

(19)



(10) **LT 5263 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5263**

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 9/00**
C12N 15/10

(21) Paraiškos numeris: **2004 109**

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

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

(45) Patent 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: **60/530,754, 2003 12 18, US**

(72) Išradėjas:

Shuang Yong XU, US
James SUMUELSON, US

(73) Patent 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:

Grandinės specifiškai nikuojančių endonukleazų konstravimo iš restrikcijos endonukleazų būdas

(57) Referatas:

Būdai, skirti konstravimui naujų grandinei specifinių nikuojančių endonukleazų, pasinaudojant plazmidžių bibliotekos, turinčios atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną, praturtinimu *in vivo*. Plazmidės turi gretimą genui skaldomą arba nikuojamą seką, skaldymui arba nikavimui geno endonukleazės produktu ir antrąją atpažinimo vietą antrajai endonukleazei. Plazmidžių biblioteka naudojama nemodifikuotų ląstelių-šeimininkių transformavimui. Plazmidės iš išaugintų transformuotų ląstelių gali būti analizuojamos *in vitro* būdu dėl nikavimo, nikotos plazmidės surenkamos ir naudojamos transformuoti ląsteles-šeimininkes. Produktas po to surenkamas ir nustatomas endonukleazės viengrandis specifiškumas. Produktas arba klonuojamas po amplifikacijos, arba identifikuojamas, naudojant selektyvų markerį.

Yra daugiau negu 240 II tipo restrikcijos endonukleazė su unikaliomis savybėmis, atrastų kaip iš bakterinių, taip ir iš virusinių šaltinių. Tačiau komerciškai yra gaunami tik septyni nikuojančios fermentai: N.BstNBI, N.AlwI, N.BbvCIA (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); N.Bpu10I (Fermentas Inc., Hanover, MD); ir N.CviQXI (CviNY2A) ir N.CviPII (CviNYSI) (Megabase Research Products, Lincoln, NE (www.cvienzymes.com)). Yra tam tikras skaičius fago koduojamų nikuojančių fermentų, pavyzdžiui bakteriofago ϕ 11 II geno produktas (gpII), kuris yra būtinas virusinės DNR replikacijai. II geno produktas įveda trūkį (+) grandinėje, tuo inicijuodamas riedančio rato replikaciją. Jis taip pat dalyvauja perkeltosios (+) grandinės ligavime, generuojant viengrandę faginę DNR (Geider et al., *J. Biol. Chem.* 257:6488-6493 (1982); Higashitani et al., *J. Mol. Biol.* 237:388-400 (1994)). gpII baltymas ir egzozonukleazė III gali būti bendrai naudojami viengrandės DNR gavimui, kuri naudojama mutagenezei ir kaip matrica naujos DNR grandinės sintezei *in vitro*.

Yra trys pagrindiniai specifiskai DNR grandinės nikuojančių fermentų gavimo šaltiniai. Vienas iš jų – nikuojančių fermentų atrinkimas iš *Chlorella* algae viruso lizatu, iš kurių buvo pradžioje išskirti N.CviQXI (CviNY2A) ir N.CviPII (CviNYSI) (Zhang Y. et al. *Virology*, 240:366-375 (1998); Xia Y. et al. *Nucl. Acids Res.* 16:9477-9487 (1988)). Antrasis šaltinis – bakterijos, kuriose atrasti natūraliai pasitaikantys nikuojančios fermentai N.BstNBI ir N.BstSEI (Morgan R.D. et al. *Biol. Chem.* 381:1123-5 (2000); Abdurashitov, et al., *Mol. Biol. (Mosk)* 30:1261-1267 (1996)). Trečiasis šaltinis – nikuojančių fermentų gavimas baltymų inžinerijos būdu iš egzistuojančių IIA tipo restrikcijos fermentų.

Sekanti klasifikacija yra skirtingų II tipo restrikcijos endonukleazė potipių apibrėžtys (Roberts R.J. et al. *Nucl. Acids Res.* 31:1805-1812 (2003)):

IIA tipo endonukleazėms būdingos asimetrinės DNR atpažinimo sekos. Kirpimo vieta gali būti atpažinimo sekos viduje arba išorėje (už) atpažinimo sekos. Pavyzdžiai yra BsmI (GAATGC 1/-1, viršutinė grandinė kerpama per vieną bazę už atpažinimo sekos, apatinė grandinė kerpama atpažinimo sekoje), AclI (CCGC -3/-1), BssSI (CACGAG -5/-1) ir SapI (GCTCTTC 1/4). Svarbiausiai, IIA tipas apima IIG, IIH, IIS ir IIT restrikcijos endonukleazė tipus. Todėl daugelis fermentų patenka daugiau negu į vieną potipį. Pavyzdžiui, SapI gali būti identifikuotas kaip IIA arba IIS tipo fermentas.

IIS tipo restrikcijos endonukleazės turi asimetrines atpažinimo sekas ir DNR kerpa šių atpažinimo sekų išorėje, t.y. kerpa nuo 1 iki 20 bazių atpažinimo sekų išorėje. Pavyzdžiai yra BsmAI (GTCTC 1/5), BsmBI (CGTCTC 1/5), FokI (GGATG 9/13) ir SapI (GCTCTTC 1/4).

IIG tipo restrikcijos endonukleazės turi sulietus endonukleazės ir metilazės domenus. Tuo būdu, IIG tipo fermentai turi ir endonukleazinį ir metilazinį aktyvumus ir šie aktyvumai gali būti stimuliuojami pridėdant S-adenozilmetionino. IIG tipo fermentų DNR atpažinimo sekos gali būti simetrinės arba asimetrinės. Pavyzdžiai yra BpmI (CTGGAG 16/14) ir BseRI (GAGGAG 10/8). IIG tipo fermentai gali taip pat priklausyti IIA arba IIS tipams.

IIH tipo restrikcijos endonukleazių genetinė organizacija panaši į I tipo restrikcijos-modifikacijos sistemą. Atpažinimo seka gali būti simetrinė arba asimetrinė. Pavyzdžiai yra BcgI (10/12 CGAN₅TGC 12/10) (SEQ ID NO:27) ir BaeI (10/15 ACN₄GTAYC 12/7) (SEQ ID NO:28).

