Tačiau tik septyni nikuojantys fermentai yra komerciškai prieinami: N.BstNBI, N.AlwI, N.BbvCIA ir N.BbCIB (NEB katalogas, 2002/2003) (New England Biolabs, Inc.); N.Bpu10I (Fermentas catalog, 2002, Fermentas, Inc., Hanover, MD); ir N.CviQXI (CviNY2A) ir N.CviPII (CviNYSI) Megabase Research Products, Lincoln, NE

(www.cvienzymes.com). Be šių, aukščiau nurodytų fermentų, yra dar keletas fago koduojamų nikuojančių fermentų, tokių kaip bakteriofago fl geno II baltymas (gpII), kuris esmingai svarbus virusinės DNR replikacijai. Geno II baltymas sukelia viengrandininį trūkį (+) grandinėje tam, kad prasidėtų riedanti žiedinė replikacija. Jis taip pat dalyvauja liguojant išstumtą (+) grandinę, ko pasekoje susidaro viengrandininė fago DNR (Geidei ir kt., *J. Biol. Chem.* 257: 6488-6493 (1982); Higashitani ir kt., *J. Mol. Biol.* 237: 388-400 (1994)). GpII baltymas ir egzonukleazė III gali būti naudojami kartu sukuriant viengrandininę DNR mutagenezei ir naudojant ją kaip matricą naujos DNR grandininės sintezei *in vitro*.

Gamtoje egzistuojantys nikuojantys fermentai N.CviQXI (CviNY2A) ir N.CviPII (CviNYSI) buvo išskirti iš *Chlorella algae* virusų lizatų (Zhang, Y. ir kt., *Virology* 240:366-375 (1988); Xia, Y. ir kt., *Nucl. Acids Res.* 16:9477-9487 (1988)) ir nikuojančios endonukleazės N.BstNBI ir N.BstSEI buvo išskirtos iš bakterijų (Morgan R.D. ir kt., *Biol. Chem.* 381:1123-5 (2000); Abdurashitov ir kt., *Mol. Biol. (Mosk)* 30: 1261-1267 (1966)). Tam tikras kiekis nikuojančių fermentų taip pat buvo gautas perdarant IIA tipo restrikcijos fermentus (US 6191267; US 6395523; EP 1176204).

Aukščiau aprašytos nikuojančios endonukleazės plačiai naudojamos genetinėje inžinerijoje (žiūr., pavyzdžiui, US 6660475 ir WO 03/087301). Todėl būtų naudinga turėti prieinamą platesnį įvairaus specifiskumo nikuojančių endonukleazių pasirinkimą. Buvo aprašyti būdai, kaip gauti nikuojančias endonukleazes modifikuojant restrikcijos endonukleazes. Tačiau šie būdai turi tam tikrų apribojimų, kuriuos būtų pageidautina apeiti.

Pavyzdžiui, Xu Y. ir kt. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:12990-12995 (2001)) aprašo nikuojančios endonukleazės N.AlwI sukūrimo būdą panaudojant domenų mainus. Šis būdas turi tą trūkumą, kad iš anksto reikia žinoti, kad dimerizacijos domenas bus lokalizuotas tarp AlwI ir homologiško nikuojančio fermento N.BstNBI. Naujai sukurtas fermentas N.AlwI

negali formuoti dimero ir nikuoja DNR kaip monomeras; šią savybę jam suteikia domenai, gautas iš N.BstNBI.

Besnier, C.E. ir Kong, H. *EMBO Report* 2:782-786 (2001), Kong, H. ir kt. US patentas 6395523, (2002) MlyI variantų gavimui panaudojo sait-nukreiptą mutagenzę. Laukinio tipo fermento dimerizacijos funkcija buvo panaikinta.

Stahl F. ir kt. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6175-80 (1996)) aprašė nikuojančios endonuklezės (mikožės), kuri nebuvo specifinė tam tikrai dvigubos DNR grandinei, sukūrimo būdą. Šis būdas apėmė EcoRV mutantų sukūrimą, kurie buvo modifikuoti jų suliejimui panaudojus skirtingas peptidų tags. Po to EcoRV nikuojantis fermentas buvo sukurtas iš subvieneto, pasižyminčio katalitiniu inaktyvumu, ir antrojo subvieneto, nesugebančio jungtis su DNR. Kadangi šie mutantai, sukurti tokiu būdu, savo nikuojančiomis savybėmis nebuvo specifiniai kurios nors DNR grandinės atžvilgiu, jų panaudojimo naudingumas, dirbant su DNR, yra menkesnis.

Kiti mutagenzės bandymai, skirti EcoRI restrikcijos endonukleazei, taip pat leido sukurti keletą mutantų, kurie labiau nikavo (pasižymėjo viengrandiniu skaidymu) DNR nei skaidė dvigubą DNR. Pavyzdžiui, EcoRI R200C mutantinis baltymas pagamino daugiau nikuotos žiedinės DNR negu wtEcoRI fermentas (Heitman, J. Ir Medel, P., *Proteins: Structure, Functions, and Genetics* 7:185-197 (1990)). Ir vėlgi, kadangi šie mutantai nėra specifiniai kurios nors DNR grandinės atžvilgiu, jie nėra plačiai naudojami molekulinės biologijos metodinėms reikmėms.

Janulaitis A. ir kt. (EP 1176204 A1) aprašė DNR sekai specifinių nikuojančių fermentų gavimo būdą iš IIT tipo restrikcijos endonukleazių. IIT tipui priklauso fermentai, sudaryti iš heterodimerinių subvienetų tokių, kaip Bpu10I, BbvCI ir BslI. Sekai specifinį nikuojantį fermentą (nikazę) galima sukurti inaktyvuojant IIT tipo restrikcijos endonukleazės α subvieneto katalitinį aktyvumą ir po to suformuojant heterodimerą su laukinio tipo β subvienetu.

Heiter D. ir kt. (US patento paraiška 2003-0100094) aprašė BbvCI ir kitų restrikcijos endonukleazių perdarymo į nikuojančius fermentus būdą, kur gauti fermentai atitinka II tipo restrikcijos endonukleazes, turinčias griežtai apibrėžtus ir išsaugotus katalitinius saitus.

Heitman ir Model aprašo EcoRI restrikcijos endonukleazės atsitiktinės mutagenzės būdą (Heitman, J. ir Model, P., *EMBO J.* 9:3369-3378 (1990)). Kaip mutagenas naudojamas nitrozoguanidinas, kuriuo paveikiamos *E. coli* ląstelės, turinčios *ecoRIR* geną. *ecoRIR* geną turinti plazmidė taip pat buvo mutagenizuota perleidžiant ją per mutatorinį *mutD* kamieną.

Buvo išskirti EcoRI variantai (nuliniai mutantai, mažo aktyvumo mutantai, laisvo specifiškumo mutantai ir nikuojantys mutantai).

Xu ir Schildkraut aprašo atsitiktinės mutagenezės būdą, skirtą *bamHIR* geno mutagenizacijai, panaudojant hidroksilaminą (Xu, S.-y. ir Schildkraut, I., *J. Biol. Chem.* 266:4425-4429 (1991)). Buvo išskirti atsitiktinės mutagenezės metu atsiradę BamHI variantai (nuliniai mutantai, mažo aktyvumo mutantai, katalitiniai mutantai, gebantys jungtis su DNR, bet neskaidantys).

Roberts R.J. ir kt. (*Nucl. Acids Res.* 31:1805-1812 (2003)) klasifikavo II tipo restrikcijos endonukleazių įvairius potipius. IIA tipo restrikcijos endonukleazės turi **asimetrines** DNR atpažinimo sekas. Skaidymo vieta gali būti pačios atpažinimo sekos ribose arba už atpažinimo sekų ribų pasroviui. Pavyzdžiu gali būti BsmI (GAATGC 1/-1, viršutinės grandinės skaidymas pasroviui viena baze nuo atpažinimo sekos, apatinės grandinės skaidymas pačios atpažinimo sekos ribose), AclI (CCGC -3/ -1), BssSI (CACGAG -5/ -1) ir BsaI (GGTCTC 1/5). IIA tipui priklauso IIG tipo, IIH tipo, IIS tipo ir IIT tipo restrikcijos endonukleazės, turinčios asimetrinę DNR atpažinimo seką. Daugelis fermentų gali būti daugiau negu vieno potipio. Pavyzdžiui, BsaI yra tiek IIA tipo, tiek ir IIS tipo fermentas.

IIS tipo restrikcijos endonukleazės turi **asimetrines** DNR atpažinimo sekas ir skaido DNR už savo atpažinimo sekų ribų, t.y. skaidymas nuo 1 iki 10 bazių už DNR atpažinimo sekos ribos. Pavyzdžiai: BsmAI (GTCTC 1/5), BsmBI (CGTCTC 1/5), FokI (GGATG 9/13) ir SapI (GCTCTTC ¼).

IIG tipo restrikcijos endonukleazės turi susiliejusius endonukleazės ir metilazės domenų. Todėl IIG tipo fermentai pasižymi ir endonukleaziniu, ir metilaziniu aktyvumais, ir šiuos aktyvumus galima skatinti pridedant AdoMet. IIG tipo fermentų DNR atpažinimo sekos gali būti simetrinės ir asimetrinės. Asimetrinius saitus turi BpmI (CTGGAG 16/14) ir BseRI (GAGGAG 10/8). IIG tipo fermentai gali būti IIA tipo arba IIS tipo.

IIH tipo restrikcijos endonukleazių genetinė sandara panaši į I tipo restrikcijos-modifikacijos sistemą. DNR atpažinimo seka gali būti simetrinė ar asimetrinė. Pavyzdžiai: BcgI (10/12 CGAN₅TGC 12/10) (SEQ ID No:43) ir BAEI (10/15 AC N₄ GTAYC 12/7) (SEQ ID No: 44).

IIT tipo restrikcijos endonukleazės yra heterodimerai arba tetrameriai (2x heterodimerai). DNR atpažinimo seka gali būti simetrinė arba **asimetrinė**. Pavyzdžiai: Bpu10I (CCTNAGC -5/-2), BbvCI (CCTCAGC -5/-2) ir BslI (CCNNNNN/NNGG).

Yra per 200 restrikcijos endonukleazių, aprašytų Rebase®. Tarp jų – daugiau nei 79 – IIA tipo restrikcijos endonukleazės, turinčios asimetrines atpažinimo sekas ir unikalių

specifiškumą (<http://rebase.neb.com/rebase/>). Dauguma šių restrikcijos-modifikacijos sistemų buvo klonuotos ir ekspresuotos heterologiniuose šeimininkuose (Rebase®). Norėtusi sukurti bendrą nikuojančių endonukleazių gavimo būdą iš restrikcijos fermentų, turinčių asimetrinį atpažinimo saitą, kad būtų sukurti sekai specifiniai ir grandinei specifiniai nikuojantys fermentai.

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimą sudaro būdas, skirtas grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės sukūrimui, susidedantis iš šių pakopų: (a) pirmosios ląstelių-šeimininkų, neturinčių metilazių apsaugos, populiacijos transformacijos, tam tikslui panaudojant plazmides, turinčias atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną; (b) (a) pakopoje gautų transformuotų ląstelių-šeimininkų kultivavimo ir po to atlikto plazmidžių išskyrimo; (c) (b) pakopoje gauto mutagenizuoto restrikcijos endonukleazės geno ir atitinkamo laukinio tipo restrikcijos endonukleazės geno skaidymo į fragmentus; (d) (c) pakopoje gautų laukinio tipo ir mutagenizuoto restrikcijos endonukleazės fragmentų *in vitro* atgalinio kryžminimo (hibridinimo) ir liguoto geno gavimo; (e) (d) pakopoje gauto liguoto geno ekspresuojamo baltymo grandinei specifinio nikuojančio aktyvumo nustatymo; ir (f) sukurtos grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės identifikavimo.

Sukurta grandinei specifinė nikuojanti endonukleazė gali nikuoti tik dsDNR (dvigrandininę DNR) ar gali nikuoti DNR/RNR hibridus vienoje arba abiejose grandinėse arba gali nikuoti RNR/RNR dupleksus. Šis būdas leidžia naudoti heterogeninį plazmidžių mišinį arba homogeninį plazmidžių mišinį, bet kurį, turintį vieną ar daugiau skirtingų tipų restrikcijos endonukleazės arba restrikcijos endonukleazių subvienetus. Mutagenizuoti fragmentai gali būti suskaidyti į du ar daugiau fragmentų. Tačiau atgalinio kryžminimo metu po ligavimo gautas genas turi gebėti ekspresuoti baltymą.

Aukščiau aprašytoje (c) pakopoje geną skaidyti galima veikiant restrikcijos endonukleazėmis, ir po to gauti geno fragmentai išskiriami agarozės gelyje. Aukščiau aprašytoje (d) pakopoje antroji ląstelių-šeimininkų populiacija yra transformuojama veikiant liguotu genu, ir gauti transformantai (transformuotos ląstelės-šeimininkės) yra apsaugomi nuo ekspresuojamo geno sukeltos skaidymo žalingų poveikių metiliniu, kurį atlieka giminingos ar negiminingos metilazės. Po to seka transformantų klonavimas. Šios kolonijos gali būti individualiai ieškomos pagal jų nikuojantį aktyvumą, tam tikslui naudojant superspiralinę DNR kaip substratą. Skyringas gali būti atliekamas naudojant visas ląsteles kultivavimo terpėje arba naudojant ląstelių ekstraktą.

Šiame išradime DNR, koduojančios nikuojančią endonukleazę, mutacijos vieta ir tipas yra apibrėžti (determinuoti). Ši mutacija gali būti delecija (iškrita), insercija (įtarpas) ar vieno ar daugiau nukleotidų pakaita. Pavyzdžiui, mutagenizuotas genas gali turėti nuo 3 (mažiausiai) iki 600 (daugiausiai) nukleotidų deleciją arba kokią kitą tarpinio dydžio deleciją. Dar daugiau, mutagenizuotas genas gali turėti vieną ar daugybines mutacijas. Mutacijos gali būti sukaupos ekspresuoto baltymo C-terminaliniame arba N-terminaliniame gale, arba abiejuose. Identifikuota mutacija ar mutacijos po to gali būti įterptos site-nukreiptos mutagenezės būdu į restrikcijos endonukleazės izošizomerą ar neošizomerą. Palyginus restrikcijos endonukleazės, izošizomero ar neošizomero amino rūgščių identiškumas gali būti nuo 15% iki 99%. Papildoma mutacija gali būti suteikiama nikuojančiai endonukleazei pagal aukščiau aprašytą būdą arba panaudojant antrą atsitiktinės mutagenezės ciklą, arba naudojant sait-nukreiptą mutagenezę tam, kad būtų pagausintos nikuojančios endonukleazės savybės. Pavyzdžiui, gali būti pageidaujama padidinti nikuojantį aktyvumą, sumažinti dvigubą grandinę skaidantį aktyvumą ir/ar padidinti specifiskumą grandinei.

Šiame būde nurodytos ląstelės-šeimininkės gali būti prokariotinės ar eukariotinės ląstelės. Kuomet naudojamos prokariotinės ląstelės, ląstelės-šeimininkės gali būti gram-teigiamos ar gram-neigiamos ląstelės, pavyzdžiui, *E. coli* ląstelės ar *Bacillus* kamienų ląstelės.

Šiame išradimo įgyvendinime nikuojanti endonukleazė yra termofilinė nikuojanti endonukleazė. Pavyzdžiui, nikuojanti endonukleazė gali būti gauta iš BsaI, BsmAI ar BsmBI.

Šiame išradimo įgyvendinime nikuojančios endonukleazės specifiskumas dvigubos DNR grandinei yra determinuotas. Pavyzdžiui, nikuojanti endonukleazė gali būti viršutinės grandinės nikuojanti endonukleazė arba apatinės grandinės nikuojanti endonukleazė.

Šiame išradimo įgyvendinime pateiktas būdas, kaip sukelti vieną ar daugiau vietai specifinių viengrandinių trūkių prieš tai pasirinktoje dvigubos DNR grandinėje; būdas, apimantis dvigubos DNR skaidymą panaudojant nikuojančią endonukleazę, sukurtą aukščiau aprašytu būdu, naudojant nikuojančiam aktyvumui palankias sąlygas.

Šiame išradimo įgyvendinime pateiktas būdas, kaip pagausinti (amplifikuoti) taikininę seką, apimantis: (a) viengrandinio nukleino rūgščių fragmento, turinčio taikininę seką, gavimą, kur fragmentas turi 5' galą ir 3' galą; (b) amplifikacijos pradmens nuo grandinės priklausomai amplifikacijai (SDA) pririšimą prie fragmento 3' galo taip, kad pradmuo sudarytų 5' viengrandinę užlaidą, kur amplifikacijos pradmuo turi sintetinės nikuojančios endonukleazės, sukurtos aprašytu būdu, atpažinimo/skaidymo saitą; (c) amplifikacijos pradmens pailginimą fragmente, kai nėra derivatinių ar pakaitinių dezoksিনukleozido trifosfatų ir yra DNR polimerazė, pasižyminti grandinės išstūmimo aktyvumu ir neturinti 5'-

3' egz nukleazės aktyvumo, ir esant keturiems dezoksinukleozido trifosfatams; ir (d) amplifikuotos dvigrandinės taikinės sekos skaidymą panaudojant nikuojančią endonukleazę, tęsiančią skaidymą po DNR polimerazės poveikio, tokiu būdu išstumiant pirmąją naujai susintetintą grandinę nuo fragmento ir generuojant antrąjį pagausinimo produktą, susidedantį iš antros naujai sintezuotos grandinės, ir nikuojančio skaidymo, pailginimo ir išstūmimo pakopų kartojimą gaunant taikinės sekos pagausinimą (amplifikaciją).

Šiame išradimo įgyvendinime pateiktas būdas, kaip sukurti fermentą, pasižymintį modifikuotu specifiskumu substratui ir aktyvumu, ir apimantis: (a) atsitiktinai mutagenizuotų DNR bibliotekos sukūrimą, kur biblioteka turi vieną ar daugiau genų, koduojančių visą ar dalį mutavusio geno, mutavęs genas yra neaktyvus substrato atžvilgiu ir šis substrato atžvilgiu neaktyvus fermentas turi N-terminalinį ir C-terminalinį galus, kur inaktyvacija įvyksta dėl mutacijos laukinio tipo fermento N-terminaliniame ar C-terminaliniame gale; (b) vieno ar daugiau genų, ekspresuojančių inaktyvuotą endonukleazę, skaidymą į mažiausiai pirmąjį bei antrąjį fragmentus, kur pirmasis fragmentas koduoja fermento C-terminalinį galą, o antrasis fragmentas koduoja fermento N-terminalinį galą; (c) suliejimą (ligavimą) fragmentų, atrinktų iš: pirmojo fragmento ir trečiojo fragmento, koduojančio laukinio tipo fermento N-terminalinį galą; antrojo fragmento su ketvirtuoju fragmentu, koduojančiu laukinio tipo fermento C-terminalinį galą; arba abiejų pirmojo ir antrojo fragmento atitinkamai su trečiuoju ir ketvirtuoju fragmentais; ir (d) liguotos DNR ekspresiją ląstelėje-šeimininkėje.

Šiame išradimo įgyvendinime pateiktas būdas, kaip pagausinti (amplifikuoti) taikinę nukleino rūgštį, apimantis (a) mažiausiai vienos grandinės nikavimą dvigrandinėje taikininėje nukleino rūgštyje daugelyje vietų, tam tikslui panaudojant nikuojantį fermentą, sukurtą pagal apibrėžties 1 punktą taip, kad pasigamintų mažiausiai du nauji 3' galai; (b) pailginimą (ekstensiją) vieno ar daugiau iš dviejų naujų 3' galų tam tikslui panaudojant DNR polimerazę; (c) (b) pakopoje gauto ekstensijos produkto nikuojantį (viengrandininį) skaidymą; (d) (c) pakopoje gauto nikuojančio skaidymo produkto pailginimą, amplifikuojant bent dalį viengrandinės taikinės nukleino rūgšties.

Šiame išradimo įgyvendinime pateiktas būdas, kaip greitai atrinkti nikuojančių fermentų variantus, panaudojant ląsteles-šeimininkes ir kultivavimo terpę DNR nikavimo reakcijoje, kai naudojama superspiralinė DNR kaip substratas.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 parodyta norimo gauti baltymo sukūrimo, skirto vietai specifinių ir grandinei specifinių DNR nikuojančių fermentų gavimui, bendra schema.

Fig. 2 parodyti DNR nikuojančių variantų skryningo rezultatai, kur panaudotos ląstelių kultūros, gautos per naktį kultivavus mutantus. Panaudojant elektroforezę agarozės gelyje ištirta 40 izoliatų (1-40). #11 ir #26 izoliatai (11 ir 26 takeliai) rodo nikuojantį aktyvumą. #36 ir #40 izoliatai (36 ir 40 takeliai) rodo tiek nikuojantį, tiek ir dsDNR skaidantį aktyvumą. N, nikuota žiedinė DNR; L, linijinė DNR; S, superspiralinė DNR.

Fig. 3 parodyti izoliatų nikuojančio aktyvumo, analizuoto elektroforezės agarozės gelyje būdu, skryningo rezultatai.

Fig. 3A: Nt.BsaI (K150R/R2236G) DNR nikuojantis aktyvumas naudojant superspiralinę DNR kaip substratą. Nt - viršutinės grandinės nikavimas. N – nikuota žiedinė DNR; L – linijinė DNR; S – superspiralinė DNR. 1 takelis – 1 kb DNR masės žymuo; 2 – neskiestas ląstelių ekstraktas; 3-10 takelis – ląstelių ekstrakto dukartiniai serijiniai skiedimai; 11 takelis – superspiralinė pUC19 DNR.

Fig. 3B: Nt.BsaI (R236D) DNR nikuojantis aktyvumas naudojant superspiralinę DNR kaip substratą. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2 takelis – neskiestas ląstelių ekstraktas; 3-10 takelis – ląstelių ekstrakto dukartiniai serijiniai skiedimai; 11 takelis – pUC19 substratas; 12 takelis – N.BstNBI. N – nikuota žiedinė DNR; L – linijinė DNR; S – superspiralinė DNR.

Fig. 4 parodyta, kaip DNR nikavimo saitas gali būti nustatytas panaudojant “run-off” sekvenavimą Nt.BsaI (R236D) nikavimo saito nustatymui.

5' GGTCTCN[^]NNNN 3' (SEQ ID NO: 1)

3' CCAGAGNNNNN 5'

Nikuotos žiedinės DNR produktas buvo gelyje išvalytas ir pateiktas “run-off” sekvenavimui. Taq DNR polimerazė prikabina adenino (A) bazę prie DNR galo (nuo matricos nepriklausomas DNR transferazinis aktyvumas).

Fig. 5 parodyti izoliatų nikuojančio aktyvumo skryningo rezultatai.

Fig. 5A: Nt.BsaI DNR nikuojantis aktyvumas naudojant kaip substratą superspiralinę DNR. Nb rodo nikuojantį aktyvumą apatinei grandinei. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2-9 takelis – ląstelių ekstrakto dukartiniai serijiniai skiedimai nuo 4 iki 512; 10 takelis – nN.BstNBI; 11 takelis – pUC19 DNR; 12 takelis – BsaI skaidyta DNR. N – nikuota žiedinė DNR; L – linijinė DNR; S – superspiralinė DNR.

5B paveikslas: DNR nikuojančio aktyvumo tyrimai naudojant ląstelių ekstrakto 10-kartinius serijinius skiedimus. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2-6 takelis – BsaI variantas N441D/R442G; 7-11 – BsaI Δ(446-544); 12-16 – BsaIΔ(440-544); 17-19 takelis – ekstraktai, paruošti iš ląstelių, turinčių pUC19. 20 takelis – BsaI skaidyta pUC19. 1, 7, 12, ir 17 takelis – neskiesti ląstelių ekstraktai; 3-6, 8-11, 13-16, 18-19 - 10-kartiniai serijiniai ląstelių ekstraktų skiedimai.

Fig. 6 parodyta, kaip “run-off” sekvenavimas buvo panaudotas Nb.BsaI nikavimo saito nustatymui.

5' GGTCTCNNNNN 3' (SEQ ID NO: 1)

3' CCAGAGNNNNN^ 5'

Nikuota žiedinė DNR buvo gelyje išvalyta ir pateikta “run-off” sekvenavimui. Taq DNR polimerazė prikabina adenino (A) bazę prie DNR galo (nuo matricos nepriklausomas DNR transferazinis aktyvumas).

Fig. 7 parodytos amino rūgščių pakaitų vietos, esančios BsaI, kurių dėka įgytas DNR viengrandinio skaidymo aktyvumas. * rodo nenupieštas aminorūgščių pakaitų vietas. Pilno ilgio BsaI endonukleazė turi 544 aminorūgščių liekanas. Δ rodo iškritis.

Fig. 8 parodytas BsaI ir BsmBI restrikcijos endonukleazių aminorūgščių sekų išsidėstymo palyginimas, gautas naudojant GCG “Bestfit” programą. Kritinės Arg @ liekanos pažymėtos užjuodintai ir pabrauktos. Dviejų baltymų identiškos aminorūgščių liekanos pažymėtos tiesia linija. Panašių ypatumų aminorūgščių liekanos pažymėtos 1 arba 2 taškeliais. Viršutinė seka = BsmBI aminorūgščių sekai (SEQ ID NO:31). Apatinė seka = BsaI aminorūgščių sekai (SEQ ID NO:32).

Fig. 9 parodyti izoliatų nikuojančios aktyvumo skryningo rezultatai, gauti elektroforezės agarozės gelyje būdu.

Fig. 9A: Nb.BsmBI (R438D) DNR nikuojantis aktyvumas. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2 takelis – 1x ląstelių ekstraktas; 3-9 takelis – ląstelių ekstrakto 2-kartiniai serijiniai skiedimai (1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, ir 1/128); 10 takelis – pBR322 DNR; 11 takelis – BsmBI skaidyta pBR322 DNR; 12 takelis – N.BstNBI nikuota pBR322. N – nikuota žiedinė DNR; L – linijinė DNR; S – superspiralinė DNR.

Fig. 10 parodyta, kaip “run-off” sekvenavimas gali būti panaudotas Nt.BsmBI nikavimo saito nustatymui.

Nt.BsmBI nikavimo saitas:

5' CGTCTCN^NNNN 3' (SEQ ID NO: 2)

3' GCAGAGNNNNN 5'

Fig. 11 parodyta, kaip “run-off” sekvenavimas gali būti panaudotas Nb.BsmBI nikavimo saito nustatymui.

Nb.BsmBI nikavimo saitas:

5' CGTCTCNNNNN 3' (SEQ ID NO: 2)

3' GCAGAGNNNNN^ 5'

Fig. 12 parodytas BsaI ir BsmAI restrikcijos endonukleazijų amino rūgščių sekų išsidėstymo palyginimas, gautas naudojant GCG “Bestfit” programą. Kritinės Arg (R) liekanos pažymėtos užjuodintai ir pabrauktos. Dviejų baltymų identiškos aminorūgščių liekanos pažymėtos tiesia linija. Identiškos abiemis baltymams aminorūgščių liekanos pažymėtos tiesia linija. Panašių ypatumų aminorūgščių liekanos pažymėtos 1 arba 2 taškeliais. Viršutinė seka = BsmAI aminorūgščių sekai (SEQ ID NO:37). Apatinė seka = BsaI amino rūgščių sekai (SEQ ID NO:37).

Fig. 13 parodyti izoliatų nikuojančios aktyvumo skryningo rezultatai, gauti elektroforezės agarozės gelyje būdu.

Fig. 13A: Nt.BsmAI (R221D) DNR nikuojantis aktyvumas. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2, 3 takelis – µl, ląstelių ekstraktas; 3-9 takelis – µl, ląstelių ekstrakto 2-kartiniai serijiniai skiedimai; 10 takelis – neskaidytos pBR322 DNR substratas; 11 takelis – BsmAI skaidymas; 12 takelis – N.BstNBI.

Fig. 13B: Nb.BsmAI (N415D/R416G) DNR nikuojantis aktyvumas. 1 takelis - 1 kb DNR masės žymuo; 2, 3 takelis – µl, ląstelių ekstraktas; 3-9 takelis – µl, ląstelių ekstrakto 2-kartiniai serijiniai skiedimai; 10 takelis – neskaidytos pBR322 DNR substratas; 11 takelis – BsmAI skaidymas; 12 takelis – N.BstNBI.

Fig. 14 parodyta, kaip “run-off” sekvenavimas gali būti panaudotas Nt.BsmAI (R221D) nikavimo saito nustatymui.

Nt.BsmAI nikavimo saitas:

5' GTCTCN^NNNN 3' (SEQ ID NO: 3)

3' CAGAGNNNNN 5'

Fig. 15 parodyta, kaip “run-off” sekvenavimas gali būti panaudotas Nb.BsmAI nikavimo saito nustatymui.

BsmAI nikavimo saitas:

5' GTCTCNNNNN 3' (SEQ ID NO: 3)

3' CAGAGNNNNN^ 5'

Fig. 16 parodytas N.BsmAI variantų, išskirtų panaudojant atsitiktinę mutagenezę, nikuojantis aktyvumas ir jų genetinis skryningas elektroforezės agarozės gelyje būdu. 2-4

takelis – N.BsmAI izoliato #40 1x, 1/10, 1/100 ląstelių ekstrakto skiedimai; 5-7 takelis – N.BsmAI izoliato #48 1x, 1/10, 1/100 ląstelių ekstrakto skiedimai; 8-10 takelis – N.BsmAI izoliato #55 1x, 1/10, 1/100 ląstelių ekstrakto skiedimai; 11-13 takelis – N.BsmAI izoliato #101 1x, 1/10, 1/100 ląstelių ekstrakto skiedimai; 14-16 takelis – N.BsmAI izoliato #197, 1x, 1/10, 1/100 ląstelių ekstrakto skiedimai; 17 takelis – pBR322 DNR; 18 takelis – BsmAI skaidyta pBR322; 19 takelis – N.BstNBI nikuota pBR322.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Išradime aprašyta sukūrimo būdo strategija apima restrikcijos endonukleazės atsitiktinę mutagenę ir mutantų rinkinio (bibliotekos) sukūrimą. Strategijos pavyzdys gali būti geno, koduojančio IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės, turinčias asimetrines atpažinimo sekas, panaudojimas. Svarbu, kad naudojant šį būdą, galima kurti nikuojančias endonukleazes be išankstinio baltymo sandaros ir aktyvių saitų žinojimo. Tuo atveju, jei mutacijos inaktyvuoja restrikcijos endonukleazės dvigubą DNR skaidantį aktyvumą, tai bet kuriam iš fermentų nebėra apribojimų dėl mutacijos padėties pirmenybės. Restrikcijos endonukleazės skaido dsDNR (dvigrandininę DNR) ir yra toksiškos ląstelėms, stokojančioms fermento skaidymo saitų apsauginio metilino. Todėl, kuomet mutantinių restrikcijos endonukleazių genų rinkinys (biblioteka) transformacijos būdu yra perduodamas į šeimininę, neturinčią savosios DNR apsauginės modifikacijos aktyvumo, tokios ląstelės po transformacijos DNR, koduojančia aktyvias restrikcijos endonukleazes, nebeišgyvena ir to pasekoje visi likę genai, koduojantys labai aktyvius alelius, yra pašalinami iš mutantų pulo.

Po to gauti endonukleazių genų mutantiniai ir laukinio tipo pulai yra restrikciškai skaidomi tam, kad būtų gauti endonukleazių genų fragmentai. Nors pagal išradimo aprašymą galima mutantinius ar laukinio tipo endonukleazių genus skaidyti į daugiau nei du fragmentus, tačiau labiau pageidautinas yra endonukleazės geno skaidymas į du fragmentus. Genas gali būti suskaidytas panaudojant restrikcijos endonukleazę ir suskyla į dvi dalis, kur šių dalių procentinis santykis gali svyruoti nuo 5/95 iki 50/50, pavyzdžiui, 50/50, 55/45, 60/40, 65/35, ar 70/30.

Mutantinių ar laukinio tipo genų skaidymo saito lokalizacija gali varijuoti nuo centrinės padėties, kuomet skaidant gaunami du maždaug vienodo dydžio fragmentai, iki asimetrinės padėties, kuomet skaidant gaunami du skirtingo dydžio fragmentai. Tačiau pageidautina, kad fragmente išliktų nikavimo ar jungimosi specifiskumo domenai. Tokiu būdu, labiau pageidautina yra skaidymo vietos centrinė padėtis nei periferinė.

Po to mutantinis fragmentas yra rekombinuojamas arba liguojamas su laukinio tipo fragmentu, kad būtų gautas genas, koduojantis veiklią nikuojančią endonukleazę. Vienas iš privalumų, gaunamų sukūrus laukinio tipo ir mutagenizuotų fragmentų pulą, yra tai, kad tuo sumažinamas mutacijų poveikis endonukleazės aktyvumui ir leidžiama endonukleazės reaktyvacija. Būdo aprašyme pirmenybė teikiama tam, kad *in vitro* rekombinacija atliekama po restrikcijos endonukleazės atsitiktinės mutagenezės, kur beveik pusė mutagenizuotų (inaktyvuotų) alelių ir laukinio tipo (wt) koduojančių sekų yra rekombinuojami *in vitro* restrikcijos fragmento mainų ir ligavimo būdu.

Ląstelė-šeimininkė, apsaugota modifikuojančiomis, yra transformuojama, panaudojant liguotą DNR, kuri geriau, kad būtų plazmidėje arba vektoriuje. Svarbu, kad čia parodyta, kad visa ląstelių kultūra (ląstelės plius kultivavimo terpė) arba ląstelių lizatai gali būti tiriami skryningo būdu ieškant individualių transformantų DNR nikuojančio aktyvumo, kad būtų išgauti norimi kandidatai. Mutantinius alelius galima sekvenuoti ir identifikuoti genetines mutacijas ir aminorūgščių pakaitas. Papildomai, optimizuoto nikuojančio aktyvumo variantai gali būti sukurti panaudojant sait-nukreiptą mutagenezę tų liekanų, kurios prieš tai skryningo metu buvo identifikuotos.

Hibridinė restrikcijos endonukleazė yra atrenkama pagal tai, kaip ji esminiai sugeba skaidyti specifinėje vietoje ir/arba pagal jos skaidymo specifiškumą grandinei. Nikuojančio skaidymo tikslu nebūtina, kad dvigubos DNR 100% tik viena grandinė būtų skaidoma, nei, kad tik 0% antrosios grandinės būtų skaidoma. Tačiau pageidautina, kad būtų pasiektas kuo didesnis nikuojančio skaidymo aktyvumo procentas, toks kaip 95% ar daugiau.

Sekantys terminai yra aprašyti, atsižvelgiant į jų naudojimą išradimo aprašymo pirmenybiniuose variantuose.

Terminu "sintetinė nikuojanti endonukleazė" nurodoma modifikuota rekombinantinė nikuojanti endonukleazė, kuri yra fragmentų mainų tarp DNR, koduojančios laukinio tipo ir mutagenizuotą restrikcijos endonukleazę, produktas. Sintetinė nikuojanti endonukleazė skiriasi nuo gamtinio nikuojančio antrininko mažiausiai viena aminorūgštimi. Sintetinė nikuojanti endonukleazė gali būti toliau skiriama nuo nikuojančios endonukleazės, sukurtos pagal būdą, aprašytą US patento paraiškoje 2003-148275, atsitiktine mutacija fermento C-gale, dar tiksliau, iškritos (delecijos) mutacija C-gale aa tarpiniame rajone.

Terminu baltymo "C-terminalinis galas" nurodoma pusė baltymo sekų, prasidedančių nuo paskutinės C-terminalinės aminorūgšties. Panašiai, N-terminalinis galas atitinka pusę baltymo sekų, prasidedančių nuo paskutinės N-terminalinės aminorūgšties.

Terminu “mutacija” nurodoma iškrita (delecija), įtarpa (insercija) aa aminorūgščių pakaita. Mutacija gali apimti vieną aa daugiau amino rūgščių tam tikroje baltymo vietoje ir, be to, tai gali nutikti ir daugelyje vietų.

Terminu “genas” nurodoma nukleino rūgščių seka, koduojanti baltymą arba peptidą.

Terminu “restrikcijos endonukleazė” nurodoma atitinkamame kontekste minimi aktyvūs, neaktyvūs fermentai.

Terminu “inaktyvuota”, kai naudojamas restrikcijos endonukleazių atžvilgiu, nurodomos restrikcijos endonukleazės, kurios nėra toksiškos ląstelėms-šeimininkėms, turinčioms nemodifikuotą DNR.

Žemiau pateikiamas nikuojančių endonukleazių sukūrimo būdo pirmenybinės eigos aprašymas.

1. Panaudojant restrikcijos endonukleazės geno atsitiktinę mutagenezę, sukuriamas mutantinių endonukleazių rinkinys (biblioteka), tam tikslui panaudojant, pavyzdžiui, linkusią klysti atvirkštinę PGR. Mutagenizuota DNR yra transformuojama į *E. coli* apsauginių metilazių nebuvimo sąlygomis. DNR iš išgyvenusių kolonijų yra surenkama ir amplifikuojama (pagausinama) tam, kad būtų sukurtas mutantinių plazmidžių, turinčių inaktyvuotą endonukleazių genus, rinkinys (biblioteka). Klonuoti endonukleazių genai, esantys išgyvenusiose ląstelėse, funkcinio požiūriu yra neveiklūs, apie tai galima spręsti iš ląstelių išgyvenimo nesant apsauginio metilinimo.

2. *In vitro* atgalinis kryžminimas yra atliekamas su laukinio tipo genu, kur fragmentai iš mutagenizuoto pulo pakeičia atitinkamą geno laukinio tipo segmentą. Tai galima pasiekti: restrikcinio skaidymo būdu padalinant mutagenizuotą geną į du fragmentus; išvalant restrikcijos fragmentus gelyje; liguojant mutagenizuotą N-terminalinę koduojančią seką su laukinio tipo C-terminaline koduojančia seka; ir transformuojant liguotą DNR į *E. coli* kaip šeimininkę esant apsauginėms metilazėms (gimininga ir negimininga metilazė).

3. Nikuojančių endonukleazių aptikimui atliekamas skryningas. Pavyzdžiui, individualių transformantų ląstelių kultūrų ar ląstelių ekstraktų nikuojančių fermentų aktyvumas gali būti nustatytas panaudojant atitinkamus DNR substratus, tokius kaip superspiralinė DNR.

4. Nikuojančio fermento aktyvumo optimizacija gali būti pasiekta naudojant jame identifikuotų aminorūgščių sait-nukreiptą mutagenezę, nurodytą (3). Tuo būdu galima gauti variantus, turinčius skirtingas aminorūgščių pakaitas ir pasižyminčius optimizuotu nikuojančio fermento aktyvumu ir minimaliu dvigrandininiu DNR skaidymu. Gali būti identifikuotos giminingų endonukleazių aminorūgščių liekanos, kurios po taikininės

mutagenizės predeterminuotoje pozicijoje įtakoja nikuojantį aktyvumą, ir tokiu būdu sukuriamas aukštesnės kokybės nikuojantis fermentas.

Aminorūgščių pakaitai, paveikiantys nikuojantį aktyvumą, nurodyti (3) ir (4) aukščiau, gali būti įterpti į izoizomerus, neoizomerus ar fermentus, turinčius giminingą atpažinimo seką ir panašią aminorūgščių sekų sudėtį.

Aukščiau aprašyti būdai buvo panaudoti nikuojančios endonukleazės sukūrimui iš IIS tipo restrikcijos endonukleazės BsaI (1 pavyzdys). BsaI variantai buvo išskirti ir nustatyti aminorūgščių pakaitai. Rasta, kad šie variantai pasižymi nikuojančiu aktyvumu, kuris daugiausia pasireiškia sukeldamas trūkius dvigubos DNR viršutinėje ar apatinėje grandinėje (viršutinę ir apatinę grandinę nikuojantys fermentai buvo pavadinti atitinkamai Nt.BsaI ir Nb.BsaI).

Atitinkami aminorūgščių pakaitai buvo įterpti į IIS tipo restrikcijos endonukleazės BsmBI ir BsmAI, turinčias panašias DNR atpažinimo sekas ir taip pat panašias aminorūgščių sekas. 2 pavyzdyje buvo išskirti BsmBI nikuojantys fermentai, kurie daugiausiai sukeldavo trūkius viršutinėje ar apatinėje grandinėje (viršutinę ir apatinę grandinę nikuojantys fermentai buvo pavadinti atitinkamai Nt.BsmBI ir Nb.BsmBI). Nt.BsmBI ir Nb.BsmBI fermentai buvo panašiai sukurti panaudojant sait-nukreiptą mutagenizę, pagrįstą žiniomis apie N.BsaI nikuojančių variantų mutacijas. Be to, 3 pavyzdyje N.BsmAI variantai buvo išskirti panaudojant aukščiau aprašytą sait-nukreiptą mutagenizę ir genetinio skryningo metodą.

Atsitiktinė mutagenizė

Atsitiktinė mutagenizė gali būti pasiekta panaudojant bet kurį žinomą metodą (Heitman, J. Ir Model, P., *EMBO J.* 9:3369-3378 (1990)). Pavyzdžiui, restrikcijos endonukleazės genas gali būti mutagenizuotas veikiant cheminiu mutagenu (natrio bisulfitu, NH_2OH , nitrozoguanidinu ir kt.), ar paveikiant mutatoriniu kamieniu (MutD⁻/MutH⁻/MutS⁻, pasižyminiu klaidingo poravimo DNR reparacijos defektu) arba veikiant ląsteles, turinčias taikininį geną UV arba γ -spinduliuote, arba paveikiant kamieniu, kurio DNR polimerazė pasižymi taisyklingo skaitymo defektu. Kaip alternatyvą kiekvienas, mokantis atitinkamą metodą, gali panaudoti Ala skenavimą pakeičiant IIA/IIS tipo endonukleazės baltyme svarbias liekanas, tokias kaip Asp, Glu, Lys, Arg liekanas, į Ala, ir po to atliekant mutantinių ląstelių ekstraktų DNR nikuojančio aktyvumo skryningą. Taip pat galima mutagenizuoti taikininį geną atvirkštinės PGR būdu, linkusios klysti PGR būdu ar kitais, PGR pagrįstais mutagenizės metodais, panaudojant juos po vieną ar derinant, liguoti PGR produktą su

klonavimo vektoriumi ir tada transformuoti liguotą DNR į šeimininę tam, kad būtų sukurtas mutantinių plazmidžių DNR rinkinys (biblioteka).

Mutagenizuotos DNR klonavimas ir ekspresijos analizė

Po PGR mutagenizės mutagenizuota plazmidinė DNR gali būti paveikta DpnI, skaidančiu Dam-metilintą matricinę DNR. Po to DNR yra transformuojama į *E. coli* kaip į ekspresijos šeimininę giminingų ar negiminingų metilazių apsaugos nebuvimo sąlygomis. Aktyvūs mutantai, pasižymintys dsDNR skaidymo aktyvumu, yra eliminuojami, kadangi jie dėl didelio DNR pakenkimo užmuša šeimininę. Mažo aktyvumo mutantai, nuliniai mutantai, nikavimo mutantai, mutantai su skaidymo defektu ir galintys jungtis atsiduria tarp išgyvenusių transformantų. Visi transformantai yra surenkami, amplifikuojami ir paruošiama plazmidinė DNR tam, kad būtų sukurtas plazmidinės DNR rinkinys (biblioteka). Kaip alternatyvą galima panaudoti individualių transformantų nikuojančio aktyvumo skyrinę ląstelių kultūrose ar ląstelių ekstraktuose tam tikslui naudojant aukšto ištisinio skyringo sistemą.

Mutagenizuoto geno skaidymas ir rekombinacija su skaidyto laukinio tipo geno fragmentu

Mutagenizuotas genas gali būti suskaidytas į du ar daugiau fragmentų ir atgaliniai sukryžmintas. Vienas būdas tai atlikti yra restrikcijos fragmentų mainai ir kitas būdas – panaudoti PGR. Plazmidės DNR yra skaidoma panaudojant dvi restrikcijos endonukleazes, vienas fermentas skaido endonukleazės geną į norimus fragmentus ir kitas fermentas skaido vektorių (pageidautina, kad tai būtų plazmidės replikacijos rajone). Tie patys fermentai taip pat skaido laukinio tipo (wt) plazmidę į fragmentus. Skaidymo situs restrikcijos gene nebūtinai turi būti tiksliai endonukleazės geno viduryje. Tikslus skaidymo taškas priklauso nuo esamų restrikcijos saitų pačiame gene. Po restrikcinio skaidymo restrikcijos fragmentai yra išvalomi gelyje panaudojant žemo lydimosi agarozės gelį. wt N-terminalinė koduojanti seka yra jungiama su mutagenizuota C-terminaline koduojančia seka. Atitinkamai, mutagenizuota N-terminalinė koduojanti seka yra jungiama su mutagenizuota wtC-terminaline koduojančia seka. DNR fragmentai yra liguojami ir pernešami į ekspresijos šeimininę apsauginio metilinimo sąlygomis, esant giminingai ar negiminingai metilazei. Jeigu nikuojančio fermento aktyvumas nėra letalus šeimininkei arba, jeigu nikuojančio fermento ekspresija yra labai kontroliuojama (represuota), gali ir nereikėti metilazių apsaugos. Elektroporacija – tai pirmenybinis transformacijos atlikimo būdas. Tačiau, transformacijai taip pat galima naudoti ir didelio efektyvumo chemiškai kompetentingas ląsteles.