IIT tipo restrikcijos endonukleazės yra heterodimerai arba tetrameriai (2X heterodimerai). Atpažinimo sekos gali būti simetrinės arba asimetrinės. Pavyzdžiai yra Bpu10I (CCTNAGC –5/-2) ir BslI (CCN7GG) (SEQ ID NO:29).

Būtų pageidautina sukonstruoti didelę įvairovę nikuojančių endonukleazių, išvestų iš restrikcijos endonukleazių su asimetrinėmis atpažinimo sekomis, kurių daugiau kaip 79 IIA tipo endonukleazės žinomos su unikaliomis savybėmis. (<http://rebase.neb.com/rebase/>).

Dauguma šių IIA tipo restrikcijos-modifikacijos sistemų yra klonuotos ir ekspresuotos heterologiškuose šeimininkuose (Rebase). Tuo būdu daugumos IIA tipo restrikcijos fermentų baltymų seka yra žinoma, nors asimetrinio kirpimo mechanizmas paaiškintas tik nedideliame kiekiui fermentų, dalinai IIT tipui. Likusių IIA tipo fermentų (kur fermentai yra atviro skaitymo rėmelio produktai) dominuojantis kirpimo mechanizmas iki šiol yra neaiškus.

Racionaliai suprojektuoti metodai pritaikyti tam tikriems fermentams, kurių pradinės turimos žinios apie dimerizacijos domenus yra tokios, kad gali būti pasiektas domenų atskyrimas. Domenų atskyrimas priklauso nuo santykinai didelio aminorūgščių sekos panašumo tarp planinio fermento varianto ir natūraliai atsiradusio nikuojančio fermento. Pavyzdžiui, Xu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:12990-12995(2001) gavo nikuojantį fermentą N.AlwI domenų atskyrimu tarp AlwI ir homologiško, natūraliai atsiradusio nikuojančio fermento N.BstNBI (GAGTCNNNN^N, (SEQ ID NO:30), [^] žymi trūkio poziciją). Sukonstruotas fermentas N.AiwI negali būti suformuotas iš homodimero ir vien tik nikuoja viršutinę DNR grandinę kaip monomeras.

Besnier et al. *EMBO Report* 2:782-786 (2001); ir Kong et al. U.S. Patentas Nr. 6395523 naudojo kryptingą mutagenezę Mly viršutinę grandinę nikuojančio varianto

sukonstravimui, remdamasis aukštu panašumo laipsniu su natūraliai pasitaikančiu nikuojančiu fermentu N.BstNBI.

Stahl F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6175-80 (1996) išskyrė nikuojantį fermentą iš II tipo restrikcijos endonukleazės EcoRV (kurioje natyvus fermentas formuoja homodimerus ir atpažįsta simetrinę seką GAT/ATC). EcoRV nikuojantis fermentas buvo pagamintas sujungiant subvienetą, turintį neaktyvų katalitinį saitą, su antru subvienetu, turinčiu DNR prisirišimo defektą. Tačiau tokie EcoRV variantai yra nespecifiniai tuo atžvilgiu, kuri grandinė yra nikuojama ir tuo būdu tokių mutantų taikymas DNR manipuliacijoms yra labai apribotas. Priešingai, Heiter et al. (U.S. patento paraiška 20030100094) ir Janulaitis et al. (EP 1176204 A1) inaktyvavo heterodimerinio fermento vieno subvieneto katalitinį centrą, ko pasekoje buvo gauta nikuojanti endonukleazė. Tačiau šis principas yra ribotas IIT tipo fermentams su aiškiai išreikštomis ir išsaugotomis katalitinėmis vietomis.

Priešingai aukščiau aprašytiems būdams, Heitman ir Model aprašė EcoRI restrikcijos endonukleazės atsitiktinę mutagenę (Heitman J. And Model P., *EMBO J.* 9:3369-3378 (1990)), kad būtų nustatyta substrato atpažinimo liekamoji reikšmė. Be jokios nikuojančių variantų selekcijos Heitman et al. atsitiktinai identifikavo nikuojančio aktyvumo variantą (Heitman J. And Model P., *Proteins* 7:185-197 (1990)).

IŠRADIMO SANTRAUKA

Išradimo įgyvendinime, grandinę specifiskai nikuojančių endonukleazių konstravimo būdui numatyti sekantys etapai: a) ląstelių- šeiminių, neturinčių metilazinės apsaugos prieš restrikcijos endonukleazes, transformacija plazmidžių biblioteka, turinčia atsitiktinai mutotą geną, koduojantį restrikcijos endonukleazę, plazmidės įskaitant sekos vietą išorėje geno, kurią skaldo geno koduojama endonukleazė, ir b) transformantų auginimą, plazmidžių išskyrimą iš jų ir fakultatyvaus *in vitro* atrinkimo, kurios plazmidės turi nikotą DNR. Be to būdas apima plazmidžių skaldymą su iš anksto nustatyta grandinę specifiskai nikuojančia endonukleaze. Šios endonukleazės nikavimo vieta yra skirtinga seka, negu atsitiktinai mutagenizuotų restrikcijos endonukleazių kirpimo vieta. Kadangi nikuojančios endonukleazės kerpa priešingą grandinę, negu mutagenizuota restrikcijos endonukleazė, susidaro du lipnūs galai. Reversinis pradmuo, kuris komplementarus lipniam galui šalia geno, arba yra identiškas lipnaus galo daliai arba visam lipniam galui, naudojamas geno amplifikavimui kartu su tiesioginiu pradmeniu, einančiu prieš geną. Amplifikuotas produktas po to klonuojamas. Arba

kitaip, atrenkamas žymėtasis genas gali būti įterptas tarp dviejų lipnių galų plazmidės, kuri po to transformuojama į ląstelę ir identifikuojama selektyvioje terpėje. Sukonstruota nikuojanti endonukleazė taigi, yra gaunama abiem aukščiau aprašytais metodais.