Atgalinio kryžminimo su wt koduojančia seka alternatyvus metodas yra lokalizuotos atsitiktinės mutagenezės būdas, kurią atlikus liguojamas, pakeičiant wt restrikcijos fragmentą, mutagenizuotas DNR fragmentas. Be to, galima mutagenizuoti dalį koduojančios sekos linkusią klysti PGR būdu ir po to liguoti mutagenizuotą fragmentą prie likusio wt DNR fragmento.

Nikuojančio aktyvumo įvertinimas

Individualūs transformantai gali būti kultivuojami per naktį kaip mažos apimties kultūra (pavyzdžiui, 1-10 mls). Į ląstelių kultūrą plazmidžių atrankai pridedama atitinkamų antibiotikų. Visa ląstelių kultūra (ląstelės plus terpė) yra naudojama tiesiogiai vertinant individualių mutantų nikuojantį aktyvumą panaudojant superspiralinę DNR kaip substratą. Kai kurios *E. coli* ląstelės yra lizuojamos ir jų fermentai išlaisvinami į reakcijos mišinį. Kaip alternatyva, ląstelių nuosėdas galima resuspenduoti ultragarsinio ardymo ar lizės buferyje. Ląsteles galima lizuoti ultragarsu, veikiant lizozimu, detergentu ar užšaldymu-atšildymu. Kuomet ląstelių kultūroje aptinkamas nikuojantis aktyvumas, po to nikuojantį aktyvumą galima patvirtinti panaudojant ultragarsu suardytus ir nuskaidrintus ląstelių ekstraktus.

Mutantinio alelio sekų nustatymas (sekvenavimas)

Kuomet patvirtinamas nikuojantis fermento aktyvumas, galima sekvenuoti visą mutantinio alelio seką, pavyzdžiui, panaudojant didezoksi-terminatorinį sekvenavimą. Po to yra identifikuojama genetinė mutacija ir aminorūgščių pakaitos. Jeigu tame pačiame baltyme randamos daugybinės aminorūgščių pakaitos, individualių amino rūgščių pakeitimus galima segreguoti panaudojant sait-nukreiptą mutagenzę ir galima įvertinti kiekvieną atskirą mutantą jo DNR nikuojančio aktyvumo atžvilgiu.

Variantų, pasižyminčių nikuojančiu aktyvumu, optimizacija

Kai kuriais atvejais variantai, pasižymintys nikuojančiu aktyvumu, taip pat pasižymi ir silpnu dsDNR skaidymu. Tam, kad būtų optimizuotas nikuojantis aktyvumas, identifikuotą amino rūgšties (aa) liekaną galima paveikti panaudojant sait-nukreiptą prisotinimo mutagenzę, ir tuomet išskirti variantus, kurių kiekvienas turi vieną ar daugiau likusių 18 aa pakaitų. Po to palyginamas visų mutantų DNR nikuojantis aktyvumas. Geriausi nikuojantys variantai, pasižymintys minimaliu dsDNR skaidymo aktyvumu, yra atrenkami. Kai kuriais atvejais dvi ar daugiau aa pakaitų reikia tam, kad būtų pasiektas optimalus nikuojantis aktyvumas ir maksimalus specifinis aktyvumas. Kitais atvejais sutrumpinti mutantai (C-terminalinės iškritos (delecijos) mutantai) taip pat pasižymi DNR nikuojančiu aktyvumu. Panašu, kad dvi aa pakaitos su daliniais efektais gali būti pirmą kartą identifikuotos dviejuose

skirtinguose mutantuose. Kuomet dvi aa pakaitos susiderina viename mutante, tuomet kombinuotos mutacijos gali sąlygoti labai aktyvų nikuojantį fermentą.

Nikuojantis fermentas dalinai išvalomas chromatografinėje kolonėlėje (pavyzdžiui, afiniškumo kolonėlėje, jonų mainų kolonėlėje) ir po to naudojamas atitinkamos superspiralinės DNR kaip substrato nikavimui. Po to suskaidyta DNR yra tiriama "run-off" sekvenavimo būdu tam, kad būtų nustatyta nikuota grandinė. Baltymo valymo palengvinimui baltymo (peptido) tags, tokios, kaip His tags, chitiną-jungiančio domeno tags ar maltozę-jungiančio domeno tags, prijungiamos prie nikuojančių fermentų C-galo. Sulietas baltymas išskiriamas afiniškumo kolonėlėje ir po to tags gali būti pašalintos paveikiant proteaze ar skaidant baltymą.

Ląstelės-šeimininkės

Nikuojančių fermentų variantų skryningui bakterinės šeimininkės neapsiriboja vien tik *E. coli*. Bakterijos-šeimininkės tokios, kaip *Bacillus* ir *Pseudomonas*, gali būti irgi panaudotos drauge su atitinkamais klonavimo/ekspresijos vektoriais tam, kad būtų gautas pakankamas DNR transformacijos ar elektroporacijos efektyvumas. Termofiliniams fermentams gali būti naudojama *Thermus thermophilus* šeimininkės ir *Thermus-E. coli* pernešimo vektorius (Wayne, J. Ir Xu, S.-y., *Gene* 195: 32328 (1997)). Nikuojančių fermentų išskyrimui naudojamus genetinio skryningo būdus galima panaudoti ir kitiems DNR skaidantiems fermentams tokiems, kaip fago terminazė, transpozazė, rekombinazė, integrazė, intron-koduota endonukleazė ar intein-koduota endonukleazė.

Aprašytasis pirmenybinis būdas, kaip IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazę, BsaI, perdaryti į grandinei specifinį nikuojantį fermentą, apėmė šias pakopas:

1. bsaIR genas (pUC-BsaIR) buvo mutagenizuotas panaudojant linkusią klysti atvirkštinę PGR (25 ciklai). PGR produktas buvo suskaidytas panaudojant XhoI ir DpnI ir suliguotas. Liguota DNR transformacijos būdu pernešta į *E. coli* ER2566 kompetentines ląsteles. Mutantų bibliotekoje gauta apie 2,926 išgyvenusių transformantų. Mutantinių plazmidžių DNR išskirta Qiagen kolonėlėje.

2. Panaudojus PstI ir BseYI, mutagenizuotos plazmidės ir wt plazmidė buvo suskaidytos. PstI lokalizuotas bsaIR geno viduryje ir BseYI yra pUC ColEI replikacijos origin rajone. Du restrikcijos fragmentai išskirti gelyje ir apkeisti su atitinkamais wt fragmentais, liguoti ir elektroporacijos būdu pernešti į *E. coli* kaip į ekspresijos šeimininkę. Šeimininkė-recipientė turėjo BsmAI metilazę (M.BsmAI), apsaugančią šeimininkės DNR.

3. Penki ml per naktį augintos ląstelių kultūros buvo gauti individualius transformantus kultivuojant LB plius Ap ir Cm sąlygomis, 37⁰ C temperatūroje, purtyklėje.

Lėtai centrifuguojant gautos ląstelių nuosėdos. Dešimt ml ląstelių kultūros panaudota mg superspiralinės pUC19 DNR skaidymui (nikavimui). Kuomet ląstelių kultūroje buvo aptiktas DNR nikuojantis aktyvumas, ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos ultragarsu. Lizatai buvo nuskaidrinti ir po to panaudoti nikuojančių fermentų aktyvumo ląstelių ekstrakte patvirtinimui. Iš viso skryningo būdu ištirtas 271 mutanto DNR nikuojantis aktyvumas. Penki mutantai pasižymėjo nikuojančiu aktyvumu tiek ląstelių kultūroje, tiek ir ląstelių ekstraktuose. Šiuose penkiuose nikuojančiuose variantuose buvo sekvenuoti *bsaIR* aleliai. Skryningo metu buvo taip pat nustatyti keli klaidingai pozityvūs variantai. Pradžioje buvo aptiktas nikuojantis aktyvumas ląstelių kultūroje, tačiau nerasta nikuojančio aktyvumo pėdsakų ląstelių ekstraktuose. Šie klaidingai pozityvūs variantai buvo eliminuoti ir toliau netyrinėti.

4. Nikuojančio fermento B3 variantas turi aa pakaitas K150R ir R236G. Kitas nikuojančio fermento B36 variantas taip pat turi aa pakaitas S128L ir R236G. Padaryta išvada, kad R236G yra labiausiai tinkama aa pakaita, turinti įtakos nikuojančiam aktyvumui. Kadangi dvigubi mutantai, K150R/R236G (3A pav.), S128L/R236G, ir viengubas mutantas R236G be nikuojančio aktyvumo dar pasižymi tam tikru liekamuoju dsDNR skaidymo aktyvumu (~10%), panaudojus sait-nukreiptą mutagenezę, buvo sukurtas kitas viengubas mutantas R236D. Fig. 3B parodyta, kad BsaI variantas R236D daugiausiai nikuoja superspiralinę DNR. Nikuotos DNR produktai buvo panaudoti kaip matrica "run-off" sekvenavime nikuotai grandinei nustatyti. Fig. 4 parodyta, kad jis skaido viršutinę grandinę ir tai rodo staigus sekvenavimo signalo sumažėjimas už nikuotos (trūkio) vietos. Todėl N.BsaI variantas R236D buvo pavadintas Nt.BsaI.

5. Nikuojančio fermento variantas A11 turi du aa pakaitus N441D ir R442G. N441D/R442G DNR nikuojantis aktyvumas parodytas fig. 5A. N441D ir R442G aa pakitimai buvo atskirti sait-nukreiptos mutagenezės būdu tam, kad būtų sukurti viengubi mutantai, turintys arba N441D, arba R442G. Varianto N441D dsDNR skaidymo aktyvumas panašus į wt fermento. R442G be nikuojančio aktyvumo dar pasižymi ir kai kuriuo dsDNR skaidymo aktyvumu. Todėl dvi aa pakatos gali veikti sinergistiniu būdu, j pasiekdamos didelį nikuojantį aktyvumą. Nikuotos DNR produktas buvo panaudotas kaip matrica "run-off" sekvenavime nikuotai grandinei nustatyti. Fig. 6 parodyta, kad BsaI variantas R442G. N441D/R442G skaido apatinę grandinę ir todėl jis buvo pavadintas Nb.BsaI R442G. Viršutinę grandinę lieka nepaliesta ir generuoja normalią DNR seką.

6. Nikuojančio fermento skryningo metu rasta, kad BsaI iškritos (delecijos) variantai taip pat pasižymėjo DNR nikuojančiu aktyvumu. Du iškritos variantai atsirado dėl prasmnio

kodono mutacijos į stop kodoną. Izoliatai A26 Leu446 kodonas buvo mutavęs į stop kodoną (UUA į UAR). Todėl BsaI aa seka po 446 buvo iškritusi izoliatai A26 $\Delta(446-544)$. Izoliatai A57 Glu440 kodonas buvo mutavęs į stop kodoną (GAR į UAR). Todėl aa seka po 440 yra iškritusi mutante A57 $\Delta(440-544)$. "run-off" sekvenavimo metu buvo nustatyta, kad delecijos variantas A57 sukelia trūkį apatinėje grandinėje.

7. Svarbios aa pakaitos, atsakingos už nikuojantį aktyvumą, gali būti sukeltos izošizomere/neošizomere ir kitose restrikcijos endonukleazėse, jeigu jos turi panašią DNR atpažinimo seką arba turi panašias/identiškas baltymų aa sekas. Ištyrus aa sekas, homologiški rajonai rasti tarp BsaI, BsmAI ir BsmBI. Tos pačios aa pakaitos, sukeltos BsmBI, sukūrė Nt.BsmBI ir Nb.BsmBI nikuojančius fermentus. Kuomet tos pačios aa pakaitos buvo sukeltos BsmAI, buvo gauti Nt.BsmAI ir Nb.BsmAI nikuojantys fermentai. Tačiau Nb.BsmAI variantas, gautas atlikus aa liekanų, atitinkančių BsaI nikuojantiems fermentams, sait-nukreiptą mutagenezę, taip pat pasižymėjo ir dsDNR skaidymo aktyvumu. Apibendrinant galima pasakyti, kad svarbios aa pakaitos gali būti sukeltos izošizomeruose ar neošizomeruose, kuomet pastarieji pasižymi dideliu aa sekų panašumu (nuo 15% iki 99% aa sekų panašumo).

Nikuojančių fermentų panaudojimas:

1) Grandinės išstūmimo DNR amplifikacija. Panaudojant nikuojantį fermentą galima sukelti specifinį viengrandininį trūkį taikininėje DNR. Bst polimerazė ar kitos DNR polimerazės gali pradėti naujos grandinės sintezę viengrandininio trūkio vietoje ir išstumti nikuotą grandinę, tuo būdu pagaminant linijinius DNR amplifikacijos produktus.

2) Geno fragmentų surinkimo rekombinantinė DNR technologija. DNR fragmentus galima surinkti, pavyzdžiui, sukeliant išmėtytus trūkius dvigubos DNR viršutinėje ir apatinėje grandinėse tam, kad rastųsi ilgi viengrandininiai (nuo 8 iki 20 nt ilgio). Komplementarūs lipnūs galai gali drauge susijungti. Kadangi fragmentai yra tokie ilgi, todėl dažnai galima praleisti ligavimo pakopą ir susijungusią DNR galima naudoti tiesiogiai transformacijos, elektroporacijos ar transfekcijos veiksams. Nikuojantys fermentai gali būti taip pat naudojami paruošiant viengrandinės DNR galus DNR fragmentų surinkimui į linijinę ar žiedinę formą.

3) Genetinio polimorfizmo nustatymas. Mažus PGR fragmentus galima amplifikuoti iš genominės DNR. Naudojant nikuojantį fermentą, taikinyje sukeliamas viengrandininis trūkis. Po denatūracijos, naudojant aukšto slėgio skystinę chromatografiją, nikuotą produktą galima "perskaityti" masinės spektrometrijos būdu ir nustatyti genetinius pokyčius. Nikuojantys

fermentai gali būti panaudoti onkogeno mutacijų nustatymui, bakterinio ar virusinio patogeno detekcijai.

4) Dvigubos DNR, turinčios viengrandininį trūkį, pakitusio migracinio mobilumo gelyje įvertinimas. Šis ypatumas gali būti panaudotas tiriant skirtingą/diferencinę bazių sangulą (stacking) ir artimiausio kaimyno energetiką (Kuhn, H. ir kt. *Electrophoresis* 23: 2384-7 (2002)).

5) DNR klaidingo poravimo ekscizinė reparacija gali būti tiriama paruošus nikuotą dvigubą DNR ar "skylėtą" DNR (Wang, H.&Hays, J.B., *J Biol Chem* 277: 26136-42 (2002)).

Duotasis išradimas toliau yra iliustruojamas pateikiant sekančius pavyzdžius. Pavyzdžiai pateikiami tuo tikslu, kad išradimas būtų suprantamesnis ir jais nesiekama griežto apribojimo. Suprantama, kad patyrę tyrinėtojai gali daryti nedideles šio išradimo modifikacijas ir variacijas ir gali gauti tą patį rezultatą. Cituoti aukščiau ir žemiau darbai yra įtraukti į nuorodas. Priedo į nuorodas įtraukti Zhu ir kt. *J. Mol. Biol.* 337, 573-583 (2004) ir Samuelson ir kt. *Nucl Acids Res* 32, 3661-3671 (2004)).

PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys. Grandinei specifinių nikuojančių fermentų Nt.BsaI ir Nb.BsaI sukūrimas iš BsaI restrikcijos endonukleazės

1. Mutantinės plazmidžių DNR rinkinio (bibliotekos) sukūrimas

Pirmiausia *bsaIR* genas buvo klonuotas panaudojant pUC19 tam, kad būtų gauta pUC-BsaI. Norint nustatyti wt sekos buvimą, endonukleazės genas buvo sekvenuotas. *bsaIR* genas mutagenizuotas, panaudojant linkusios klysti atvirkštinės PGR keturias atskiras reakcijas ir jas atliekant šiomis sąlygomis: 94⁰ C - 30 sek., 55⁰ C – 30 sek., 72⁰ C – 4 min. 8 sek., 25 ciklai, naudojant Taq DNR polimerazę, pridėjus 2, 4, 6 ar 10 mM MgCl₂, dNTF, pUC-BsaI matricą ir 1x Thermopol buferį. PGR produktai surinkti ir išvalyti Qiagen spin kolonėlėse, suskaidyti panaudojant XhoI ir DpnI. DpnI skaidymo dėka pašalinama Dam-metilinta DNR matrica (laukinis tipas). Po to PGR produktai savaime ligavosi ir elektroporacijos būdu buvo pernešti į *E. coli* kaip ekspresijos šeimininkę, transformantai buvo pasėti Ap lėkštelėse. Recipientinė šeimininkė neturėjo apsauginės metiltransferazės, ir todėl didelio aktyvumo wt fermentas ar mutatinis fermentas užmušė ląsteles-šeimininkes. Tik nuliniai mutantai, mažo aktyvumo mutantai ar mutantai, pasižymintys skaidymo defektu ir geru jungimosi gebėjimu, išgyveno šioje transformacijos pakopoje. Viso gauti 2936 išgyvenę transformantai, kurie buvo

surinkti į bendrą pulą. Plazmidinė DNR išskirta iš ląstelių pulo ir tuo būdu sukurtas mutantinės plazmidžių DNR rinkinys (biblioteka).

2. wt ir mutantinės plazmidžių DNR restrikcinis skaidymas, restrikcijos fragmentų mainai ir ligavimas

wt ir mutantinės plazmidės (~4.1 kb) buvo suskaidytos restrikcijos fermentais PstI ir BseYI. Kadangi PstI lokalizavosi *bsaIR* geno viduryje, todėl, skaidant PstI, endonukleazės genas skilo į du lygius segmentus. BseYI lokalizavosi vektoriaus CoIEI replikacijos ori rajone. Restrikcijos fragmentai buvo išskirti žemos lydymosi temperatūros gelyje ir po to išvalyti Qiagen spin kolonėlėse. wt N-terminalinė koduojanti seka (wt kairė pusė) buvo sujungta su mutagenizuota (inaktyvuota) C-terminaline koduojančia seka (mutantas dešinė pusė) ir liguota panaudojant T4 DNR ligazę. Liguota DNR, panaudojus standartine transformaciją ar elektroporaciją, buvo pernešta į *E. coli* kaip ekspresijos šeimininkę ER2683 [pACYC-BsmAI]. Negimininga metilazė M. BsmAI (atpažinimo seka GTCTC) modifikuoja visus BsaI saitus lygiai taip, kaip ir papildomus giminingus saitus ir todėl suteikia šeimininkės DNR apsaugą. Standartinė transformacija, panaudojant chemiškai kompetentingas ląsteles, duoda mažai transformantų, todėl pirmenybė teikiama elektroporacijai, kaip transformacijos būdui. Transformantai buvo išsėti LB agarą lėkštelėse + Ap ir Cm ir inkubuoti per naktį prie 37^o C temperatūros.

3. Nikuojančių fermentų variantų skryningas ląstelių kultūrose ir ląstelių ekstraktuose

Pavienės kolonijos, atsiradusios po transformacijos buvo išsėtos į 10 ml terpės, turinčios LB + Ap ir Cm, ir augintos per naktį 37 °C temperatūroje. Testuojant nikuojantį aktyvumą (skaidymą), išbandytas dešimties μl totalinės ląstelių kultūros poveikis 1 μg pUC19 superspiralinės DNR. Pozityvios kontrolės variante tas pats substratas veiktas skaidant grandinei specifiniu nikuojančiu fermentu N.BstNBI. Nikuota DNR buvo išanalizuota elektroforezės agarozės gelyje būdu. Kuomet izoliato kultūros terpėje buvo nustatyta nikuota žiedinė DNR, tuomet atitinkamas ląstelių nuosėdų kiekis buvo atšildytas, lizuotas veikiant ultragarsu ir nuskaidrintas centrifuguojant. Ląstelių ekstraktas buvo panaudotas nikuojančio fermento aktyvumo patvirtinimui. Kai kuriais atvejais, kuomet buvo nustatomas didelis nikuojančio fermento aktyvumas, ląstelių ekstraktą reikėjo skiesti serijiniais skiedimais. Pavyzdžiui, 2-kartinis serijinis skiedimas nuo 2-kartų iki 512-kartų buvo atliktas nustatant mutantinio izoliato A11 (Nb.BsaI, N441D/R442G, fig. 5A) nikuojantį aktyvumą. Pirmo skryningo metu ištyrus 160 klonų, rasta, kad 11 klonų pasižymėjo pozityviu nikuojančiu aktyvumu ląstelių kultūroje, ir 3 klonai (A11, A26 ir A57) buvo po to sekvenuoti ir apibūdinti. Antro skryningo metu 6 pozityvūs nikuojantys aktyvumai buvo aptikti ląstelių

kultūrose ir du (B3 ir B36) buvo sekvenuoti ir apibūdinti. Tie, kurie pasižymėjo tam tikru nikuojančiu aktyvumu ląstelių kultūroje, bet nepasižymėjo nikuojančiu aktyvumu ląstelių ekstraktuose, buvo laikomi klaidingai pozityviais ir buvo atmesti. Tie variantai, kurie pasižymėjo tam tikru nikuojančiu aktyvumu ir aktyviu dvigrandininiu DNR skaidymu, buvo taip pat atmesti. Tik tie variantai, kurie pasižymėjo vyraujančiu nikuojančiu aktyvumu buvo sekvenuojami ir toliau tiriami. Sekantys pradmenys panaudoti išties *bsaIR* alelių, koduojančių nikuojančius variantus, sekvenavimui:

S1224S ir S1233S (pUC universalūs įpriekiniai ir atbuliniai pradmenys)

5'CGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA 3' (299-313) (SEQ ID NO:4)

5'GGCAACAATTAATAGACTGGATGG 3' (299-314) (SEQ ID NO:5)

5'TTTGAAATTGATTCACTAGAACAT 3' (299-315) (SEQ ID NO:6)

5'AAGGAAACTTGTTTAAATGATAAC 3' (299-316) (SEQ ID NO:7)

5'AGAGATACAAAATACACTGAAGAG 3' (299-317) (SEQ ID NO:8)

1 lentelė sumuoja mutantinių izoliatų skaičių, bazių mutacijas, aa pakaitas ir nikuojamą grandinę.