Nikuojantis fermentas gali nikuoti vieną arba daugiau DNR duplexų, RNR/DNR hibridą ir RNR duplexą. Ląstelės-šeimininkės gali būti pasirinktos iš bet kurių bakterijų, naudojamų rekombinantinių restrikcijos endonukleazių ekspresijai. Tinkami promotoriai yra parinkti tokie, kad būtų gaunamas norimas ekspresijos lygis. Plazmidžių biblioteka gali būti sudaryta iš vienos rūšies plazmidžių arba daugybės skirtingų plazmidžių. Kiekviena plazmidė gali turėti vieną atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną arba apimti daugiau negu vieną geną, koduojančius daugybę fermentų arba subvienetų.

Metodo įgyvendinimas apima restrikcijos endonukleazės geno mutagenizavimą, suformuojant deleciją ar inserciją arba vieno ar daugiau nukleotidų pakeitimą. Ypatingai, mutagenizuotas genas gali turėti vieną arba daugybę mutacijų. Mutagenizuotas genas gali turėti deleciją nuo 3 iki 600 nukleotidų ribose.

Išradimo įgyvendinimo metodas apima atrinkimą arba įterpimą restrikcijos endonukleazės kirpimo vietos sekos už geno plazmidėje. Po to kai ląstelės-šeimininkės, turinčios plazmidžių biblioteką, išauginamos, transformantai bendrai sukaupiami ir plazmidės, išskirtos iš šios sankaupos, analizuojamos nustatant plazmidžių koduojamų nikuojančių endonukleazių specifiskumą grandinėms. Nikuojančių endonukleazių išskyrimo efektyvumas gali būti sustiprintas praturtinimo pakopa, kuria plazmidinė DNR išskiriama iš transformantų sankaupos, atskyrus nikuotą DNR nuo superspiralizuotos ir linijinės DNR. Šis atskyrimas gali būti vykdomas elektroforeze agarozės gelyje arba tankio centrifugavimu. Modifikuotos *E. coli* ląstelės transformuojamos nikuota plazmidine DNR ir plazmidės iš šių transformantų arba patys transformantai padalinami į dvi sankaupas taip, kad vieną sankaupą būtų galima testuoti, nustatant viršutinės grandinės skilimo aktyvumą, o kitą sankaupą – nustatant apatinės grandinės skilimo aktyvumą.

Nikuojančios endonukleazės kirpimo specifiskumo grandinei priklausomybę galima nustatyti liguojant viengrandžius adapterius su iš anksto nustatytais lipniais galais. Lipnus galas, prie kurio prisijungia adapteris, susiformuoja, jeigu antroji kirpimo vieta nustatyta iš anksto yra viršutinėje plazmidės grandinėje ir ekspresuota nikuojanti endonukleazė nikuoja apatinę grandinę. Panašiai, jeigu antroji numatyta skilimo vieta yra apatinėje plazmidės grandinėje, gali būti atrinktos ekspresuotos nikuojančios endonukleazės, kurios nikuoja viršutinę grandinę.

DNR, atitinkanti geną, koduojantį nikuojančią endonukleazę su apibrėžtu viengrandžiu nikavimo aktyvumu, gali būti amplifikuota naudojant pradmenis, kurie hibridizuojasi su sekomis į kitą pusę nuo geno, pavyzdžiui su seka prieš geną ir viengrandžio adapteriu arba kur pradmuo prieš geną yra iš esmės identiškas viengrandžio adapterio sekos daliai.

Igyvendinant išradimą, pageidautina mutacija nikuojančioje endonukleazėje, nustatoma sekvenuojant sukonstruotą nikuojančią endonukleazę pagal aukščiau aprašytą metodą, gali būti įvesta kryptingos mutagenezės būdu į restrikcijos endonukleazės izošizmerą arba neošizmerą, taip gaunant nikuojančią endonukleazę. Analogiškai sukonstruotos nikuojančios endonukleazės nikuojantis aktyvumas gali būti sustiprintas arba dvigrandės DNR skilimo aktyvumas sumažintas kryptingos mutagenezės būdu įvedant pageidautiną mutaciją.

Igyvendinant išradimą, numatytas būdas, kuriame mutagenizuotas restrikcijos endonukleazės genas yra IIA tipo endonukleazės genas. Nikuojanti endonukleazė yra termostabili nikuojanti endonukleazė.

Igyvendinant išradimą, numatytas būdas grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės konstravimui, kuris apima: ląstelių-šeimininkių transformaciją plazmidėmis, turinčiomis atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną, ląsteles-šeiminikes stokojančias apsauginio metilinimo; viengrandžio adaptoriaus ligavimą su sukauptomis plazmidėmis, išskirtomis iš išaugusių transformantų nustatymui, kuri plazmidė koduoja restrikcijos endonukleazės viršutinės arba apatinės grandinės variantą; mutagenizuotos restrikcijos endonukleazės geno amplifikavimą ląstelių-šeimininkių transformavimui; nustatymą kuri ląstelė-šeimininkė turi nikuojantį aktyvumą ir jos nikuojantį fenotipą; gavimą sukonstruotos grandinei specifinės nikuojančios endonukleazės.

Igyvendinant būdą, restrikcijos endonukleazė yra SapI, iš kurios išskirtos sukonstruotos nikuojančios endonukleazės yra Nt.SapI ir Nb.SapI.

Igyvendinant išradimą, metodas numatytas įvedimui vieno arba daugiau vietos specifinių trūkių į iš anksto parinktas DNR duplekso grandines, metodas apima DNR duplekso hidrolizę su nikuojančia endonukleaze palankiomis nikavimo aktyvumui sąlygomis.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 parodyta ekspresijos vektoriaus pSAPV6, naudojamo nikuojančio fermento SapI klonų atrinkimui, polilinkerio seka. Pakopos apima: (a) atsitiktinai mutuotos SapI endonukleazės bibliotekos paruošimas pSAPV6, kurioje yra pACYCT7-ter su modifikuotu polilinkieriu; (b) *E. coli* kamieno transformacija, kuriame esminė laukinio tipo SapI klonų ekspresija žudo ląsteles; (c) išaugusių kolonijų surinkimas ir plazmidinės DNR išskyrimas; (d) plazmidžių bibliotekos frakcionavimas elektroforeze agarozės gelyje ir nikuotų plazmidžių išskyrimas; (e) plazmidžių telkinio padalijimas į 2 grupes ir hidrolizė su N.BvbCI A arba SapI nikuotų plazmidžių ištiesinimas ir specifinių iškyšų gavimas **B**; (f) viengrandžio adapterio ligavimas su iškyša; ir (g) darbas su viršutinei ir apatinei grandinei specifinės grandinės amplifikacijos strategija.

Fig. 2 parodyta amplifikavimo strategijos apatinei grandinei specifinių SapI nikuojančio fermento klonų atrinkimo schema. Pakopos apima: (a) ligavimo adapterį su 4 bazių iškyša; (b) Klionovo užpildymo reakcijos panaudojimas; (c) nesuliguoto adapterio pašalinimas, naudojant Spin kolonėlę; (d) PGR amplifikacija; (e) amplifikacijos produkto klonavimas į pSAPV6; (f) T7 ekspresijos kamieno, apsaugoto SapI metiliniu, transformacija; ir (g) ekstraktų nikuojančio aktyvumo tyrimas.

Fig. 3 parodyta amplifikavimo strategijos viršutinei grandinei specifinių SapI nikuojančio fermento klonų atrinkimo schema.

Fig. 4 parodyta pradinis Nb.SapI (33 variantas) išskyrimas. Nikuojantis aktyvumas yra parodomas inkubuojant ląstelių ekstraktą su superspiralizuota pUC19. M takelis yra 1kb DNR diagrama, kurioje yra gerai matoma 3 kb juosta. Nikuota pUC19 forma migruoja aukščiau už 3 kb. 33 takelis turi žymų lygį nikuotos pUC19, išskirtos iš 33 varianto ekstrakto. Kiti takeliai turi tipišką lygį nikuotos pUC19, gautos nespecifiniu nikuojančiu aktyvumu. 39 variantas parodo dvigrandį kirpimo aktyvumą.

Fig. 5 parodyta išvalyto Nb.SapI (33 variantas) titravimas naudojant substratu superspiralizuotą pUC19. M takelis yra 1kb DNR diagrama, kurioje 3 kb juosta yra gerai matoma. 1 takelyje yra neperkirpta pUC19. 2 takelyje pUC19 linearizuota SapI pagalba. 3-8 takeliuose buvo inkubuojama atitinkamai su 4, 2, 1, 0,5, 0,25 ir 0,125 vienetais Nb.SapI (33 variantas) 60 min 37°C temperatūroje.

Fig. 6 parodyta Nb.SapI (33 variantas) nikavimo vietos patvirtinimas "run-off" sekvenavimo metodu. Substratas pUC19 buvo nikuotas su išvalyta 33 varianto dauguma. Nikuotas žiedinis DNR produktas buvo išvalytas iš gelio ir sekvenuotas, naudojant pradmenį,

kuris susieina su SapI kirpimo vieta. Taq DNR polimerazė prideda adenino bazę (A) pradmenis prailginimo produkto gale (DNR transferazinis aktyvumas, nepriklausomas nuo matricos).

Fig. 7 parodo Nt.SapI pradinio išskyrimo variantus, turinčius E250K pakeitimą. Nikuojamntis aktyvumas atskleidžiamas inkubuojant mažėjantį tūrį ląstelių ekstrakto su superspiralizuota pUC19. Klonai Nr. 2, 9, 11, 15 ir 18 buvo sekvenuoti, tam, kad būtų surasti dažni pakitimai K80E, E250K ir K273R. M takelyje yra 1 kb DNR diagrama, kurioje gerai matoma 3 kb juosta. Nikuota pUC19 forma juda > 3 kb.

Fig. 8 Nt.SapI (E250K) aktyvumo tyrimas. Nikuojantis aktyvumas parodomas inkubuojant mažėjantį ląstelių ekstrakto kiekį su superspiralizuota pUC19. M takelis yra 1 kb DNR diagrama, kurioje gerai matoma 3kb juosta. 1 takelyje yra neperkirpta pUC19. 2 takelyje – SapI linearizuota pUC19. 3–8 takeliuose buvo atitinkamai inkubuota su 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ir 0.0625 µl Nt.SapI 60 min. 37° C temperatūroje.

Fig. 9. parodo “run-off” sekvenavimą, kuriuo nustatoma Nt.SapI (E250K) nikavimo vieta. pUC19 substratas buvo nikuojamas ląstelių ekstraktu, turinčiu E250K variantą. Nikuotos žiedinės DNR produktas buvo išvalytas iš gelio ir sekvenuotas, naudojant pradmenį, kuris susieina su SapI kirpimo vieta. Taq DNR polimerazė prideda adeniną (A) DNR gale (DNR transferazinis aktyvumas, nepriklausomas nuo matricos).

Fig. 10 parodyta laukinio tipo *sapIR* geno iš *Saccharopolyspora* rūšies nukleotidų seka (SEQ ID NO:23) ir atitinkama aminorūgščių seka (SEQ ID NO:24).

Fig. 11 parodyta Nb.SapI (33 variantas) aminorūgščių seka (SEQ ID NO:25).

Fig. 12 parodyta Nt.SapI (E250K variantas) aminorūgščių seka (SEQ ID NO:26).

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šio išradimo įgyvendinimas leidžia kvalifikuotam specialistui sukonstruoti sekai specifinius ir viršutinei ar apatinei grandinei specifinius DNR nikuojančius fermentus iš egzistuojančių IIA tipo restrikcijos endonukleazių, turinčių asimetrines atpažinimo sekas.