1 lentelė. Nikuojančių fermentų variantai, gauti *bsaIR* geno atsitiktinės mutagenezės būdu

Izoliato numeris	Bazės mutacija	aa pakaita	Nikuojiama grandinė
A11	AAC į GAC AGA į GGA	N441D/R442G	Apatinė
A26	UUA į UAA	Stop kodonas 446 Δ(446-544)	Nenustatyta
A57	GAA į UAA	Stop kodonas 440 Δ(440-544)	Apatinė
B3	AAA į AGA AGA į GGA	K150R/R236G	Viršutinė
B36	UCG į UUG AGA į GGA	S128L/R236G	Viršutinė

4. aa liekanų, susijusių su fermento nikuojančiu aktyvumu, sait-nukreipta mutagenezė

Kadangi abu izoliatai B3 ir B36 turi R236G pakaitas, padaryta išvada, kad Arg236 pakaita į Gly gali rodyti, kad ši yra liekana yra atsakinga už nikuojantį fenotipą. Mes pagrindėme, kad šios aminorūgšties (R) konversija į rūgštinę (D) galėtų turėti dar didesnę įtaką nikuojančiam aktyvumui negu Gly pakaita. Asp buvo pasirinkta dėl jos šoninės grandinės neigiamo krūvio. Atlikta sait-nukreipta mutagenezė (atvirkštinė PGR) tam, kad būtų sukurti viengubi mutantai R236G ir R236D. Atvirkštinės PGR pradmenys turi šias sekas:

R236G įpriekinis pradmuo

5' TCATATACAACAGATAGAGGAGCATTTGAATACTGGGTT 3'

(SEQ ID NO:9)

R236G atbulinis pradmuo

5' AACCCAGTATTCAAATGCTCCTCTATCTGTTGTATATGA 3'

(SEQ ID NO:10)

R236D įpriekinis pradmuo

5' TCATATACAACAGATAGAGACGCATTTGAATACTGGGTT 3'

(SEQ ID NO:11)

R236D atbulinis pradmuo

5' AACCCAGTATTCAAATGCGTCTCTATCTGTTGTATATGA 3'

(SEQ ID NO:12)

Atvirkštinės PGR reakcijos atliktos šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min. 8 sek., 20 ciklų, naudojant Vent DNR polimerazę, pridėjus 2, 4, ir 8mM MgCl₂, dNTF, pUC-BsaI matricą ir 1x Thermopol buferį. Amplifikuoti produktai paveikti DpnI tam, kad būtų suskaidyta matricos DNR. Iš transformantų skryningo būdu atrinkti viengubi mutantai, norimai mutacijai patvirtinti mutantai buvo sekvenuoti. Paruošti variantų R236G ir R236D ląstelių ekstraktai ir patikrintas šių variantų grandinei specifinis nikuojantis aktyvumas. Rasta, kad R236D pasižymi vyraujančiu nikuojančiu aktyvumu ir labai mažu dsDNR skaidančiu aktyvumu (fig. 3B). Variantai K150R/R236G (fig. 3A), R236G taip pat nikuoja DNR, bet nedidelė dalis DNR buvo jų skaidoma ir dvigrandinė. Padaryta išvada, kad Arg236 pakaita į Glu ar Gly yra atsakinga už virsmą į nikuojantį fermentą. Šis bandymas parodė, kad po atsitiktinės mutagenezės, skirtos aa liekanų, susijusių su nikuojančiu aktyvumu, identifikavimui, galima daryti išvadą, kad sait-nukreiptą mutagenezę galima naudoti variantų, pasižyminčių optimizuotu grandinei specifiniu, aktyvumu, sukūrimui.

Nikuojantis variantas N441D/R442G turi dvi aa pakaitas. BsaI varianto N441D/R442G nikuojantis aktyvumas parodytas fig. 5A. Viengubų mutantų N441D ir R442G sukūrimui panaudota sait-nukreipta mutagenezė. Atvirkštinės PGR pradmenys turi šias sekas:

N441D įpriekinis pradmuo

5' AGCTATATTGAAAAAGAAGACAGAAATGCCTTATTAGTAATA 3'

(SEQ ID NO:13)

N441D atbulinis pradmuo

5' TATTACTAATAAGGCATTTCTGTCTTCTTTTCAATATAGCT 3'

(SEQ ID NO:14)

R442G įpriekinis pradmuo

5'AGCTATATTGAAAAAGAAAACGGAAATGCCTTATTAGTAATA 3'

(SEQ ID NO:15)

R442G atbulinis pradmuo

5'TATTACTAATAAGGCATTTCCGTTTTCTTTTCAATATAGCT 3'

(SEQ ID NO:16)

Atvirkštinės PGR reakcijos atliktos šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min. 8 sek., 20 ciklų, naudojant Vent DNR polimerazę, pridėjus 2 ir 4 mM MgCl₂, dNTF, pUC-BsaI matricą ir 1x Thermopol buferį. Amplifikuoti produktai paveikti DpnI tam, kad būtų eliminuota matricos DNR. Iš transformantų atrinkti mutantai, norima mutacijai patvirtinti atlikus DNR sekvenavimą. Variantas N441D pasižymi dsDNR skaidančiu aktyvumu, o variantas R442G - vyraujančiu nikuojančiu aktyvumu. Tačiau viengubo mutanto R442G nikuojantis aktyvumas yra maždaug 8x mažesnis negu dvigubo mutanto N441D/R442G. Palyginus ląstelių ekstraktų nikuojančius aktyvumus, nustatyta, kad R442G aktyvumas yra 1 x 10⁵ vienetų/gramui drėgnų ląstelių, o dvigubo mutanto N441D/R442G atitinkamai – 8 x 10⁵ vienetų/gramui drėgnų ląstelių. Todėl padaryta išvada, kad dvigubo mutanto N441D/R442G dvi aa pakaitos gali veikti sinergistiškai paverčiant BsaI į nikuojančią fermentą. Fig. 7 išvardinti visi BsaI nikuojančio fermento variantai išskirti gauti naudojant atsitiktinę ir sait-nukreiptą mutagenezę.

6. Iškritą (deleciją) turinčių BsaI variantų, pasižyminčių DNR nikuojančiu aktyvumu, išskyrimas

Kaip parodyta 1 lentelėje, du iškritą turintys variantai A26 ir A57 buvo išskirti iš plazmidinės DNR rinkinio (bibliotekos), gauto atsitiktinės mutagenezės būdu. A26 ir A57 turi iškritą atitinkamai nuo 446 iki 544 ir nuo 440 iki 554. Dviejų delecinių variantų nikuojančias

aktyvumai parodyti 5B figūroje (7-16 takeliai). Pirmą kartą parodyta, kad C-terminalinės iškritos mutacija gali paversti IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazę į DNR nikuojantį fermentą. A57 poveikio dėka gauta nikuota DNR panaudota kaip matrica "run-off" sekvenavime. Nustatyta, kad A57 $\Delta(440-554)$ nikuoja apatinę grandinę. Todėl pastarasis buvo pavadintas Nb.BsaI $\Delta(440-544)$. Nb.BsaI $\square(440-544)$ nikuojantis aktyvumas yra mažiausiai visa eile mažesnis negu kitų nikuojančių variantų Nt.BsaI (R236D) ar Nb.BsaI (N441D/R442D).

7. Nikuojančių fermentų dalinis išvalymas

N.BsaI nikuojantys fermentai buvo dalinai išvalyti chromatografiškai panaudojant heparino Sefarozės ir DEAE Sefarozės kolonėles. Baltymai eliuoti iš heparino Sefarozės kolonėlės panaudojant NaCl gradientą nuo 50 mM iki 1 M. Baltymai srove praėjo pro DEAE Sefarozės kolonėlę, o DNR/RNR liko prikibusios kolonėlėje.

8. Šiame darbe panaudoti molekulinės biologijos metodai

PGR, atvirkštinės PGR būdu atliekamos sait-nukreiptos mutagenezės eiga: PGR sąlygos – 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min. 8 sek., 20 – 25 ciklai, naudojant Taq ar Vent DNR polimerazę, pridėjus 2 – 10 mM MgCl₂, dNTF, pUC-BsaI matricą ir 1x Thermopol buferį. Taq DNR polimerazė naudota atvirkštinės PGR metu vykdant atsitiktinę mutagenę. Vent DNR polimerazė naudota atvirkštinės PGR metu vykdant oligonukleotido-nukreiptą mutagenę. Paveikus DpnI, iš amplifikuotos DNR buvo pašalinta matricos DNR.

Plazmidinės DNR paruošimo eiga: Plazmidinės DNR paruošimui naudota Qiagen sūkinio (spin) kolonėlės. Ląstelių lizė, baltymų ir ląstelinės DNR denatūracija atlikta pridėjus P1, P2 ir N3 buferių. Nuskaidrinti supernatantai, turintys plazmidinę DNR, buvo užliejami ant Qiagen kolonėlių ir plaunami PB ir PE buferiais. Plazmidinė DNR eliuojama su 10 mM Tris-HCl buferiu.

Transformacijos eiga: Chemiškai kompetentingos ląstelės paruoštos veikiant eksponentinės augimo fazės *E. coli* ląsteles lede atšaldytu 50 mM CaCl₂ 30 min. Kompetentingos ląstelės sumaišomos su plazmidine DNR ir inkubuojamos ant ledo 30 min. Po 3-5 min. kaitinimo 37° C temperatūroje pridedamas toks pat kiekis LB terpės. Ląstelės auginamos vieną val prie 37° C temperatūros inkubatoriuje. Transformantai išsėjami į LB agarą lėkštes pridėjus atitinkamų antibiotikų plazmidžių selekcijai.

Elektroporacijos eiga: Elektro-kompetentingos ląstelės paruoštos plaunant du kartus eksponentinės augimo fazės *E. coli* ląsteles lede atšaldytu 10% gliceroliu (500 ml 10% glicerolio/ ląstelių nuosėdoms, gautoms iš 1 l ląstelių kultūros). Sumaišius DNR su 100 μ l

kompetentingų ląstelių, elektroporacija vykdyta laikantis šių sąlygų: 1900 V, 200 Ω , 25 μ F, 0.1 cm kiuvetė. Prie ląstelių pridėjama 1 ml LB terpės ir inkubuojama 1 val tam, kad būtų amplifikuoti transformantai. Transformantai buvo išsėti į LB lėkštes pridėjus atitinkamų antibiotikų (Ap, Ap plius Cm) plazmidžių selekcijai.

Ląstelių ekstraktų paruošimas: Ląstelės kultivuotos per naktį 37 °C temperatūroje purtyklėje, po to, lėtai centrifuguojant (1800 g), nusodintos. Ląstelės resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje (50 mM Tri-HCl, pH 7.8, 10 mM β -merkaptioetanolis, 50 mM NaCl). Ląstelės lizuojamos ultragarsu, esant išeigai 4, 50 %, nutraukiant 5 kartus, naudojant mažą ultragarsinio ardymo antgalį. Lizatas nuskaidrintas centrifuguojant prie 14000 g 4°C temperatūroje 10 min. Supernatantas (ląstelių ekstraktas) panaudotas nikuojančio fermento vertinimui.

Nikuojančio fermento vertinimas: ląstelių kultūros arba skiesto ląstelių ekstrakto 10 μ l panaudota superspiralinės pUC19 DNR 1 μ g skaidyti (nikuoti) 1 val 1x BsaI restrikcijos buferyje (1% SDS, 50 % glicerolis, 0.1% BPB dažas). Nikuoti produktai pernešti į nuo 0.8 iki 1 % agarozės gelį su TBE buferiu.

“Run-off” sekvenavimas ir DNR sekvenavimas: Nikuoti produktai ar gelyje išvalyti nikuoti produktai naudoti “run-off” sekvenavimui. Sekvenavimo reakcijose naudotas “Big dye AmpliTaq dideoxy terminator” sekvenavimo rinkinys (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNR seka nustatyta automatinio sekvenatoriumi ABI373A. DNR seka redaguota ir analizuota panaudojant Seqed programą ir GCG programas.

2 pavyzdys. BsmBI nikuojančių variantų sukūrimas iš BsmBI endonukleazės, sait-nukreiptos mutagenezės būdu pakeičiant aa liekanas atitinkamai aa pakaitoms, esančioms Nt.BsaI ir Nb.BsaI

BsaI ir BsmBI restrikcijos endonukleazės atpažįsta panašias DNR atpažinimo sekas (BsaI GGTCTC; BsmBI CGTCTC) ir skaido N1/N5 pasroviui. Dvi endonukleazės pasižymi 45 % panašumu ir 34 % sekų identiškumu amino rūgščių lygyje (fig. 8). Pagrįstai manoma, kad aa pakaitos, identifikuotos BsaI, pakeitusios BsaI endonukleazę į nikuojančius fermentus, sait-nukreiptos mutagenezės būdu galėtų būti sukeltos BsmBI restrikcijos endonukleazėje ir tai sukurtų BsmBI nikuojančius variantus. Būtina sąlyga tokiam ekvivalentiniam mutacijų pernešimui yra tai, kad du baltymai pasižymėtų aa sekų, aktyvių saitų ir sandaros panašumu. GCG “Bestfit” aa sekų išdėstymo programos duomenimis BsmBI Arg233 liekana atitinka BsaI Arg236 (fig. 8.). Kaip parodyta 1 pavyzdyje, BsaI endonukleazėje pakeitus Arg236 į Gly

ar Arg236 į Asp, generuojami BsaI nikuojantys variantai (Nt.BsaI (R236D, Nt.BsaI (R236G)). Atitinkamas BsmBI variantas R233D buvo sukurtas oligonukleotido-nukreiptos mutagenizės (atvirkštinė PGR) būdu. Atvirkštinės PGR pradmenys turi sekančias sekas:

R233D įpriekinis pradmuo

5' CCTATATAATCATGATAGAGATGCTTTTATGTGGTGGTCA 3'

(SEQ ID NO: 17)

R233D atbulinis pradmuo

5' TGACCACCACATAAAAGCATCTCTATCATGATTATATAG 3'

(SEQ ID NO: 18)

Atvirkštinė PGR atlikta šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min., 20 ciklų (DeepVent DNR polimerazė, pridėjus 2 ir 4 mM MgSO₄). Amplifikuoti produktai paveikti DpnI ir pernešti į *E.coli* ER2683 [pACYC-BsmAIM] kaip ekspresijos šeimininkę. Individualūs transformantai kultivuoti 10 ml LB + Ap ir Cm per naktį purtant 37 °C temperatūroje. Ląstelių kultūros (10 µl) buvo tiesiogiai tirtos skryningo būdu ieškant BsmBI nikuojančio aktyvumo. Šeši klonai skryningo būdu tirti ieškant N.BsmBI nikuojančio aktyvumo ir trys klonai parodė nikuojantį aktyvumą. Po to, kai buvo nustatytas nikuojantis aktyvumas, ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos ultragarsu. Ląstelių liekanos buvo pašalintos centrifuguojant ir buvo tirtas ląstelių ekstrakto gebėjimas nikuoti (skaityti) superspiralinę pBR322 DNR. BsmBI variantas R233D pasižymėjo DNR nikuojantį aktyvumą tiek tiriant ląstelių kultūrą, tiek ir ląstelių kultūrą (9B paveikslas). Nikuotas produktas buvo gelyje išskirtas ir panaudotas kaip matrica “run-off” sekvenavime. Nustatyta, kad BsmBI R233D nikavo viršutinę grandinę ir todėl buvo pavadintas Nt.BsmBI (R233D). Nikavimo saito nustatymo rezultatas parodytas 10 paveiksle. Apatinė grandinė, kaip matrica, pagamino besitęsiantį pradmens ekstensijos produktą, kai tuo tarpu viršutinė grandinė, kaip matrica, davė sutrumpintą produktą.

BsaI nikuojantys variantai Nb.BsaI (N441D/R442G) ir Nb.BsaI (R442G) turėjo aa pakaitas N441 ir R442 vietose. BsaI endonukleazėje R442G pakaita yra esminė liekana, kuri BsaI endonukleazę paverčia į N.BsaI nikuojantį fermentą. Atitinkama BsmBI aa liekana yra Arg438 (Glu liekana yra prieš Arg438, Glu437Arg438, 8 pav.). Arg438 buvo pakeista į Asp ar Gly oligonukleotido-nukreiptos mutagenizės būdu (atvirkštinė PGR). Atvirkštinės PGR pradmenys turi šias sekas:

R438G įpriekinis pradmuo

5' ATTCTAAGGATATAAATGAGGGAAAGTTAATTAAATTTGACACT 3'

(SEQ ID NO: 19)

R438G atbulinis pradmuo

5'AGTGTCAAATTTAATTAACCTTCCCTCATTTATATCCTTAGAATT 3'

(SEQ ID NO: 20)

R438D įpriekinis pradmuo

5'AATTCTAAGGATATAAATGAGGATAAGTTAATTAATTTGACACT 3'

(SEQ ID NO: 21)

R438D atbulinis pradmuo

5'AGTGTCAAATTTAATTAACCTTATCCTCATTTATATCCTTAGAATT 3'

(SEQ ID NO: 22)

Atvirkštinė PGR atlikta šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min., 20 ciklų (DeepVent DNR polimerazė, pridėjus 2 ir 4 mM MgSO₄). Amplifikuoti PGR produktai paveikti DpnI ir pernešti į *E.coli* ER2683 [pACYC-BsmAIM] kaip ekspresijos šeimininkę. Individualūs transformantai kultivuoti 10 ml LB + Ap ir Cm per naktį purtant 37 °C temperatūroje. Ląstelių kultūros tiesiogiai tirtos skryningo būdu ieškant BsmBI nikuojančio aktyvumo. Po to, kai buvo nustatytas nikuojantis aktyvumas, ląstelių kultūros lėtai centrifuguotos ir ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos ultragarsu. Ląstelių liekanos pašalintos centrifuguojant ir tirtas ląstelių ekstrakto gebėjimas nikuoti (skaidyti) superspiralinę pBR322 DNR. BsmBI variantai R438D ir R438G pasižymėjo DNR nikuojančiu aktyvumu tiek tiriant ląstelių kultūrą, tiek ir ląstelių kultūrą (fig. 9A). Nikuotas produktas buvo gelyje išskirtas ir panaudotas kaip matrica “run-off” sekvenavime. Nustatyta, kad BsmBI R438D nikavo apatinę grandinę ir todėl buvo pavadintas Nb.BsmBI (R438D). Nikavimo saito nustatymo rezultatas parodytas 11 figūroje. Viršutinė grandinė liko nenikuota ir “run-off” sekvenavimas parodė ją vientisą. Apatinė grandinė buvo nikauta ir “run-off” sekvenavimas staiga sustojo ties nikauta vieta.

3 pavyzdys. Grandinei specifinių nikuojančių fermentų Nt.BsmI ir Nb.BsmI sukūrimas iš BsmAI restrikcijos endonukleazės sait-nukreiptos mutagenezės būdu

BsaI ir BsmAI restrikcijos endonukleazės atpažįsta panašias DNR atpažinimo sekas (BsaI GGTCTC; BsmAI GTCTC) ir skaido N1/N5 pasroviui. Dvi endonukleazės pasižymi 48 % aa sekų panašumu ir 37 % aa sekų identiškumu (fig. 12). Pagrįstai manoma, kad aa pakaitos, identifikuotos BsaI, pavertusios BsaI endonukleazę į nikuojančius fermentus, sait-nukreiptos mutagenezės būdu galėtų būti sukeltos BsmAI restrikcijos endonukleazėje ir tai sukurtų BsmAI nikuojančius variantus. GCG “Bestfit” aa sekų išdėstymo programos duomenimis BsmAI Arg221 liekana atitinka BsaI Arg236 (fig. 12). Kaip parodyta 1

pavyzdyje, BsaI endonukleazėje pakeitus Arg236 į Gly ar Arg236 į Asp, sukuriama BsaI nikuojantys variantai (Nb.BsaI (R236D), Nt.BsaI (R236G)). Atitinkamas BsmAI variantas R221D buvo sukurtas oligonukleotido-nukreiptos mutagenizės (atvirkštinė PGR) būdu. BsmAIR genas buvo pirmą kartą klonuotas pUC19 vektoriuje tam, kad būtų gauta pUC-BsmAIR. Atvirkštinės PGR pradmenys turi šias sekas:

R221D įpriekinis pradmuo

5' TCGTATACAAAAGATAGAGATGCATATGAATATTGGAGC 3'

(SEQ ID NO: 23)

R221D atbulinis pradmuo

5' GCTCCAATATTCATATGCATCTCTATCTTTTGTATACGA 3'

(SEQ ID NO: 24)

Atvirkštinė PGR atlikta šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min., 20 ciklų (DeepVent DNR polimerazė, pridėjus 2, 4 ir 6 mM MgSO₄). Amplifikuoti PGR produktai paveikti DpnI ir pernešti į *E.coli* ER2683 [pACYC-BsmAIM] kaip ekspresijos šeimininkę. Individualūs transformantai kultivuoti 10 ml + Ap ir Cm per naktį purtant 37 °C temperatūroje. Ląstelių kultūros tiesiogiai tirtos skryningo būdu ieškant BsmBI nikuojančio aktyvumo. Šešiolika klonų skryningo būdu tirti ieškant N.BsmBI nikuojančio aktyvumo ir 14 klonų parodė nikuojantį aktyvumą. Pozityvių klonų ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos ultragarsu. Ląstelių liekanos pašalintos centrifuguojant ir tirtas ląstelių ekstrakto gebėjimas nikuoti (skaidyti) superspiralinę pBR322 DNR. BsmAI varianta R221D pasižymėjo DNR nikuojančiu aktyvumu tiek tiriant ląstelių kultūrą, tiek ir ląstelių ekstraktą (fig. 13). Taip pat buvo aptiktas ir nedidelis dsDNR skaidymo aktyvumas (fig. 13A). Nikuotas produktas buvo gelyje išskirtas ir panaudotas kaip matrica “run-off” sekvenavime. Nustatyta, kad BsmAI R221D nikavo viršutinę grandinę ir todėl buvo pavadintas Nt.BsmBI (R221D). Nikavimo saito nustatymo rezultatas parodytas 14 figūroje.