Metodas apima sukūrimą plazmidžių bibliotekos, kurioje plazmidės turi vieną ar daugiau atsitiktinai mutagenizuotų restrikcijos endonukleazės genų, kur genas ar genai koduoja fermentus arba subvienetus. Biblioteka nebūtinai turi turėti plazmidžių tipų mišinį ir/arba daugybę atsitiktinai mutagenizuotų restrikcijos endonukleazių.

Bakterijos yra transformuotos plazmidžių biblioteka ir *in vivo* įvyksta griežta genetinė atranka, kuria restrikcijos endonukleazę ekspresuojančios plazmidės yra letalios (mirtinos) ląstelėms-šeimininkėms, jeigu įvestos į kamieną neturintį giminingos metilinimo apsaugos ir kame yra pasiekiamas atitinkamas ekspresijos lygis.

Genetinė atranka gali būti įvykdyta vienos arba daugiau *in vitro* atrankų metu, kad būtų pasiekta galutinė plazmidžių biblioteka, kurioje dominantis nikuojančių fermentų klonas yra praturtintas ir dėl to lengvai išskiriamas iš bibliotekos ribotu bibliotekos patikrinimu. Genetinė atranka teikia pirmenybę faktui, kad IIA tipo fermentas yra toksiškas ląstelėms-šeimininkėms, nesant apsauginio metilinimo.

Nikuojančių endonukleazių griežta genetinė atranka yra galima čia, kadangi bakterinio genomo integralumas yra labiau išlaikomas po vienos grandinės perkirpimo nikuojančia endonukleaze, palyginus su dvigubos grandinės perkirpimu restrikcijos endonukleaze. Taigi, ląstelės, ekspresuojančios nikuojantį fermentą yra labiau gyvybingos (išlieka gyvos). Išlikusios ląstelės surenkamos ir iš jų išskiriamos plazmidės. Pirmoji fakultatyvi atranka *in vitro* atliekama plazmidės frakcionuojant elektroforezės agarozės gelyje būdu arba ultracentrifuguojant tankio gradientu.

Kadangi plazmidės yra konstruojamos turėti mažiausiai vieną strategiškai nustatytą substrato vietą, gretimą restrikcijos arba nikuojančios endonukleazės vietai, tokie plazmidžių klonai, ekspresuojantys nikuojančius fermentus, gali būti nikuoti. Nikuotos DNR migracija agarozės gelyje yra žymiai sulėtėjusi, palyginus su nenikuota superspiralizuota forma. Arba kitaip, naudojant centrifugavimą cezio chlorido tankio gradientu nikuotos ir superspiralizuotos plazmidės po keleto valandų centrifugavimo migruos į skirtingas pozicijas. Nikuotų plazmidžių atskyrimas nuo superspiralizuotų pasiekiamas pirmajame plazmidžių bibliotekos praturtinimo *in vitro* etape.

Po to, kai išskiriama plazmidinė DNR atitinkanti nikuotą, t.y. atvirą apskritimo formą, DNR perkirpimui *in vitro* naudojama antroji endonukleazė. Antroji endonukleazė gali būti nikuojantis fermentas arba restrikcijos fermentas ir ši substrato vieta yra strategiškai lokalizuota gretimai pirmosios nikavimo vietos (dominančios substrato vietos).

Pirmiausiai, endonukleazės skėlimo reakcija *in vitro* linearizuoja plazmidinę DNR ir sukuria iš anksto numatytus lipnius galus, kurie tarnauja kaip rankenos. Galutinėje *in vitro* stadijoje šie lipnūs galai panaudojami specifiniam tokių DNR klonų atrinkimui, kurie ekspresuoja arba viršutinę arba apatinę grandinę nikuojančių fermentų variantus. Jeigu lipnūs galai yra per trumpi pradmens priklausomai amplifikacijai (mažiau negu 4 nukleotidai), gali būti prijungtas adaptorius. Tada DNR gali būti amplifikuojama bet kuria iš galimų

amplifikavio technikų, tokių kaip polimerazinės grandinės reakcija (PGR), helikazės priklausoma amplifikacija (HDA) arba grandinės priklausoma reakcija (SDA). Galiausiai, bibliotekos elementai transformuojami į bakterijas prieš tai modifikuotas apsauginiu metiliniu ir nikuojantys fermentai superekspresuojami taip, kad ląstelių ekstraktuose gali būti tiriamas nikuojantis aktyvumas. Kai nikuojantis variantas yra išskirtas, grandinės ir sekos specifiškumas patvirtintas ir nustatoma ištisa klonų seka. Aminorūgščių pakeitimai, esantys kiekviename variante funkciškai analizuojami, nustatant jų poveikį į nikuojančios endonukleazės specifiškumą ir nikavimo aktyvumą.

Kai reikalinga, variantas optimizuojamas testuojant kitus pakeitimus pozicijose, manomai reikšmingus nikuojančiam fenotipui. Aminorūgščių pakeitimas endonukleazėje, gaunant nikuojantį aktyvumą, gali būti įvestas į izoizomerą, neoizomerą arba į fermentą su gimininga aminorūgščių seka.

Genų bibliotekos ekspresijos atitinkamas lygis yra paprastai optimizuojamas vadovaujantis preliminarium laukinio tipo endonukleazės klonų tyrimu.

Dalinai metodas yra įgyvendinamas naudojant SapI (žr. pavyzdžius). IIS tipo endonukleazė SapI buvo modifikuota sukuriant grandinės specifiškai nikuojančias endonukleazes. Buvo išskirtas SapI variantas, kuris daugiausia nikuoja apatinę grandinę ir pavadintas Nb.SapI 33 variantas. Be to, buvo išskirta keletas SapI variantų, kurie išimtinai nikuoja viršutinę grandinę. Labiausiai aktyvus viršutinės variantas buvo nustatytas palyginimo būdu ir surastas aminorūgšties pakeitimas E250K ir pavadintas Nt.SapI.

Naujų nikuojančių endonukleazių konstravimo metodo įgyvendinimas apima vieną arba daugiau sekančių žingsnių:

1. Ekspresijos vektoriaus (plazmidės) modifikavimas

Atitinkamas ekspresijos vektorius yra parenkamas pagal tai, koks restrikcijos endonukleazės kirpimo vietų dažnis bus modifikuojamas bakterijos genome. Pavyzdžiui, restrikcijos endonukleazei, kuri yra dažnai kerpanči, pageidautina parinkti vektorių su sumažintu kopijų skaičiumi ir/arba santykinai silpnu promotoriumi, kadangi nikuojantis endonukleazės variantas, kuris yra atsitiktinės mutagenizės produktas, priešingu atveju gali sukelti toksinį efektą, atsirandantį dėl didelio trūkių skaičiaus. Pavyzdžiui, T7 promotorius gali būti naudojamas šeimininke, kuris neturi T7 RNR polimerazės. Vėlesniame veiksmų plane, minimalaus ekspresijos lygio tikimasi iš ištisinio nuskaitymo transkripcijos nuo kitų promotorių, esančių vektoriuose. Vis dėlto, gali būti pageidautina varijuoti vektoriaus-šeimininko derinį, kad būtų gauta padidinta ekspresija. 2-ame pavyzdyje SapI ekspresija nuo T7 promotoriaus ne T7 šeimininke, buvo nepakankama genetinės selekcijos pakopai. Taigi,

vektorius su T7 promotoriumi buvo ekspresuojamas šeimininke, turinčiame T7 RNR polimerazę.

Be T7 promotoriaus, yra daugybė promotorių ir plazmidžių, turinčių pasirinktinai promotorius, kurie yra publikuoti ir/arba komerciškai prieinami. Atitinkama plazmidė gali būti pasirinkta numatytų charakteristikų pagrindu, kad būtų sukonstruota norima nikuojanti endonukleazė ir jos nikuojantis aktyvumas. Tai gali būti nesunkiai apibrėžta be pernelyg didelių eksperimentinių tyrimų aprašytų dėl SapI, kuriuose atsitiktinai mutuota restrikcijos endonukleazė įterpiama į pasirinktą plazmidę transformacijai į ląsteles-šeimininkes. Ląstelės gali būti surenkamos ir ištiriamos nikuojančios formos ir nustatomas preliminarinių pakopų lyginamasis efektyvumas.

Kita aplinkybė vektoriaus konstravime yra substrato kirpimo vietų skaičius ir išsidėstymas. Kad būtų maksimizuotas genetinės atrankos pakopos efektyvumas, vektorius neturi turėti substrato kirpimo vietos replikacijos srityje ir esminių vektoriaus funkcijų atviro skaitymo rėmeliuose. Pavyzdžiui, endonukleazės genas neturėtų turėti substrato kirpimo vietos, pavaldžios ekspresuojamos endonukleazės kirpimui. Substrato kirpimo vietos buvimas, kaip aprašyta aukščiau, gali interferuoti su informacinės RNR molekulių transkripcija.

Pateiktame įgyvendinime atitinkamas ekspresijos vektorius yra modifikuotas įterpiant restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką (substrato kirpimo vietą) už genų bibliotekos klonavimo vietos. (Žiūr. fig. 1). Šios DNR substrato vietos strategine padėtimi ekspresijos vektoriuje sudaro sąlygas tokių klonų selekcijai, kurie ekspresuoja endonukleazės variantus, kurie yra pajėgūs nikuoti kiekvienas savo ekspresijos vektorių *in vivo*.

Antroji, alternatyvi nikavimo vieta gali būti įterpta šalia dominančios substrato sekos, kad skaldymas su antruoju nikuojančiu fermentu sukurtų dvigrandį trūkį su iš anksto numatytais lipniais galais. Šie nustatyti lipnūs galai tokiu būdu įgalina atranką *in vitro* tokių mutotų endonukleazės genų, kurie ekspresuoja kirpimo vietai specifines ir grandinei specifines nikuojančias endonukleazes. Šie nustatyti lipnūs galai taip pat gali būti gaunami dvigrandžio skėlimo metu šalia dominančios nikavimo vietos. Šiuo atveju mažas viengrandis DNR fragmentas bus produkuojamas, linearizavus ekspresijos vektorių. Trumpas viengrandis DNR (ssDNR) fragmentas išsisklaido ir pašalinamas iš DNR bibliotekos, kad būtų išvengta trukdymų tolimesniuose molekulinės atrankos žingsniuose. Trumpos ssDNR pašalinimas gali būti atliktas gryninimu iš agarozės gelio arba spin kolonėlės procedūra, kaip aprašyta 1 ir 2 pavyzdžiuose.

2. Mutantinės endonukleazių bibliotekos sukūrimas

Mutantinė endonukleazės biblioteka yra sukurama vienu iš žinomų metodų. Pavyzdžiui, endonukleazės geno mutagenezė gali būti atlikta:

(a) Turinti polinkį į klaidas PGR (Leung, et al., *Technique* 1:11-15 (1989), Cadwell and Joyce, *PCR Methods Applic.*, 2:28-33 (1992)).

(b) Oligonukleotidų kryptinga mutagenezė, geriau PGR persidengiančio pratęsimo mutagenezės metodas (Morrison ir Desrosiers, *Biotechniques* 14:454-457 (1993)).

(c) Surinkimo PGR. Terminas „surinkimo PGR“ remiasi procesu, kuris apima PGR produkto surinkimą iš mažų DNR fragmentų mišinio. Didelis skaičius skirtingų PGR reakcijų vyksta lygiagrečiai tame pačiame tūryje, su vienai reakcijai parengtais produktais su kitos reakcijos produktais.

(d) Lytinė PGR mutagenezė. Šis terminas „lytinė PGR mutagenezė“ (taip pat žinoma kaip „DNR purtymas“) remiasi homologine rekombinacija tarp skirtingų, bet labai susijusių DNR sekų *in vitro*, sukelta DNR molekulių atsitiktinio fragmentavimo, išplaukiančio iš sekų homologijos, paremta krossoverio fiksacija pradžios prailginimo PGR reakcijos metu.