BsaI nikuojantys variantai Nb.BsaI (N441D/R442G) ir Nb.BsaI (R442G) turėjo aa pakaitas N441 ir R442 vietose. BsaI endonukleazėje R442G pakaita yra esminė liekana, kuri BsaI endonukleazę paverčia į N.BsaI nikuojantį fermentą. Atitinkama BsmAI aa liekana yra N415 ir R416. Oligonukleotido-nukreiptos mutagenizės būdu (atvirkštinė PGR) BsmAI endonukleazėje Asn415 buvo pakeista į Asp (N415D) ir Arg416 į Gly (R416G). Atvirkštinės PGR pradmenys turi šias sekas:

N415D/R416G įpriekinis pradmuo

5'GATTATAATGAAAAAGAAGATGGAAATATAAAAGCAAACCTC 3'

(SEQ ID NO: 25)

N415D/R416G BsmAI atbulinis pradmuo

5' GAGGTTTGCTTTTATATTTCCATCTTCTTTTTCATTATAATC 3'

(SEQ ID NO: 26)

Atvirkštinė PGR atlikta šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min., 20 ciklų (DeepVent DNR polimerazė, pridėjus 2, 4 ir 6 mM MgSO₄). Amplifikuoti PGR produktai paveikti DpnI ir pernešti į *E.coli* ER2683 [pACYC-BsmAIM] kaip ekspresijos šeimininkę. Individualūs transformantai kultivuoti 10 ml LB + Ap ir Cm per naktį purtant 37 °C temperatūroje. Ląstelių kultūros tiesiogiai tirtos skyringo būdu ieškant BsmBI nikuojančio aktyvumo. Rasti šeši pozityvūs nikuojantys aktyvumai tarp 8, tirtų skyringo būdu ieškant N.BsmBI nikuojančio aktyvumo. Šešių pozityvių klonų ląstelių nuosėdos resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos ultragarsu. Ląstelių liekanos pašalintos centrifuguojant ir tirtas ląstelių ekstrakto gebėjimas nikuoti (skaidyti) superspiralinę pBR322 DNR. BsmAI variantas N415D/R416G pasižymėjo tiek dsDNR skaidančiu, tiek ir nikuojančiu aktyvumais (fig. 13B). Kadangi BsmAI variantas šalia dsDNR skaidymo pasižymėjo ir nikuojančiu aktyvumu, jo specifiškumą grandinei galima buvo toliau optimizuoti. BsmAI varianto N415D/R416G nikuojama grandinė buvo nustatyta “run-off” sekvenavimo būdu. Nustatyta, kad jis nikavo apatinę grandinę, tai parodė staigus sekvenavimo piko signalo kritimas nikutoje vietoje (fig.15). Viršutinė grandinė generavo normalią DNR seką.

4 pavyzdys. Grandinei specifinio nikuojančio fermento N.BsmAI sukūrimas iš BsmAI restrikcijos endonukleazės atsitiktinės mutagenezės ir genetinio skyringo būdu

Tam, kad būtų gauta daugiau BsmAI nikuojančių variantų atlikta *bsmAIR* geno atsitiktinė mutagenėzė. *bsmAIR* genas mutagenizuotas panaudojant linkusią klysti atvirkštinę PGR šiomis sąlygomis: 94 °C - 30 sek., 55 °C – 30 sek., 72 °C – 4 min. 8 sek., 25 ciklai, naudojant Taq DNR polimerazę, pridėjus 2, 4, 6, 10 mM MgCl₂, dNTF, pUC-BsmAI matricą ir 1x Thermopol buferį. PGR produktai surinkti ir išvalyti Qiagen sūkinio kolonėlėse, suskaidyti panaudojant XhoI ir DpnI. DpnI skaidymo dėka pašalinama Dam-metilinta DNR matrica. Po to PGR produktai savaime ligavosi ir elektroporacijos būdu buvo pernešti į *E. coli* kaip ekspresijos šeimininkę, transformantai buvo pasėti Ap lėkštelėse. Recipientinė šeimininkė neturėjo apsauginės metilazės, ir todėl didelio aktyvumo wt fermentas ar mutantinis fermentas užmušė ląsteles-šeimininkes. Tik nuliniai mutantai, mažo aktyvumo mutantai ar mutantai, pasižymintys skaidymo defektu ir geru jungimosi gebėjimu, išgyveno šioje transformacijos pakopoje. Viso gauta apie 3,600 išgyvenusių transformantų, kurie buvo

surinkti į bendrą pulą. Plazmidinė DNR išskirta iš ląstelių pulo ir tuo būdu sukurtas mutantinės plazmidinės DNR rinkinys (biblioteka).

BsmAI wt ir mutantinės plazmidės (~3.9 kb) buvo suskaidytos restrikcijos fermentais PstI ir BseYI. PstI lokalizavosi *bsmAIR* geno viduryje ir todėl, skaidant PstI, endonukleazės genas skilo į lygius segmentus (43% ir 57 %). BseYI lokalizavosi vektoriaus ColEI replikacijos origin rajone. Restrikcijos fragmentai buvo išskirti žemos lydimosi temperatūros gelyje ir po to išvalyti Qiagen sūkinio kolonėlėse. wt N-terminalinė koduojanti seka (wt kairė pusė) buvo sujungta su mutagenizuota (inaktyvuota) C-terminaline koduojančia seka (mutantinė dešinė pusė) ir liguota panaudojant T4 DNR ligazę. Priešingai, mutagenizuota (inaktyvuota) N-terminalinė koduojanti seka (mutantinė kairė pusė) buvo sujungta su wt C-terminaline koduojančia seka (wt dešinė pusė) ir liguota panaudojant T4 DNR ligazę. Liguota DNR, panaudojus elektroporaciją, buvo pernešta į *E. coli* kaip ekspresijos šeimininkę ER2683 [pACYC-BsmAI]. Gimininga metilazė M.BsmAI suteikė šeimininkės DNR apsaugą. Transformantai buvo išsėti LB agarą lėkštelėse + Ap ir Cm ir inkubuoti per naktį 37 °C temperatūroje.

Transformantų pavienės kolonijos, buvo išsėtos į 10 ml terpės, turinčios LB + Ap ir Cm, ir augintos purtyklėje per naktį 37° C temperatūroje. Testuojant nikuojančią aktyvumą, išbandytas dešimties µl totalinės ląstelių kultūros poveikis 1 µg pUC19 superspiralinės DNR. Nikuota DNR buvo išanalizuota elektroforezė agarozės gelyje būdu. Kuomet tam tikro izoliato kultūros terpėje buvo aptikta nikuota žiedinė DNR, tuomet 10 ml ląstelių nuosėdų buvo surinktos greitai centrifuguojant. Ląstelių nuosėdos resuspenduotos ultragarsinio ardymo buferyje ir lizuotos veikiant ultragarsu. Nuskaidrintas supernatantas (ląstelių ekstraktas) buvo panaudotas nikuojančio fermento aktyvumo patvirtinimui. Viso ištirta 24 transformantų skryningo būdu ieškant nikuojančio aktyvumo. Trys klonai (#48, #100, #234) pasižymėjo pozityviu nikuojančiu aktyvumu tiek ląstelių kultūroje, tiek ir ląstelių ekstraktuose. Plazmidinė DNR išskirta iš šių trijų izoliatų, ir *bsmAIR* alelis sekvenuotas naudojant pUC universalius pradmenis ir vietoje pagamintus pradmenis: Pradmenys turėjo šias sekas:

5'GAAGTTATTTATGAACTTGAATCA 3' (303-023) (SEQ ID NO:27)

5'TTAATTTCTGGAGTTTACCGAGAT 3' (303-024) (SEQ ID NO:28)

BsmAI nikuojantis variantas #48 turi 59-aa C-terminalinę iškritą (deleciją), atsiradusią dėl stop kodono įtarpos vietoje kodono 394 [#48N.BsmAI Δ(394-465)] (žiūr. 16 paveikslą, 5-7 takeliai). Kitas BsmAI nikuojantis variantas #100 turi dvi aa pakaitas Nt.BsmAI (R221H/K287N). Kaip parodyta 3 pavyzdyje, N.BsmAI variantas R221D yra viršutinę

grandinę nikuojantis fermentas (Nt.BsmAI). Atitinkamai rezultatui, pateiktam 3 pavyzdyje, atsitiktinės mutagenezės būdu taip pat nustatyta, kad R221 yra kritinė liekana, susijusi su konversija į nikuojantį fermentą. K287N pakaitos indėlis į nikuojantį aktyvumą dvigubame mutante, matomai, yra minimalus.

Kadangi pirmojo genetinio skryningo metu identifikuoti trys BsmAI nikuojantys variantai (#48, #100 ir #234) ir šie trys fermentai pasižymėjo taip pat ir tam tikru dsDNR skaidymo aktyvumu, todėl atliktas antrasis genetinis skryningas tam, kad būtų išskirta daugiau nikuojančių variantų. BsmAI wt ir mutantinės plazmidės (~3.9 kb) buvo suskaidytos restrikcijos fermentais BsrGI ir BseYI. BsrGI lokalizavosi *bsmAIR* geno viduryje ir todėl, skaidant BsrGI, endonukleazės genas skilo į du segmentus (56% ir 44 %). BseYI lokalizavosi vektoriaus CoIEI replikacijos origin rajone. Restrikcijos fragmentai buvo išskirti žemos lydomosi temperatūros gelyje ir po to išvalyti Qiagen sūkinio kolonėlėse. wt N-terminalinė koduojanti seka (wt kairė pusė) buvo sujungta su mutagenizuota (inaktyvuota) C-terminaline koduojančia seka (mutantinė dešinė pusė) ir liguota panaudojant T4 DNR ligazę. Priešingai, mutagenizuota (inaktyvuota) N-terminalinė koduojanti seka (mutantinė kairė pusė) buvo sujungta su wt C-terminaline koduojančia seka (wt dešinė pusė) ir liguota panaudojant T4 DNR ligazę. Liguota DNR, panaudojus elektroporaciją, buvo pernešta į *E. coli*, kaip ekspresijos šeimininkę ER2683 [pACYC-BsmAI]. Gimininga metilazė M.BsmAI suteikė šeimininkės DNR apsaugą. Transformantai buvo išsėti LB agarą lėkštelėse + Ap ir Cm ir inkubuoti per naktį 37^o C temperatūroje. Skryningo būdu testuojant DNR nikuojantį aktyvumą, išbandytas 240 transformantų ląstelių kultūrų poveikis pUC19 superspiralinei DNR. Šešiolika bandinių pasižymėjo DNR nikuojančiu aktyvumu. Vėliau šį DNR nikuojantį aktyvumą patvirtino ląstelių ekstraktų tyrimai, ir keturi aktyviausi variantai (#40, #55, #101 ir #197) buvo atrinkti. DNR sekvenavimui. N.BsmAI variantų DNR nikuojantis aktyvumas, nustatytas antrojo genetinio skryningo metu, parodytas 16 paveiksle (#40, 2-4 takeliai; #55, 8-10 takeliai; #101, 11-13 takeliai; #197, 14-16 takeliai). aa pakaitos ar delecija, esančios N.BsmAI nikuojančiuose variantuose, parodyti žemiau 2 lentelėje:

2 lentelė. aa pakaitos ar delecija, esančios N.BsmAI nikuojančiuose variantuose

Izoliato numeris	Kodono Pakeitimas	aa pakaita/delecija	Nikuojama grandinė
#48 (1 skryningas)	UAU į UAA	Δ(394-465)	nenustatyta
#100	CGU į CAU	R221H/K287N	viršutinė

(1 skryningas)	AAA į AAC		
#40 (2 skryningas)	AAC į UAC	N349Y	Viršutinė
#55 (2 skryningas)	UGG į UGU GGA į GAA	W8C/G207E	viršutinė
#101(2 skryningas)	AAG į UAG	Δ(362-465)	viršutinė
#197 (2 skryningas)	CCC į CAC UGG į UUG CGU į AGU	P26H/W302L/R3 86S	viršutinė

Delecinis variantas #101Δ(362-465) ir mutantinis variantas #197 pasižymėjo nikuojančiu aktyvumu, nustatytu atliekant riboto skaidymo testą (1/100 skiedimas 16 figūroje). Naudojant didelę fermento koncentraciją, aptiktas dsDNR skaidymo aktyvumas. Todėl nikuojantis aktyvumas gali būti optimizuotas vykdant Arg386 mutagenezę, pavyzdžiui, išskiriant R386D ar R386E. Be to, aa pakaitos, identifikuotos atsitiktinės mutagenezės būdu, gali būti kombinuojamos siekiant gauti dvigubus ar trigubus mutantus, pavyzdžiui, išskiriant N349Y/R386S, G207E/R386S ar G207E/N349Y/R386S. Dvigubus ar trigubus mutantus galima sukurti oligonukleotido-nukreiptos PGR mutagenezės būdu.

5 pavyzdys. IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės lokalizuota atsitiktinė mutagenezė, skirta grandinei specifinių nikuojančių fermentų gavimui

Panaudojant restrikcijos fermentus, IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės genas gali būti skaidomas į du fragmentus, vieną fragmentą, koduojantį N-terminalines aa, ir kitą, koduojantį C-terminalines aa. Vidinis restrikcijos saitas gali būti lokalizuotas koduojančios sekos viduje nuo 5% iki 95% reliatyvioje pozicijoje skaitant nuo pirmojo startinio kodono. DNR N-terminalinis koduojantis fragmentas ar C-terminalinis fragmentas gali būti klonuoti į ekspresijos vektorių. N-terminalinė koduojanti DNR gali būti mutagenizuota atsitiktinės mutagenezės būdu. Po restrikcinio skaidymo, gavus atitinkamą fragmentą, mutagenizuotas fragmentas gali būti liguotas su wt C-terminaliniu koduojančiu fragmentu /vektoriumi ir tokia liguota DNR gali būti panaudota premodifikuotos ar nemodifikuotos šeiminkės transformacijai. Ieškant nikuojančių fermentų variantų galima atlikti transformantų ląstelių

kultūrų ar ląstelių ekstraktų skryningą. Kaip alternatyva, C-terminalinė koduojanti DNR gali būti mutagenizuota atsitiktinės mutagenezės būdu. Po restrikcinio skaidymo atitinkamų flankuojančių restrikcijos saitų gavimui mutagenizuotas fragmentas gali būti liguotas su wt N-terminaliniu koduojančiu fragmentu/vektoriumi ir tada liguota DNR naudojama premodifikuotos šeimininkės transformacijai. Ieškant nikuojančių fermentų variantų atliekamas transformantų ląstelių kultūrų ar ląstelių ekstraktų skryningas. Po nikuojančių variantų išskyrimo atliekamas nikuojamo saito ir nikuojamos grandinės nustatymas, tam tikslui naudojant atitinkamą DNR substratą.

6 pavyzdys. IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės dalies geno atsitiktinė mutagenėzė, skirta grandinei specifinių nikuojančių fermentų gavimui

Galima klonuoti wt IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės geną į plazmidę ir replikuoti plazmidę ląstelėje-šeimininkėje, turinčioje apsauginę metilazę. Galima klonuoti dalį restrikcijos endonukleazės geno (restrikcijos fragmentas, atitinkantis nuo 5% iki 95 % viso geno) ir tada, panaudojant linkusią klysti PGR ar kitus atsitiktinės mutagenezės būdus, galima šį sub-fragmentą mutagenizuoti. Po restrikcijos skaidymo tam, kad būtų gauti atitinkami restrikcijos galai, mutagenizuotas fragmentas yra liguojamas su wt DNR/vektoriumi pakeičiant atitinkamą wt rajoną. Liguota DNR naudojama šeimininkės, turinčios ar neturinčios apsauginę metilazę, transformacijai. Transformantų ląstelių kultūrose galima atlikti nikuojančių variantų skryningą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės sukūrimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima:
 - (a) pirmosios ląstelių-šeimininkių, kurios neturi metilazių apsaugos, populiacijos transformaciją plazmidėmis, turinčiomis atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną;
 - (b) (a) pakopoje gautų transformuotų ląstelių-šeimininkių kultivavimą ir plazmidžių išskyrimą;
 - (c) (a) pakopoje nurodyto mutagenizuoto restrikcijos endonukleazės geno ir atitinkamo laukinio tipo restrikcijos endonukleazės geno skaidymą į fragmentus;
 - (d) laukinio tipo ir mutagenizuoto endonukleazės restrikcijos genų (c) pakopoje gautų fragmentų *in vitro* atgalinį kryžminimą ir liguoto geno gavimą;
 - (e) (d) pakopoje gauto liguoto geno ekspresuojamo baltymo grandinei specifinio nikuojančio aktyvumo nustatymą; ir
 - (f) sukurtos grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės identifikavimą.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad restrikcijos endonukleazės geno (c) pakopoje nurodytas skaidymas atliekamas panaudojant restrikcijos endonukleazės skaidymą ir kur restrikcijos endonukleazės geno fragmentai išvalomi agarozės gelyje.
3. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (d) pakopa toliau apima: antrosios ląstelių-šeimininkių populiacijos transformaciją liguotu genu, kur transformantai yra apsaugoti giminingų ir negiminingų metilazių.
4. Būdas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad toliau apimantis individualių transformantų kolonijų auginimą.
5. Būdas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad ieškant nikuojančio aktyvumo kolonijų individualaus skryningo metu kaip substratas naudojama superspiralinė DNR.
6. Būdas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad individualaus skryningo pakopoje naudojamos visos ląstelės ląstelių kultūroje arba ląstelių ekstraktas.

7. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (f) pakopa toliau apima mutacijų vietas ir tipo nustatymą nikuojančią endonukleazę koduojančioje DNR.

8. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mutagenizuotas restrikcijos endonukleazės genas turi iškritą (deleciją), įtarpą ar vieno ar daugiau nukleotidų pakaitą.

9. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mutagenizuotas genas turi daugybės mutacijas.

10. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mutagenizuotas genas turi vieną mutaciją.

11. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad restrikcijos endonukleazės genas koduoja baltymą, turintį C-terminalinį galą ir N-terminalinį galą, kur viena ar daugiau mutacijų lokalizuotos C-terminaliniame gale.

12. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mutagenizuotas genas turi nuo 3 iki 600 nukleotidų ilgio iškritą (deleciją).

13. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (a) pakopoje nurodytas ląstelių šeimininkių paruošimas yra pasirenkamas iš gram-neigiamų ar gram-teigiamų bakterijų šeimininkių.

14. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (a) pakopoje nurodytas ląstelių šeimininkių paruošimas yra pasirenkamas iš *E. coli* ar *Bacillus* kamienų.

15. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad toliau apima: mutacijos, esančios nikuojančioje endonuklezėje, identifikavimą lyginant su laukinio tipo restrikcijos endonukleaze, iš kurios ji kilo, ir mutacijos įterpimą sait-nukreiptos mutagenezės būdu į restrikcijos endonukleazės izošizomerą ar neošizomerą.

16. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad toliau apima papildomos mutacijos įterpimą į nikuojančią endonukleazę (f) pakopoje aprašytu būdu, panaudojant sait-nukreiptą

mutagenezę, nikuojančio aktyvumo padidinimui ar dvigrandininio DNR skaidymo aktyvumo sumažinimui, ar abiem tikslais.

17. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mutagenizuotas restrikcijos endonukleazės genas yra IIA tipo endonukleazės genas.

18. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad nikuojanti endonukleazė yra termofilinė nikuojanti endonukleazė.

19. Būdas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad restrikcijos endonukleazė yra BsaI, BsmAI, BsmBI ar jų neoizomerai, ar izoizomerai.

20. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (f) pakopa toliau apima nikuojančios endonukleazės specifiškumo dvigubos DNR grandinei nustatymą.

21. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (d) pakopos nikuojanti endonukleazė yra viršutinę grandinę nikuojanti endonukleazė.

22. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (d) pakopos nikuojanti endonukleazė yra apatinę grandinę nikuojanti endonukleazė.

23. Nikuojanti endonukleazė, sukurta būdu pagal 1 punktą.

24. Nikuojanti endonukleazė, apimanti modifikuotą rekombinantinę BsaI.

25. Nikuojanti endonukleazė, apimanti modifikuotą rekombinantinę BsmAI.

26. Nikuojanti endonukleazė, apimanti modifikuotą rekombinantinę BsmBI.

27. Vieno ar daugiau sait-specifinių viengrandinių trūkių įterpimo į pasirinktas dvigubos DNR grandines būdas, besiskiriantis tuo, kad apima: dvigubos DNR skaidymą panaudojant nikuojančią endonukleazę, sukurta būdu pagal 19 punktą ir išlaikant sąlygas, palankias nikuojančio aktyvumo pasireiškimui.

28. Taikininės sekos amplifikacijos būdas, besiskiriantis tuo, kad apima:

(a) viengrandinio nukleino rūgšties fragmento, turinčio taikininę seką ir turinčio 5' galą ir 3' galą, gavimą;

(b) SDA amplifikacijos pradžios prijungimą prie fragmento 3' galo taip, kad pradmuo sudarytų 5' viengrandinę užlaidą, amplifikacijos pradžios, apimančią nikuojančios endonukleazės, sukurtos pagal 1 apibrėžtį, atpažinimo/skaidymo saitą; ir

(c) ant fragmento esančio amplifikacijos pradžios pailginimą, kai nėra derivatizuoto ar pakaitinio dezoksinukleozido trifosfato, ir, kai yra: (1) DNR polimerazė, pasižyminti grandinę išstumiančiu aktyvumu ir neturinti 5'-3' egzonukleazės aktyvumo, ir (2) keturi dezoksinukleozido trifosfatai; ir

(d) amplifikuotos dvigrandinės taikininės sekos nikavimą, panaudojant nikuojančią endonukleazę, pailginimą nuo trūkio vietos naudojant DNR polimerazę, tuo būdu išstumiant pirmąją naujai sintezuotą grandinę nuo fragmento ir generuojant antrąjį ekstensijos produktą, apimančią antrąją naujai sintezuotą grandinę; ir nikavimo, pailginimo ir išstūmimo pakopų kartojimą taip, kad būtų amplifikuota taikininė seka.

29. Fermento, pasižyminčio bent vienu modifikuotu specifiskumu substratui ir aktyvumu, sukūrimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima:

(a) atsitiktinai mutagenizuotos DNR rinkinio (bibliotekos) sukūrimą, kur rinkinys turi vieną ar daugiau genų, koduojančių visą ar mutantinio geno dalį, kur mutantinis fermentas yra iš esmės inaktyvus, kur iš esmės inaktyvus fermentas turi N-terminalinį galą ir C-terminalinį galą, kur inaktyvacija yra atsiradusi dėl mutacijos, esančios laukinio tipo fermento N-terminaliniame gale ar C-terminaliniame gale;

(b) vieno ar daugiau genų, ekspresuojančių inaktyvią endonukleazę, skaidymą į bent pirmą ir antrą fragmentus, kur pirmasis fragmentas koduoja fermento C-terminalinį galą ir, kur antrasis fragmentas koduoja fermento N-terminalinį galą;

(c) ligavimą fragmentų, parinktų iš: pirmojo fragmento ir trečiojo fragmento, koduojančio laukinio tipo fermento N-terminalinį galą; antrojo fragmento ir ketvirtąjo fragmento, koduojančio laukinio tipo fermento C-terminalinį galą; arba abiejų pirmojo ir antrojo fragmentų su atitinkamai trečiuoju ir ketvirtuoju fragmentais; ir

(d) liguotos DNR ekspresiją ląstelėje-šeimininkėje tam, kad būtų gautas fermentas, pasižymintis modifikuotu specifiskumu substratui ir aktyvumu.