(e) Kasetės mutagenezė. Terminas „kasetės mutagenezė“ nurodo bet kokią dvigrandės DNR molekulės mažos srities pakeitimo procesą sintetine oligonukleotido kasete, kuri skiriasi nuo natyvios sekos. Oligonukleotidas dažnai turi pilnai arba dalinai randomizuotą natyvią seką (Dorner et al., *J. Mol. Biol.* 285:1515-1523 (1999)).

(f) Rekursinė visumos mutagenezė. Terminas „rekursinė visumos mutagenezė“ nurodo į baltymų konstravimo algoritmą (baltymų mutagenezė), sukurta skirtingų populiacijų fenotipiškai susijusių mutantų gavimui, kurių nariai skiriasi aminorūgščių seka. Šis metodas naudoja grįžamojo ryšio mechanizmą, kontroliuoti nuoseklius kasetinės mutagenezės ciklus (Arkin and Yuvan, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:7811-7815 (1992)).

(g) Eksponentinė visumos mutagenezė. Terminas „eksponentinė visumos mutagenezė“ nurodo į kombinatorinių bibliotekų, su dideliu unikalių ir funkcionalių mutantų procentingumu, sukūrimo procesą, kur mažos liekanų grupės atsitiktinai parenkamos kad būtų kiekvienoje pakeistoje pozicijoje lygiagrečiai identifikuotos aminorūgštys, kurios yra svarbios baltymų funkcionalumui (Delegrave and Youvan, *Biotechnology Res.* 11:1548-1552 (1993)) ir atsitiktinei ar kryptingai mutagenezei (Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:450-455 (1993)).

(h) Cheminiai mutagenai: hidrosilamino, natrio bisulfato ar bet kurio kito mutageno veikimas (Sambrook, J., et al., Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 15.105-15.107 (1989)).

i) Mutagenėzė *in vivo*. Terminas „mutagenėzė *in vivo*“ nurodo į atsitiktinių mutacijų atsiradimą bet kokioje klonuotoje DNR *E. coli* kamienuose, turinčiuose mutacijas vienoje arba keliuose DNR reparacijos sistemose. Tokie mutantiniai kamieniai turi aukštesnį atsitiktinės mutagenėzės santykį, negu laikinio tipo kamieniai. Dauginant plazmidinę DNR viename iš šių kamienų atsiras atsitiktinės DNR mutacijos (Long-McGie, et al., *Biotechnol. Bioeng.* 68:121-125 (2000)). Nekryptinga mutagenizuota endonukleazų biblioteka gali būti sukurta ekspresuojant giminingą metilazę *in vivo* mutagenėzės pakopoje.

j) Atvirkštinė PGR mutagenėzė, panaudojant tiesioginį ir atvirkštinį oligonukleotidų prijungimą atsitiktinai mutoto geno viduje arba išorėje. Lokalizuotų nukleotidų randomizacija gali būti apsunkinta taikant oligonukleotidų valdymui atsitiktinius arba pusiau atsitiktinius segmentus.

3. Endonukleazės genų bibliotekos klonavimas ekspresijos vektoriuje

Jeigu endonukleazės genų biblioteka yra mutuota naudojant, pavyzdžiui, bet kurį iš (a)-(g) metodų, po to mutagenizuota genų biblioteka prieš transformaciją į genetiškai parinktą bakterijų kamieną klonuota modifikuotame ekspresijos vektoriuje. Jeigu naudojami (h)-(j) mutagenėzės metodai, tuomet mutagenizuota plazmidžių biblioteka gali būti transformuojama tiesiai į genetiškai parinktą bakterijų kamieną, apeinant klonavimo stadiją.

Bakterijų kamienas genetinei selekcijai yra toks, kuriame konstitutyvinė arba indukuota laukinio tipo endonukleazės geno ekspresija baigiasi ląstelių letališkumu. Dauguma laboratorinių kamienų tenkins šį reikalavimą. Kamienas gali ekspresuoti T7 RNR polimerazę genų bibliotekos ekspresavimui nuo T7 specifinio promotoriaus. Be to, konstitutyvinės ekspresijos iš T7 vektoriaus letalus lygmuo nereikalauja T7 RNR polimerazės buvimo.

Išgyvenusios bakterijų kolonijos surenkamos ir išskiriama plazmidinė DNR. Tokios ląstelės, turinčios funkcionaliai aktyvias restrikcijos endonukleazes, negali išgyventi, nesant metilazinės apsaugos. Išgyvenusios kolonijos gali paslėpti endonukleazės klonus, kurie neturės dvigrandės DNR skėlimo aktyvumo. Daugumoje atvejų, tik mažas procentas šių klonų ekspresuos nikuojančius fermentus, kadangi dauguma klonų ekspresuos neaktyvius fermentus.

4. Plazmidžių analizė išgyvenusiose ląstelėse-šeimininkėse.

Plazmidžių biblioteka pajungiama elektroforezei preparatyviniame agarozės gelyje ir iš gelio išskiriama nikuota, turinti atvirą apskritimo formą DNR. Arba nikuotų plazmidžių išskyrimui gali būti naudojamas ultracentrifugavimas tankio gradientė. Įprastiniu būdu išskiriant plazmides iš *E. coli*, yra keletas nikuotų plazmidžių. Taigi, nikuotos bibliotekos plazmidžių išskyrimas negali garantuoti, kad kiekvienas endonukleazės genas koduos

nikuojantį fermentą. Tačiau, šiuo požiūriu atrinkti klonai gali būti analizuojami pagal nikuojančių fermentų variantų ekspresiją. Plazmidžių biblioteka, išskirta iš genetiškai parinkto šeimininko gali būti transformuota į šeiminiką, ekspresuojantį apsauginę metilazę ir gali būti ištirta atskirų endonukleazės variantų aktyvumas ir specifiškumas nepajungiant plazmidžių bibliotekos bet kokiai *in vitro* atrankos procedūrai.