30. Taikininės nukleino rūgšties amplifikavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima:

(a) dvigrandininės taikininės nukleino rūgšties bent vienos grandinės viengrandininį skaidymą (nikavimą) daugelyje vietų panaudojant nikuojantį fermentą, sukurtą pagal 1 punktą tam, kad susidarytų mažiausiai du nauji 3' terminaliniai galai;

(b) vieno ar daugiau iš mažiausiai dviejų naujų 3' terminalinių galų pailginimą panaudojant DNR polimerazę;

(c) ekstensijos produkto, gauto (b) pakopoje, nikavimą; ir

(d) nikavimo produkto, gauto (c) pakopoje, pailginimą amplifikuojant bent dalį taikininės nukleino rūgšties grandinės.

31. Nikuojančio fermento variantų greito skryningo būdas, besiskiriantis tuo, kad DNR nikavimo reakcijoje naudojamos ląsteles-šeimininkės plius kultivavimo terpė drauge su superspiraline DNR kaip substratu.

<110> New England Biolabs, Inc.
Zhu, Zhenyu
Xu, Shuang-yong

<120> Nikuojančių fermentų sukūrimo būdas
<130> NEB-235-LT

<150> US 60/531,064
<151> 2003-12-19

<160> 44

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 11
<212> DNR
<213> nežinomas
<220>
<223> synthetic

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (7)..(11)
<223> n=g,a,c arba t

<400> 1
gggtctcnnnn n

11

<210> 2
<211> 11
<212> DNA
<213> nežinomas

<220>
<223> synthetic

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (7)..(11)
<223> n=g,a,c or t

<400> 2
cggtctcnnnn n

11

<210> 3
<211> 10
<212> DNA
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinė

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (6)..(10)
<223> n=g,a,c or t

<400> 3
gtctcnnnnn

10

<210> 4
<211> 24
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 4
cgatctgtct atttcttca tcca

24

<210> 5
<211> 24
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 5
ggcaacaatt aatagactgg atgg

24

<210> 6
<211> 24
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 6
tttgaaattg attcactaga acat

24

<210> 7
<211> 24
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 7
aaggaaactt gtttaaatga taac

24

<210> 8
<211> 24
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 8
agagatacaa aatacactga agag

24

<210> 9
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 9
 tcataataca cagataagg agcattgaa tactgggtt 39

<210> 10
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 10
 aaccagat tcaaatgctc ctctatctgt tgtatatga 39

<210> 11
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 11
 tcataataca cagatagaga cgcattgaa tactgggtt 39

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 12
 aaccagat tcaaatgctc ctctatctgt tgtatatga 39

<210> 13
 <211> 42
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 13
 agctatattg aaaaagaaga cagaaatgcc ttattagtaa ta 42

<210> 14
 <211> 42
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 14

tattactaat aaggcatttc tgtctcttt ttcaatatag ct

42

<210> 15

<211> 42

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 15

agctatattg aaaaagaaaa cggaaatgcc ttattagtaa ta

42

<210> 16

<211> 42

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 16

tattactaat aaggcatttc cgtttcttt ttcaatatag ct

42

<210> 17

<211> 39

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 17

ctatataatc atgatataga tgcttttatg tgggtgtca

39

<210> 18

<211> 39

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 18

tgaccaccac ataaaagcat ctctatcatg attatatag

39

<210> 19

<211> 45

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 19

aattctaagg atataaatga gggaaagtta attaaattg acact

45

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 25
gattataatg aaaaagaaga tggaaatata aaagcaaacc tc 42

<210> 26
<211> 42
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<400> 26
gaggtttgct ttatatcttc catctctctt ttcattataa tc 42

<210> 27
<211> 23
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinė

<400> 27
ggtctcggg tatcattgca gca 23

<210> 28
<211> 20
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

—

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (16)..(16)

<223> polimerazės pagalba pridėtas nukleotidas

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (17)..(20)

<223> n=g,a,c or t

<400> 28
tgctgcaatg ataccgannn 20

<210> 29
<211> 21
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinė

<400> 29

<210> 20
 <211> 45
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 20
 agtgtcaaat ttaattaact ttccctcatt tatacccta gaatt 45

<210> 21
 <211> 45
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 21
 aattctaagg atataaatga ggataagta attaaattg acact 45

<210> 22
 <211> 45
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 22
 agtgtcaaat ttaattaact taccctcatt tatacccta gaatt 45

<210> 23
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 23
 tcgtatacaa aagatagaga tgcatatgaa tattggagc 39

<210> 24
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 24
 gctccaatat tcatatgcat ctctatcttt tgtatacga 39

<210> 25
 <211> 42
 <212> DNR

cgtgggtctc gcggtatcat t

21

LT 5262 B

<210> 30

<211> 19

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (16)..(16)

<223> polimerazės pagalba pridėtas nukleotidas

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (17)..(19)

<223> n=g,a,c or t

<400> 30

cgtgggtctc gcggtannn

19

<210> 31

<211> 524

<212> PRT

<213> nežinomas

<220>

<223> Bacillus stearothermophilus 6-55

<400> 31

Ala Glu Tyr Gly Gln Gly His Pro Ile Phe Leu Glu Tyr Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ile Ile Gln His Lys Glu Tyr Gln Gly Met Pro Asp Leu Arg Tyr Pro
20 25 30

Asp Gly Arg Ile Gln Trp Glu Ala Pro Ser Asn Arg Lys Ser Gly Ile
35 40 45

Phe Lys Asp Thr Asn Ile Lys Arg Arg Lys Trp Trp Glu Gln Lys Ala
50 55 60

Ile Ser Ile Gly Ile Asp Pro Ser Ser Asn Gln Trp Ile Ser Lys Thr
65 70 75 80

Ala Lys Leu Ile His Pro Thr Met Arg Lys Pro Cys Lys Lys Cys Gly
85 90 95

Arg Ile Met Asp Leu Arg Tyr Ser Tyr Pro Thr Lys Asn Leu Ile Lys
100 105 110

Arg Ile Arg Lys Leu Pro Tyr Val Asp Glu Ser Phe Glu Ile Asp Ser

115	120	125	
Leu Glu His Ile Leu Lys Leu Ile Lys Arg Leu Val Leu Gln Tyr Gly			
130	135	140	
Asp Lys Val Tyr Asp Asp Leu Pro Lys Leu Leu Thr Cys Lys Ala Val			
145	150	155	160
Lys Asn Ile Pro Arg Leu Gly Asn Asp Leu Asp Thr Trp Leu Asn Trp			
165	170	175	
Ile Asp Ser Val Tyr Ile Pro Ser Glu Pro Ser Met Leu Ser Pro Gly			
180	185	190	
Ala Met Ala Asn Pro Pro Asp Arg Leu Asp Gly Phe His Ser Leu Asn			
195	200	205	
Glu Cys Cys Arg Ser His Ala Asp Arg Gly Arg Trp Glu Lys Asn Leu			
210	215	220	
Arg Ser Tyr Thr Thr Asp Arg Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Val Asp Gly			
225	230	235	240
Asp Trp Val Ala Ala Asp Lys Leu Met Gly Leu Ile Arg Thr Asn Glu			
245	250	255	
Gln Ile Lys Lys Glu Thr Cys Leu Asn Asp Asn His Pro Gly Pro Cys			
260	265	270	
Ser Ala Asp His Ile Gly Pro Ile Ser Leu Gly Phe Val His Arg Pro			
275	280	285	
Glu Phe Gln Leu Leu Cys Asn Ser Cys Asn Ser Ala Lys Asn Asn Arg			
290	295	300	
Met Thr Phe Ser Asp Val Gln His Leu Ile Asn Ala Glu Asn Asn Gly			
305	310	315	320
Glu Glu Val Ala Ser Trp Tyr Cys Lys His Ile Trp Asp Leu Arg Lys			
325	330	335	
His Asp Val Lys Asn Asn Glu Asn Ala Leu Arg Leu Ser Lys Ile Leu			
340	345	350	
Arg Asp Asn Arg His Thr Ala Met Phe Ile Leu Ser Glu Leu Leu Lys			
355	360	365	
Asp Asn His Tyr Leu Phe Leu Ser Thr Phe Leu Gly Leu Gln Tyr Ala			
370	375	380	

LT 5262 B

Glu Arg Ser Val Ser Phe Ser Asn Ile Lys Ile Glu Asn His Ile Ile
385 390 395 400

Thr Gly Gln Ile Ser Glu Gln Pro Arg Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Glu
405 410 415

Gln Lys Ala Arg Arg Met Arg Ile Gly Phe Glu Ala Leu Lys Ser Tyr
420 425 430

Ile Glu Lys Glu Asn Arg Asn Ala Leu Leu Val Ile Asn Asp Lys Ile
435 440 445

Ile Asp Lys Ile Asn Glu Ile Lys Asn Ile Leu Gln Asp Ile Pro Asp
450 455 460

Glu Tyr Lys Leu Leu Asn Glu Lys Ile Ser Glu Gln Phe Asn Ser Glu
465 470 475 480

Glu Val Ser Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Val Thr His Leu Pro Thr
485 490 495

Lys Glu Ser Glu Pro Ala Asn Phe Lys Leu Ala Arg Lys Tyr Leu Gln
500 505 510

Glu Ile Met Glu Ile Val Gly Asp Glu Leu Ser Lys
515 520

<210> 32
<211> 525
<212> PRT
<213> nežinomas

<220>
<223> Bacillus stearothermophilus NUB36

<400> 32

Ala Lys Tyr Gly Arg Gly Lys Phe Leu Pro His Gln Asn Tyr Ile Asp
1 5 10 15

Tyr Met His Phe Ile Val Asn His Lys Asn Tyr Ser Gly Met Pro Asn
20 25 30

Ala Ile Gly Glu Asp Gly Arg Ile Asn Trp Gln Val Ser Ser Gly Lys
35 40 45

Thr Thr Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Trp Trp Glu
50 55 60

Lys Lys Ala Asp Glu Leu Asn Leu Pro Gly Thr Gly Asn Ser Asn Lys

65 70 75 80

Arg Phe Ser Leu Ala Ala Arg Leu Ile His Pro Thr Gly Gln Arg Pro
85 90 95

Cys Arg Leu Cys Gly Lys Tyr Gln Tyr Val Gly Tyr Met Tyr Val Ser
100 105 110

His Asn Leu Tyr Lys Arg Trp Ser Lys Ile Thr Gly Arg Glu Asp Leu
115 120 125

Phe Phe Lys Lys Gln Asn Ile Ile Glu Ala Ala Asn Ile Phe Lys Ser
130 135 140

Ile Met Gly Glu Gln Ala Leu Ile Asn Glu Leu Thr Thr Ile Phe Pro
145 150 155 160

Glu Arg Lys Asp Tyr Phe Asn Arg Leu Pro Asn Ile Glu Asp Phe Phe
165 170 175

Val Ser Ser Ser His Ile Lys Asn Asn Gly Asn Tyr Ile Ser Pro Gly
180 185 190

Phe Met Ala Asn Pro Pro Asp Arg Leu Asp Gly Phe His Asp Tyr Gly
195 200 205

Ile Cys Cys Arg Lys Glu Lys Asp Pro Gly Arg His Asp Asp Asn Met
210 215 220

Arg Leu Tyr Asn His Asp Arg Arg Ala Phe Met Trp Trp Ser Glu Gly
225 230 235 240

Asp Trp Ala Leu Ala Asp Ala Leu Tyr Asn Lys Ala Gly Ala Gly Lys
245 250 255

Cys Ala Asp Pro Asp Cys Gln Lys Glu Val Glu Lys Ile Ser Pro Asp
260 265 270

His Val Gly Pro Ile Ser Cys Gly Phe Lys Gln Ile Pro Phe Phe Lys
275 280 285

Pro Leu Cys Ala Ser Cys Asn Ser Ala Lys Asn Arg Arg Phe Ser Tyr
290 295 300

Gln Asp Val Lys Glu Leu Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Gly Asp Ser
305 310 315 320

Val Ala Ser Trp Gln Val Arg Ala Leu Trp Asp Asn Cys Lys His Leu
325 330 335

LT 5262 B

Val Lys Asn Asp Asp Asp Ser Lys Leu Leu Ser Asn Leu Met Arg Ser
340 345 350

Leu Gln Asp Tyr Tyr Leu Arg Ser Leu Tyr Lys Leu Tyr Ser Asn Gly
355 360 365

Phe Ala His Leu Leu Ser Tyr Phe Leu Thr Pro Glu Tyr Ala His Tyr
370 375 380

Lys Ile Thr Phe Glu Gly Leu Asn Thr Ser Thr Leu Glu Tyr Glu Arg
385 390 395 400

Tyr Tyr Lys Thr Phe Lys Lys Thr Lys Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ala
405 410 415

Arg Ile Val Arg Ile Ala Phe Glu Glu Leu Glu Ile Tyr Asn Ser Lys
420 425 430

Asp Ile Asn Glu Arg Lys Leu Ile Lys Phe Asp Thr Ser Ser Trp Glu
435 440 445

Lys Asp Phe Glu Asn Ile Ile Ser Tyr Ala Thr Lys Asn Leu Ser Leu
450 455 460

Asp Glu Glu Ala Ser Lys Trp Asn Lys Val Leu Thr Asp Lys Asn Leu
465 470 475 480

Ser Ser Thr Glu Lys Asp Lys Lys Ile Ser Ser Leu Leu Glu Asp Lys
485 490 495

Asn Tyr Glu Val Asn Lys Lys Gln Phe Tyr Ile Leu Lys Asp Leu Leu
500 505 510

Val Glu His Phe Asn Lys Ile Gly Glu Gln Ile Ala Lys
515 520 525

<210> 33
<211> 33
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinė

<400> 33
aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtc

33

<210> 34
<211> 16
<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinė

<400> 34

gggagctgca tgtgtc

16

<210> 35

<211> 33

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinė

<400> 35

aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtc

33

<210> 36

<211> 25

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> pradmuo

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (22)..(22)

<223> polimerazės pagalba pridėtas nukleotidas

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (23)..(25)

<223> n=g,a,c or t

<400> 36

aagctgtgac cgtctccggg aannn

25

<210> 37

<211> 470

<212> PRT

<213> nežinomas

<220>

<223> Bacillus stearothermophilus 6-55

<400> 37

Glu Tyr Gly Gln Gly His Pro Ile Phe Leu Glu Tyr Ala Glu Gln Ile

1 5 10 15

Ile Gln His Lys Glu Tyr Gln Gly Met Pro Asp Leu Arg Tyr Pro Asp

20 25 30

Gly Arg Ile Gln Trp Glu Ala Pro Ser Asn Arg Lys Ser Gly Ile Phe

35 40 45

LT 5262 B

Lys Asp Thr Asn Ile Lys Arg Arg Lys Trp Trp Glu Gln Lys Ala Ile
50 55 60

Ser Ile Gly Ile Asp Pro Ser Ser Asn Gln Trp Ile Ser Lys Thr Ala
65 70 75 80

Lys Leu Ile His Pro Thr Met Arg Lys Pro Cys Lys Lys Cys Gly Arg
85 90 95

Ile Met Asp Leu Arg Tyr Ser Tyr Pro Thr Lys Asn Leu Ile Lys Arg
100 105 110

Ile Arg Lys Leu Pro Tyr Val Asp Glu Ser Phe Glu Ile Asp Ser Leu
115 120 125

Glu His Ile Leu Lys Leu Ile Lys Arg Leu Val Leu Gln Tyr Gly Asp
130 135 140

Lys Val Tyr Asp Asp Leu Pro Lys Leu Leu Thr Cys Lys Ala Val Lys
145 150 155 160

Asn Ile Pro Arg Leu Gly Asn Asp Leu Asp Thr Trp Leu Asn Trp Ile
165 170 175

Asp Ser Val Tyr Ile Pro Ser Glu Pro Ser Met Leu Ser Pro Gly Ala
180 185 190

Met Ala Asn Pro Pro Asp Arg Leu Asp Gly Phe His Ser Leu Asn Glu
195 200 205

Cys Cys Arg Ser His Ala Asp Arg Gly Arg Trp Glu Lys Asn Leu Arg
210 215 220

Ser Tyr Thr Thr Asp Arg Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Val Asp Gly Asp
225 230 235 240

Trp Val Ala Ala Asp Lys Leu Met Gly Leu Ile Arg Thr Asn Glu Gln
245 250 255

Ile Lys Lys Glu Thr Cys Leu Asn Asp Asn His Pro Gly Pro Cys Ser
260 265 270

Ala Asp His Ile Gly Pro Ile Ser Leu Gly Phe Val His Arg Pro Glu
275 280 285

Phe Gln Leu Leu Cys Asn Ser Cys Asn Ser Ala Lys Asn Asn Arg Met
290 295 300

Thr Phe Ser Asp Val Gln His Leu Ile Asn Ala Glu Asn Asn Gly Glu
305 310 315 320

Glu Val Ala Ser Trp Tyr Cys Lys His Ile Trp Asp Leu Arg Lys His
325 330 335

Asp Val Lys Asn Asn Glu Asn Ala Leu Arg Leu Ser Lys Ile Leu Arg
340 345 350

Asp Asn Arg His Thr Ala Met Phe Ile Leu Ser Glu Leu Leu Lys Asp
355 360 365

Asn His Tyr Leu Phe Leu Ser Thr Phe Leu Gly Leu Gln Tyr Ala Glu
370 375 380

Arg Ser Val Ser Phe Ser Asn Ile Lys Ile Glu Asn His Ile Ile Thr
385 390 395 400

Gly Gln Ile Ser Glu Gln Pro Arg Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Glu Gln
405 410 415

Lys Ala Arg Arg Met Arg Ile Gly Phe Glu Ala Leu Lys Ser Tyr Ile
420 425 430

Glu Lys Glu Asn Arg Asn Ala Leu Leu Val Ile Asn Asp Lys Ile Ile
435 440 445

Asp Lys Ile Asn Glu Ile Lys Asn Ile Leu Gln Asp Ile Pro Asp Glu
450 455 460

Tyr Lys Leu Leu Asn Glu
465 470

<210> 38

<211> 449

<212> PRT

<213> nežinomas

<220>

<223> Bacillus stearothermophilus A664

<400> 38

Glu Glu Arg Glu Trp His Pro Lys Phe Ile Glu Tyr Met Asp Phe Ile
1 5 10 15

Ile Gln His Pro Asn Tyr Lys Gly Leu Pro Ile Thr Lys Lys Ser Asp
20 25 30

Gly Ser Trp Ser Trp Phe Gly Thr Lys Lys Thr Gln Ile Gly Lys Ala
35 40 45

LT 5262 B

Arg Ile Ala Trp Cys Glu Asn Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Pro Ile
50 55 60

Glu Pro Gly Val Tyr Ala Asn Val Met Arg Glu Ile His Pro Thr Lys
65 70 75 80

Trp Lys Val Cys Gln Thr Cys Gly His Ser Met Ser Ile Tyr Tyr His
85 90 95

Tyr Pro Ser Ala Asn Phe Leu Lys Ala Leu Lys Lys Glu Phe Gly Val
100 105 110

Glu Tyr Thr Glu Val Asp His Ile Ala Asp Ile Trp Asp Asp Leu Leu
115 120 125

Ser Arg Gly Phe Ser Asn Asn Lys Ile Ala Ser Phe Leu Ile Lys Lys
130 135 140

Gly Glu Leu Asp Leu Asn Ala Lys Thr Ser Ser Lys Asp Glu Val Ile
145 150 155 160

Tyr Glu Leu Glu Ser Val Cys Arg Asn Lys Gly Lys Lys Ile Leu Ser
165 170 175

Pro Gly Ala Met Ser Asn Phe Pro Asp Arg Phe Asp Gly Phe His Thr
180 185 190

Tyr Asn Arg Cys Cys Arg Ala Ser Gln Asp Lys Gly Arg Ser Lys Glu
195 200 205

Asn Leu Lys Ser Tyr Thr Lys Asp Arg Arg Ala Tyr Glu Tyr Trp Ser
210 215 220

Asp Gly Asn Ile His Ala Ala Asn Gln Phe Met Gly Ser Pro Phe Phe
225 230 235 240

Asn Asn Ile Ser Ala Asp His Ile Gly Pro Ile Ser Leu Gly Phe Val
245 250 255

His Asp Pro Arg Tyr Leu Gln Pro Met Ser Gly Gly Asp Asn Ser Ser
260 265 270

Lys Arg Asp Arg Leu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Lys Ile Ile Glu Thr
275 280 285

Glu Lys Arg Thr Asn Val Tyr Pro Met Ser Trp Tyr Ser Lys Leu Ile
290 295 300

Trp Glu Tyr Ile Lys Lys Asn Tyr Ser Thr His Lys Ser Leu Ile Ser
305 310 315 320

LT 5262 B

Gly Val Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Gln Asn Met Ser Asn Phe Met Tyr
325 330 335

Ile Leu Trp Tyr Ile Leu Glu His Cys Asn Gln Asp Gly Glu His Phe
340 345 350

Leu Glu Glu Ala Leu Leu Lys Pro Asn Tyr Asp Tyr Phe Gln Tyr Ser
355 360 365

Tyr Thr Phe Asn Glu Leu Gly Glu Ile Val Ser Ile Asn Pro Arg His
370 375 380

Phe Thr Asp Arg Asn Gln Tyr Glu Thr Glu Arg Tyr Lys Arg Ile Ala
385 390 395 400

Phe Glu Ser Val Tyr Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Asn Arg Asn Ile Lys
405 410 415

Ala Asn Leu Ile Asp Asn Glu Gln Arg Met Leu Asn Lys Leu Cys Gln
420 425 430

Glu Ile Ser Ser Gly Val Pro Val Glu Gln Cys Lys Lys Leu Leu Ile
435 440 445

Glu

<210> 39
<211> 23
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinė

<400> 39
ggtctcgcgg taccattgca gca

23

<210> 40
<211> 20
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (17)..(17)
<223> polimerazės pagalba pridėtas nukleotidas

<220>
 <221> įvairūs požymiai
 <222> (18)..(20)
 <223> n=g,a,c or t

<400> 40
 tgctgcaatg ataccgannn

20

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinė

<400> 41
 cgtgggtctc gcggtatcat t

21

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<220>
 <221> įvairūs požymiai
 <222> (16)..(16)
 <223> polimerazės pagalba pridėtas nukleotidas

<220>
 <221> įvairūs požymiai
 <222> (17)..(19)
 <223> n=g,a,c or t

<400> 42
 cgtgggtctc gcggtannn

19

<210> 43
 <211> 11
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinė

<220>
 <221> įvairūs požymiai
 <222> (4)..(8)
 <223> n=g,a,c or t

<400> 43
 cgannnnntg c

11

<210> 44
 <211> 11

<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinė

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (3)..(6)
<223> n=g,a,c or t

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (10)..(10)
<223> y=c or t

<400> 44
acnnngtay c

Fig. 1

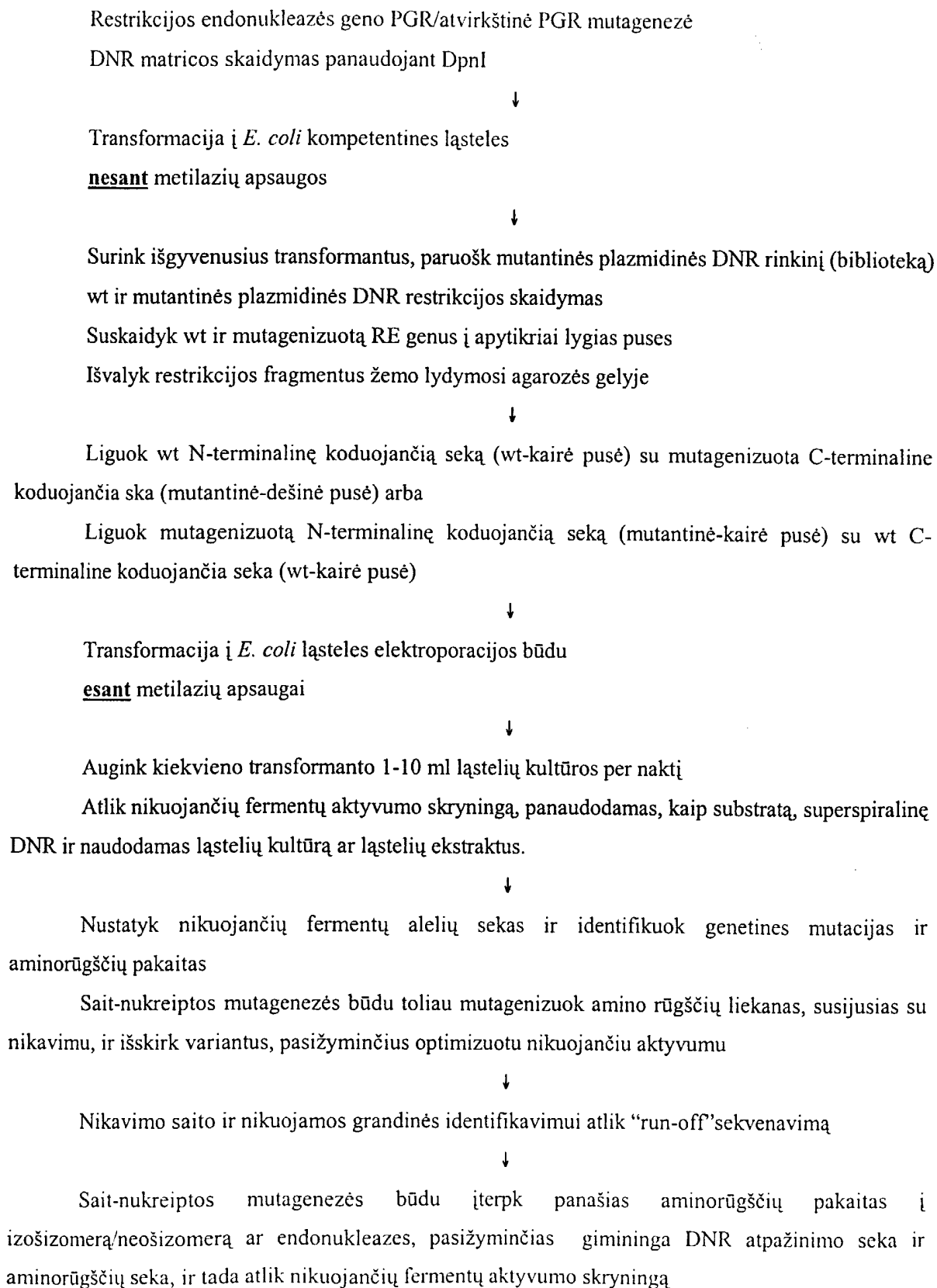


Fig. 2

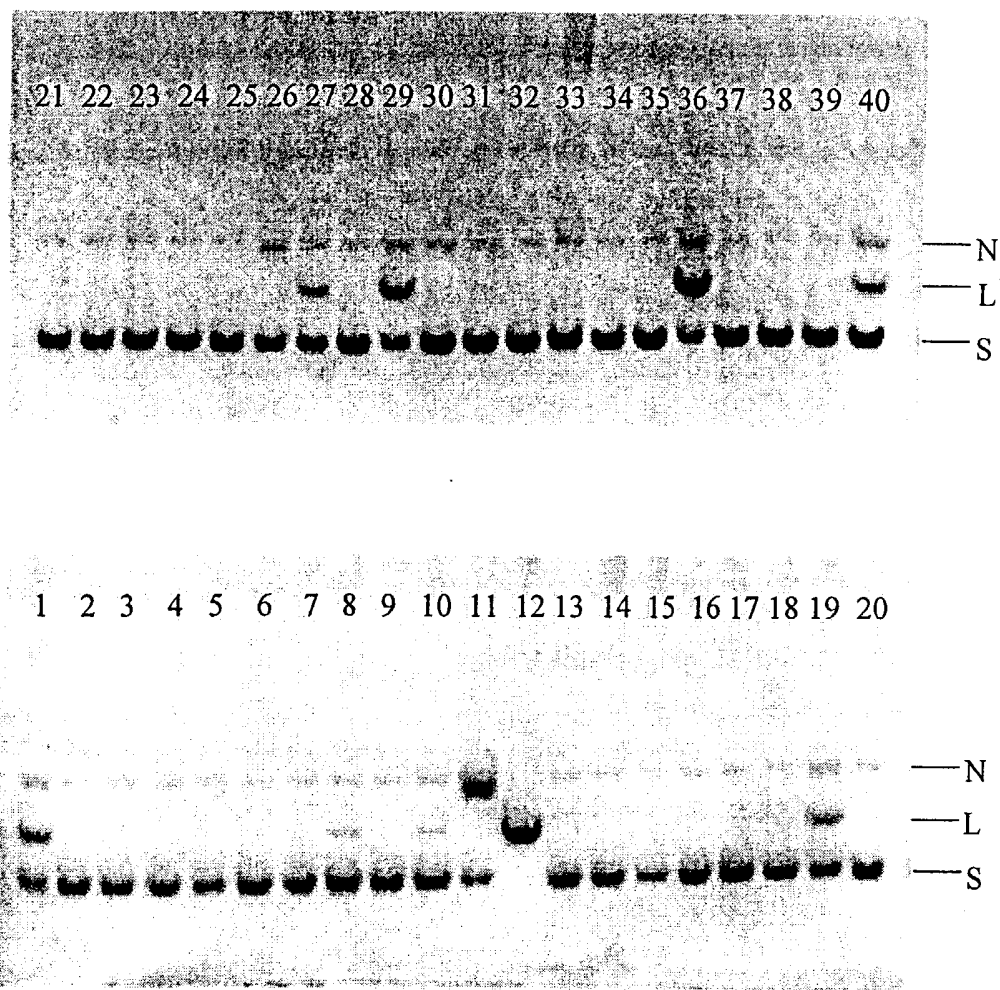


Fig. 3

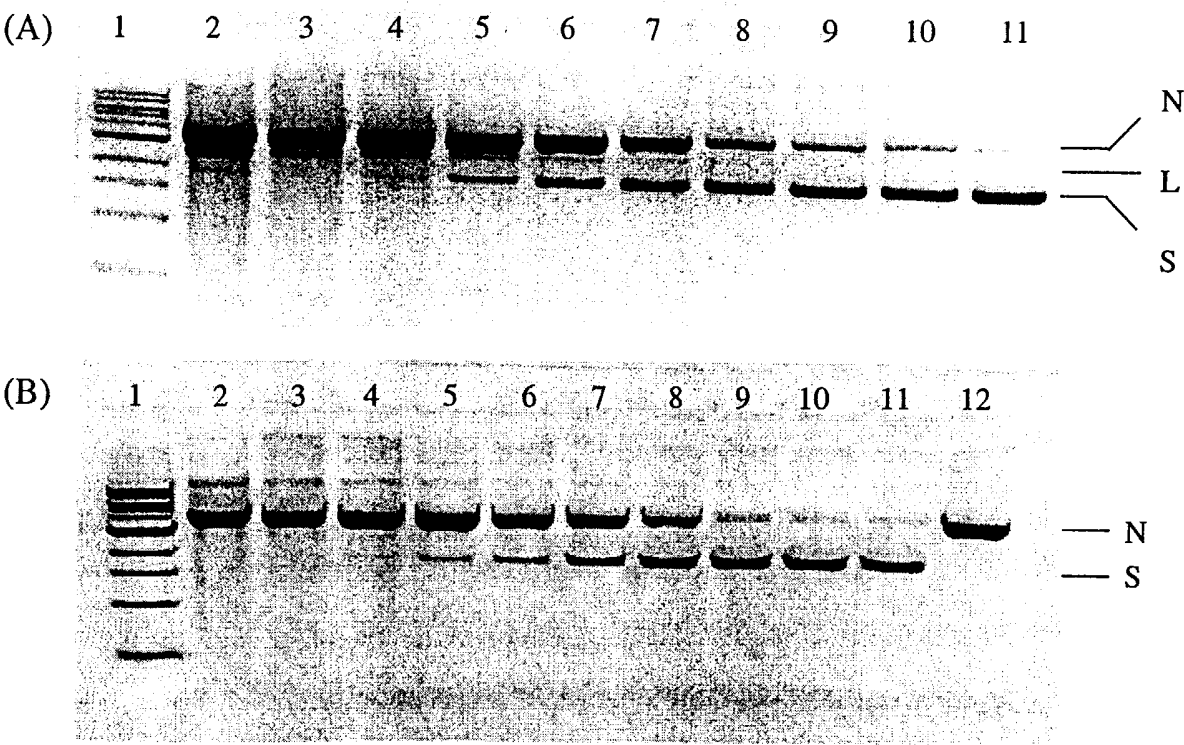


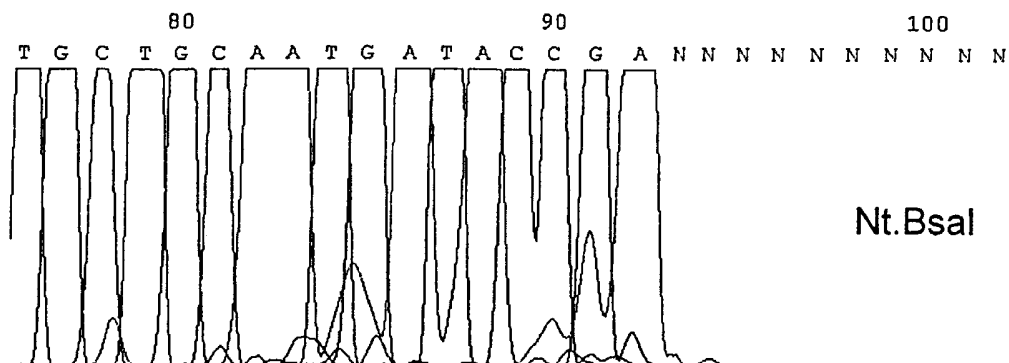
Fig. 4

5' **GGTCTCG**CGGTATCATTGCAGCA 3' (seka ID Nr. 27)
 3' CCAGAGCGCCATAGTAACGTCGT 5'

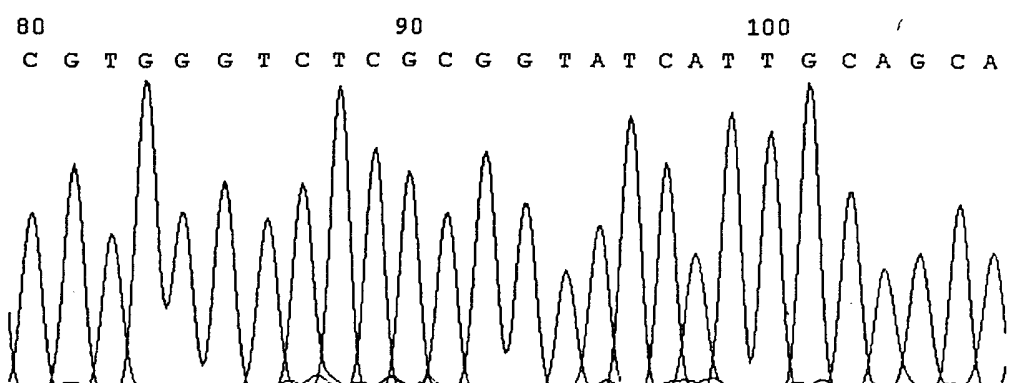
Nt.Bsal
 gelyje išvalytas nikuotas produktas
 termociklinis sekvenavimas

3'ACGACGTTACTATGGC 5' (nikuota matrica)

→ 5'tgctgcaatgatacc(a)nnn 3' ("run-off" seka)
 pradmuo (seka ID Nr. 28)



nikuotos viršutinės grandinės "run-off" sekvenavimas



seka, nustatyta naudojant intaktinę apatinę grandinę kaip matricą

Fig. 5

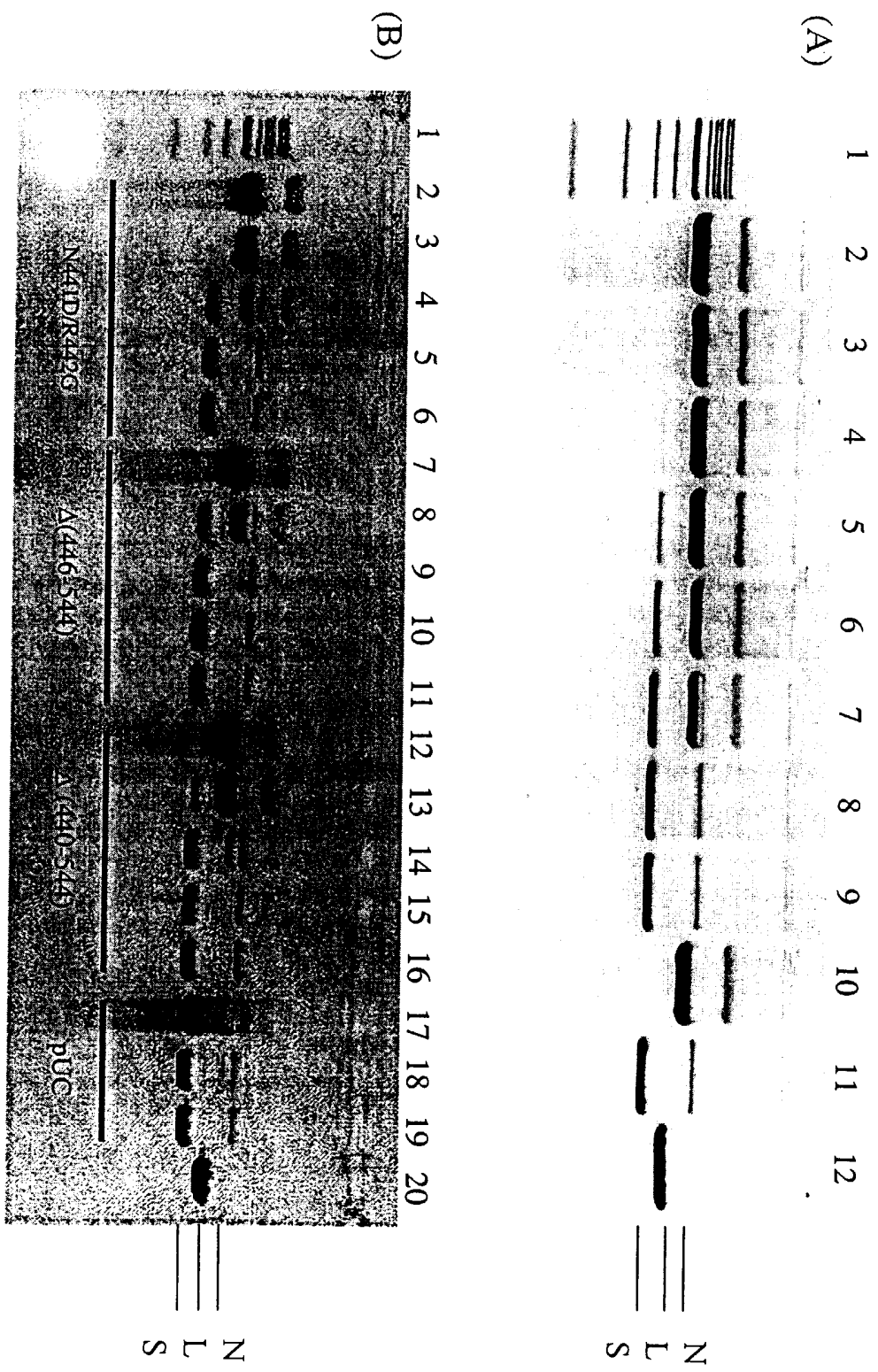


Fig. 6

5'CGTGGGTCTCGCGGTATCATT 3' (seka ID Nr. 29)

3'GCACCCAGAGCGCCATAGTAA 5'

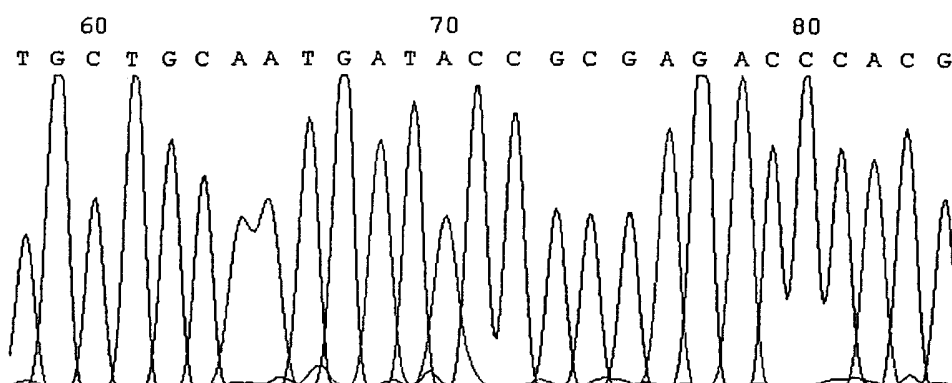


Nb.BsaI
gelyje išvalytas nikuotas produktas
termociklinis sekvenavimas

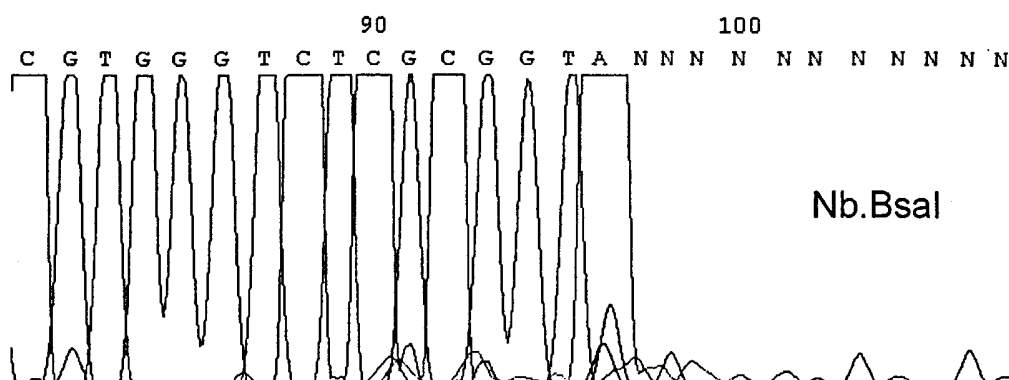
3'GCACCCAGAGCGCCA

5'(nikuota matrica)

—→ 5'cgtggaatctcagcaat(a)nnn 3' ("run-off" seka)
pradmuo (seka ID Nr. 30)



seka, nustatyta naudojant intaktinę viršutinę grandinę kaip matricą



nikuotos apatinės grandinės "run-off" sekvenavimas

Fig. 7

WT BsaI 544 aa

B36: Nt.BsaI (S128L/R236G)

* *

B3: Nt.BsaI (K150R/R236G)

* *

perdarytas Nt.BsaI (R236D)

*

A11, Nb.BsaI (N441D/R442G)

**

perdarytas Nb.BsaI (R442G)

*

A57 (delecijos mutantas) : 1-439 Δ (440-544), Nb.BsaI

A26 (delecijos mutantas) : 1-445 Δ (446-544)

Fig. 8 - **BsaI** (seka ID Nr. 31) / **BsmBI** (seka ID Nr. 32)

BsaI 5 AEYGQG...HPIFLEYAEQIIQHKEYQGMPLDRYPDGRIQWEAPSNRKS 50
 |.|||. | :::| | : || | |||. |||| | : |. |.
BsmBI 2 AKYGRGKFLPHQNYIDYMHFIVNHKNYSGMFNAIGEDGRINWQV.SSGKT 50
 51 GIFKDTNIKRRKWWEQKAISIGI..DPSSNQWISK TAKLIHPTMRKPCKK 98
 | : | .|||.|| : : .||. | | :|||| | :||:
 51 TSFYEYYQARFEWWEKKADELNLP GTGNSNKRFSLAARLIHPTGQRPCRL 100
 99 CGRIMDLRYSYPTKNLIKRIKLP.YVDESFEIDSLEHILKLIKRLVLQY 147
 ||: . | | . || || | : | | . : : | :.
 101 CGKYQYVGMYVSHNLYKRW SKITGREDLFFKKQNIIEANIFK SIM... 147
 148 GDKVYDDL PKLLTCKAVKNIPRLGNDLDTWLNWIDSVYIPSEPSMLSPGA 197
 | : . . : . || | | . : | : | . . : |||
 148 GEQALINELTTIFPERKDYFNRLPNIEDF...FVSSSHIKNNGNYISPGF 194
 198 MANPPDRLDGFHSLNECCRSHADRGRWEKNLRSYTTDRRAFEYWVDGDWV 247
 ||||| ||||| || | || : | : | | |||| | : |||
 195 MANPPDRLDGFHDYGICCRKEKDPGRHDDNMRLYNHDRRAFMWWSEG DWA 244
 248 AADKLMGLIRTNEQIKKETCLNDNHPGPCSADHIGPISLG FVHRPEFQLL 297
 || | . : | : | ||:|||| || | |. |
 245 LADALYNKAGAGKCADPD.CQKEVE..KISPDHVGPI SCGFKQIPFFKPL 291
 298 CNSCNSAKNNRMTFSDVQH LINAEN.NGEEVASWYCKHIWDLRKHDVKNN 346
 | ||||| | . : ||. | : || | : |||| : : || || |||. |
 292 CASCNSAKNRRFSYQDVKELLKYENYTGDSVASWQVRALWDNCKHLVKND 341
 347 ENALRLSKILRDNRHTAMFILSELLKDNHYLFLSTFLGLQYAERSVSFSN 396
 :.. || : | . : | . | . || || : || :. |
 342 DDSKLLSNLMRSLQDY YLRSLYKLYSNGFAHLLSYFLTPEYAHYKITFEG 391
 397 IKIENHIITGQISEQPRDTKYTEEQKARRMRIGFEALKSYIEKE.NRNAL 445
 : : . : : || | || . || || |. | | : | |
 392 LNTST.LEYERYYKTFKKTSTSSLAARIVRIA FEELEIYNSKDINERKL 440
 446 LVINDKIIDKINEIKNILQ.....DIPDEYKLLNEKISEQFNSEEVSD E 489
 : . : | : . || : : : | | . : : . | |.
 441 IKFDTSSWEK..DFENIISYATKNLSLDEEASKWNKVLTDKNLSSTEKDK 488
 490 LLRDLVTHLPTKESEPANFKLARKYLQEIMEIVGDEL SK 528
 : |. | | : : | | : | : : . |
 489 KISSLLED.KNYEVNKKQFYILKDLLVEHFNKIGE QIAK 526

Fig. 9

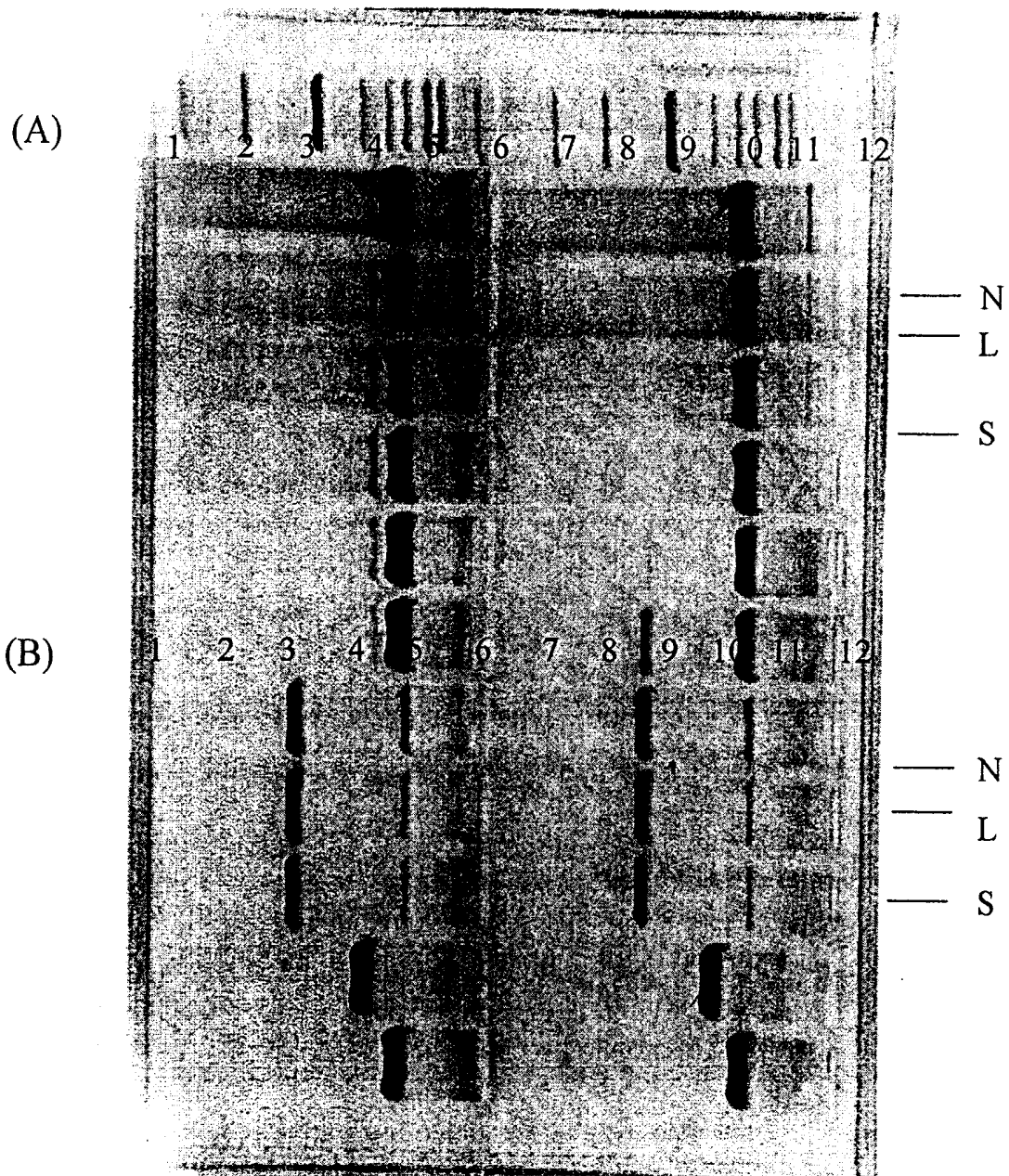


Fig. 10

↓
5' AAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC

3'

(seka ID Nr. 33)

3' TTCGACACTGGCAGAGCCCTCGACGTACACAG

5'

Nt BsmBI

(gelyje išvalytas nikuotas produktas

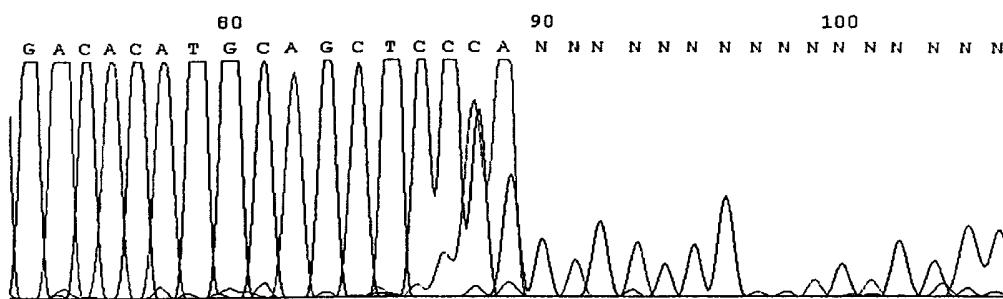
termociklinis sekvenavimas

nikuota matrica 5' GGGAGCTGCATGTGTC 3'

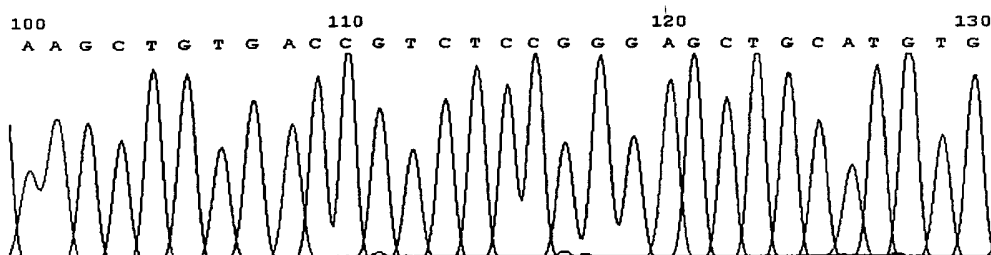
(seka ID Nr. 34)

("run-off" seka) 3'nnn(a)ccctcgacgtacacag 5'

←
pradmuo



"run-off" sekvenavimas naudojant nikuotą viršutinę grandinę kaip matricą



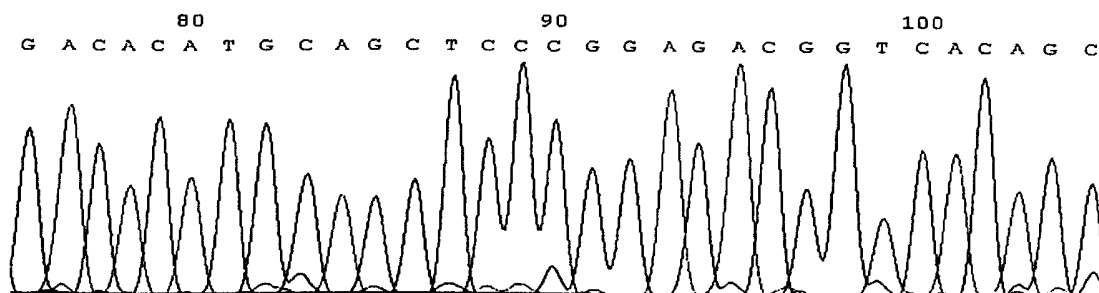
seka, nustatyta naudojant intaktinę apatinę grandinę kaip matricą

Fig. 11

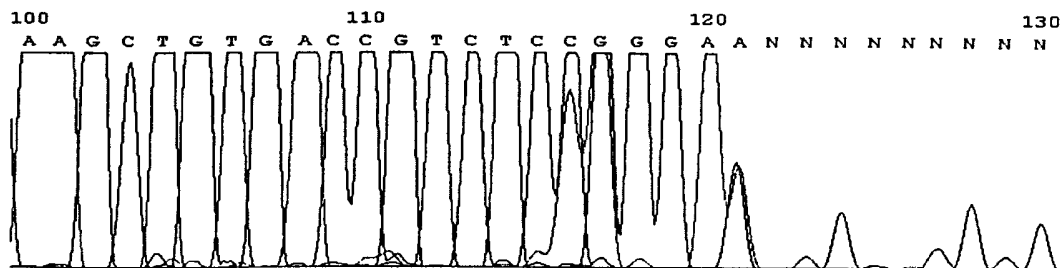
5' AAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC 3'
(seka ID Nr. 35)
3' TTCGACACTGGCAGAGGCCCTCTCGACGTACACAG 5'

Nb.BsmBI
gelyje išvalytas nikuotas produktas
termociklinis sekvenavimas

(nikuota matrica) 3' TTCGACACTGGCAGAGGCCCT 5'
“run-off” seka 5'-aagctgtgaccgtctccggga(a)nnn 3'
(seka ID Nr. 36) pradmuo



seka, nustatyta naudojant intaktinę viršutinę grandinę kaip matricą



“run-off” sekvenavimas naudojant nikuotą apatinę grandinę kaip matricą

Fig. 12 BsaI (seka ID Nr. 37) ; BsmAI (seka ID Nr. 38)

BsaI 6 EYGQGHPIFLEYAEQIIQHKEYQGMPDLRYPDGRIQWEAPSNRKSGIFKD 55
| : || |:|| : |||| |.:| : || | :|. | |
BsmAI 4 EEREWHPKFIEYMDFIIQHPPNYKGLPITKSDG..SWSWFGTKKTQIGK. 50
56 TNIKRRKWWEQKAISIGIDPSSNQWISKTAkliHPTMRKPCKKCGRIMDL 105
| | | || :| | . : |||| | |. || | :
51 ...ARIAWCENKAKELGF.PIEPGVYANVMREIHPTKWKVCQTCGHMSI 96
106 RYSYPTKNLIKRIKLPYVDESFEIDSLEHILKLIKRLVLQYGDKVYDDL 155
| ||. | :| ::| : | .:| | : | | | . :
97 YYHYPANFLKALKK....EFGVEYTEVDHIADIWDDL.LSRGFS.NNKI 140
156 PKLLTCKAVKNIPRLGNDLDTWLNWIDSVYIPSEPSMLSPGAMANPPDRL 205
| | .: . | : ::|| .|||||. | |||
141 ASFLIKKGELDLNAKTSSKDEVIYELESVCRNKGKKILSPGAMSNFPDRF 190
206 DGFHSLNECCRSHADRGRWEKNLRSYTTDRRAFEYWVDGDWVAADKLMGL 255
||||. | |||. |:| | ..||:| | |||:| | | |. ||.. ||
191 DGFHTYNRCCRASQDKGRSKENLKSyTKDRRAYEYWSGNIHAANQFMG. 239
256 IRTNEQIKKETCLNDNHPGPCSADHIGPISLGFVHRPEF.QLLCNSCNSA 304
|. . ||||| | | | | | | | | | | : | : ||.
240SPFFNN.....ISADHIGPISLGFVHDPRYLQPMSSGDNSS 275
305 KNNRMTFSDVQHLINAENNGEEV.ASWYCKHIWDLRKHDVKNENALR.. 351
| .|: |:: :| | || | ||: | :
276 KRDLQLDDIEKIIETEKRTNVYPMSWYSKLIWEYIKKNYSTHKSLISGV 325
352 LSKILRDNRHTAMFILSELL....KDNHYLFLSTFL..GLQYAERSVSFS 395
|: | |::| :| .| : | | : | .|. |.
326 YRDALKQNMSNFMYILWYILEHCNQDGEHFLEEALLKPNYDYFQYSYTFN 375
396 NIKIENHIITGQI.SEQPRD.TKYTEEQKARRMRIGFEALKSYIEKENRN 443
: |::| | || | : : | || ||.. | |||||
376 EL.....GEIVSINPRHFTDRNQYETERYKRIAFESVYDYNEKENRN 417
444 ..ALLVIND.KIIDKINEIKNILQDIPDEY..KLLNE 475
| |: |: ::. |: . | :| | ||| |
418 IKANLIDNEQRMNLKL..CQEISSGVPVEQCKKLLIE 452

Fig. 13

(A)

(B)

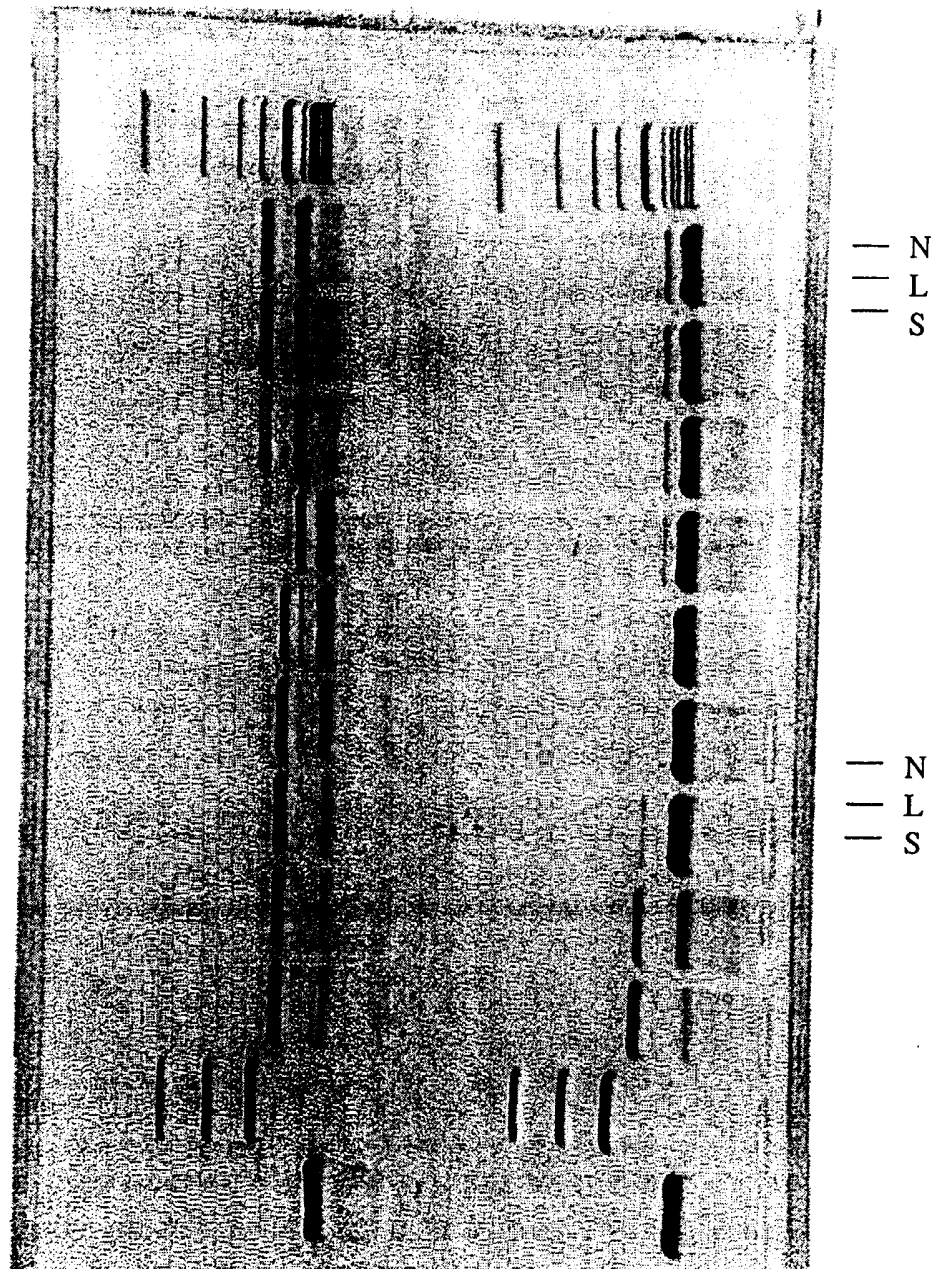


Fig. 14

↓
5' GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA 3'
(seka ID Nr. 39)

3' CCAGAGCGCCATAGTAACGTCGT 5'

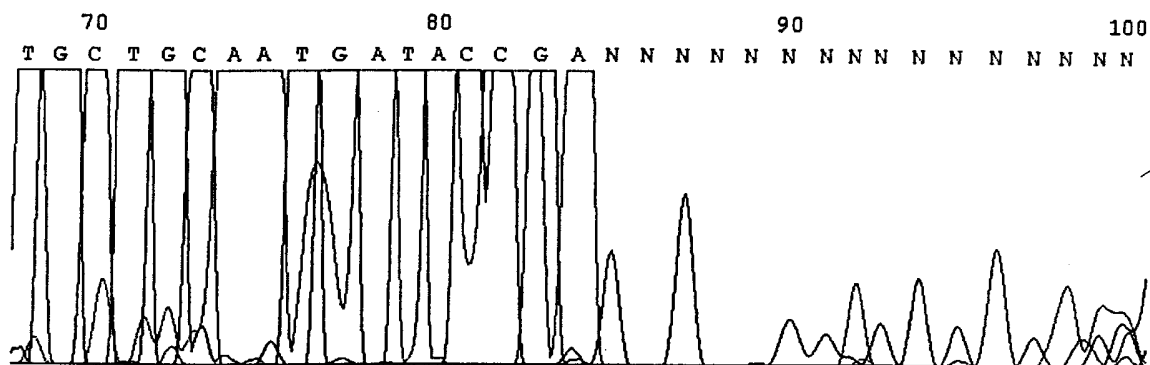
Nt.BsmAI

gelyje išvalytas nikuotas produktas

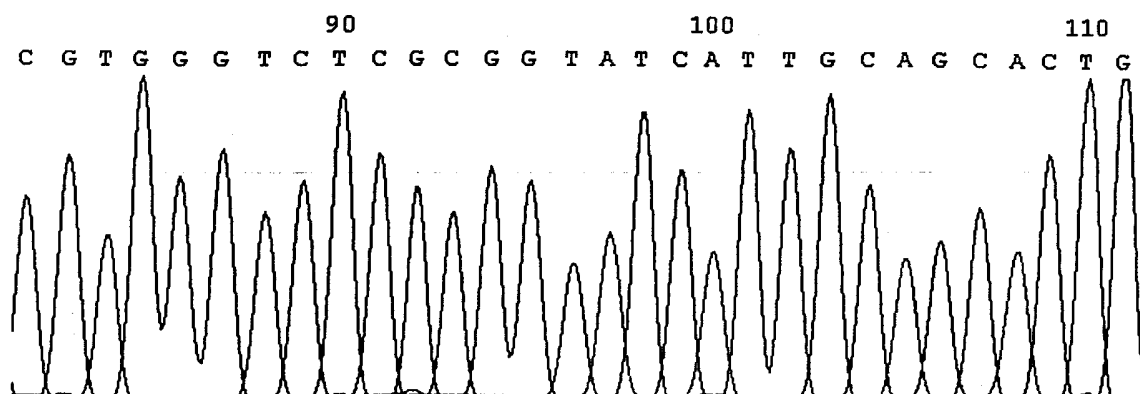
termociklinis sekvenavimas

→ 3' ACGACGTTACTATGGC 5' (nikuota matrica)

pradmuo → 5'tgctgcaatgataccg(a)nnn 3' ("run-off" seka)
(seka ID Nr. 40)



"run-off" sekvenavimas naudojant nikuotą viršutinę grandinę kaip matricą



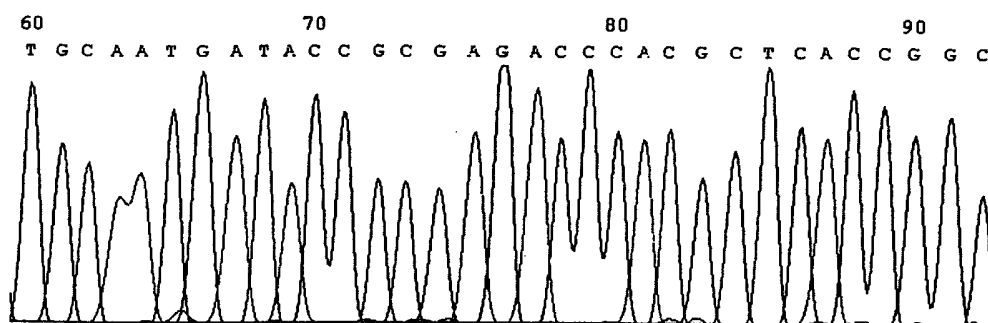
seka, nustatyta naudojant intaktinę apatinę grandinę kaip matricą

Fig. 15

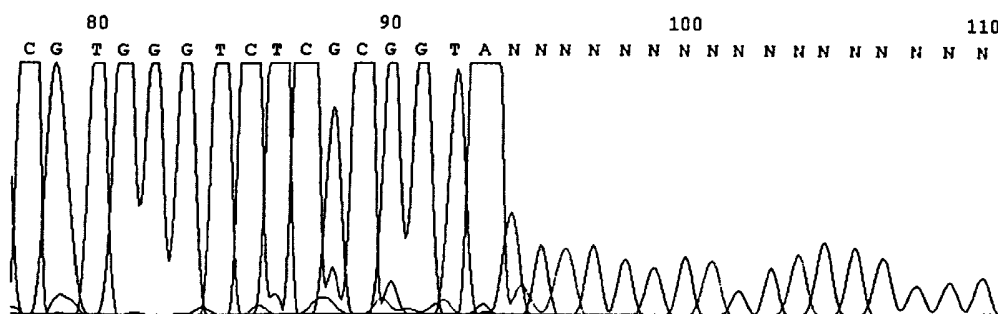
5'CGTGGGTCTCGCGGTATCATT 3'
(SEQ ID NO:41)
3'GCACCCAGAGCGG[↑]CATAGTAA 5'

Nb.BsmAI
gelyje išvalytas nikuotas produktas
termociklinis sekvenavimas

→
pradmuo 3'GCACCCAGAGCGCCA 5' (nikuota matrica)
5'cgtgggtctcgcggt(a)nnn 3' ("run-off" seka)
(SEQ ID NO:42)



seka, nustatyta naudojant intaktinę viršutinę grandinę kaip matricą



nikuotos apatinės grandinės "run-off" sekvenavimas

Fig. 16