5. *Fakultatyvi plazmidžių molekulių, koduojančių nikuojančias endonukleazes atranka „in vitro“*

Plazmidžių biblioteka gali būti po to padalinta į dvi grupes. Vėlesnės manipuliacijos su kiekvienos iš grupių DNR yra nukreiptos į grandinės specifiškumo nustatymą. Atitinkamai, viršutinę arba apatinę grandinę nikuojančių plazmidžių klonų nustatymas aprašytas žemiau. (Fig. 2 ir 3).

Kiekviena grupė hidrolizuojama su atitinkamu sekančiu nikuojančiu fermentu (arba restrikcijos fermentu) tam, kad linearizuotume plazmidės klonus, gautume dominančius iš anksto nustatytus lipnius galus. Jeigu restrikcijos fermentai naudojami linearizacijai, tuomet susidarę trumpi ssDNR fragmentai pašalinami.

Selekcija gali būti pasiekama vienu iš keleto būdų. Keletas selekcijos metodologijos pavyzdžių yra pateikiama žemiau.

(a) Viengrandės DNR adapteris gali būti liguojamas su plazmidės lipniais galais ir dominantys mutantiniai genai yra amplifikuojami iš bibliotekos, naudojant, pavyzdžiui, PGR. Efektyviam ligavimui lipnus galas geriausiai turėtų būti apie 4-10 bazių. Jeigu ligavimo adapteris didesnis negu 4 nukleotidai, plazmidžių bibliotekos temperatūra galėtų būti pakelta, pavyzdžiui, iki 55°C, prieš pridedant adapterio perteklių ir po to ataušinant iki ligavimo temperatūros. Ligavimas atliekamas ir po to pašalinamas nesuliguotas adapteris valant per afininę kolonėlę. Apatinės grandinės atrinkimo procedūroje komplementarios suligauto adapterio DNR grandinės susintetinimui naudojama užpildymo reakcija. Ši naujai suformuota grandinė naudojama matrica atrinktos genų bibliotekos PGR amplifikacijai. Užpildymo reakcija, einanti po adapterio suligavimo, gali būti atlikta, pavyzdžiui, naudojant Klionovo fragmentą. Ir viršutinės ir apatinės grandinių selekcijoje dominantys nikuojančių fermentų genai gali būti amplifikuoti naudojant PGR. Tiesioginis PGR pradmuo turėtų būti anilinamas prieš geną. Reversinis PGR pradmuo planuojamas arba komplementarus adapteriui (viršutinė selekcija, Fig. 3), arba sutrumpinta adapterio versija (apatinė selekcija, Fig. 2). Norint sumažinti klaidingą amplifikaciją, reversinio pradmens sekos 3' galas geriau nerodytų žymaus

bendrumo su bet kuria ekspresijos vektoriaus sritimi arba endonukleazės genu. Amplifikuota genų biblioteka klonuojama atgal į ekspresijos vektorių, transformuojama į iš anksto modifikuotą šeimininką (ekspresuojantį giminingą arba negiminingą DNR metilazę) ir individualios kolonijos auginamos bei tiriama dominančio nikuojančio fermento ekspresija.

(b) Jeigu plazmidės turi iš anksto žinomus lipnius galus, gali būti pridedamas prie linearizuotos plazmidžių bibliotekos kaip atrankos žymuo atsparus antibiotikui genas su tokiais pat lipniais galais. T4 DNR ligazė dedama nuo 10 minučių iki 16 valandų ir mišinys transformuojamas į iš anksto modifikuotas bakterijas, turinčias apsauginę DNR metiltransferazę. Transformacijos mišinys išsėjamas ant terpės, turinčios antibiotiką, atitinkantį įterptam atsparumo genui. Atsparios kolonijos auginamos individualiai ir tiriama dominančio nikuojančio fermento ekspresija.

(c) Jeigu plazmidžių biblioteka turi plazmidės su vietos ir grandinės specifiniu trūkiu, sukurtu *in vivo* ir yra inkubuojamos su antru, alternatyviu nikuojančiu fermentu, siekiant gauti antros grandinės trūkį, dominančios linearizuotos plazmidės gali būti atskirtos nuo nikotų plazmidžių elektroforeze agarozės gelyje. Po to gali būti pridedama T4 DNR ligazė mažoje koncentracijoje (2-4 ng/μl), kad būtų cirkuliarizuota kiekviena plazmidė. Ligavimo mišinys transformuojamas į iš anksto modifikuotą šeimininką ir individualios kolonijos auginamos bei tiriama dominančio nikuojančio fermento ekspresija.

6. Nikuojančių fermentų suradimas

Nikuojantys fermentai gali būti surasti tiriant iš indukuotų arba neindukuotų kultūrų gautų ląstelių ekstraktus. Atrinkti bibliotekos klonai transformuojami į iš anksto modifikuotą šeimininko kamieną ir auginami su atitinkamu antibiotiku plazmidžių atrinkimui. Baltymų ekspresija gali būti indukuota vėlyvoje log fazėje. Ląstelių kultūros centrifuguotos ir ląstelių ekstraktas gautas ultragarsu suardytas ląsteles resuspendavus buferyje, kuris neturėtų įtakos fermento aktyvumui ir padėtų palaikyti baltymą tirpale (pavyzdžiui, tris-HCl arba fosfatinis buferis, turintis 10mM β-merkaptioetanolio ir 0,1 mM EDTA). Antraip, lizė gali būti atlikta veikiant lizocimu, veikiant detergentu arba šaldant-šildant. Tipinis bandymas susideda: 2-5μl ląstelių ekstrakto pridėjus 1μl DNR substrato reakcijos buferyje optimaliame laukinio tipo endonukleazei. DNR substratas gali turėti vieną arba daugiau nikavimo vietų ir nikotos formos judrumas turi neabejotinai atsiskirti nuo superspiralizuotos formos, jėgu pajungiama elektroforezei agaroziniame gelyje (t.y. geriausiai maža, didelio kopijų skaičiaus plazmidė, tokia kaip pUC19). Kiekvieno nikuojančio varianto vietos ir grandinės specifiskumas nustatomas nikotą DNR produktą sekvenuojant „run-off“ metodu. Kiekviena dvigrandės plazmidės matrica sekvenuojama su dviem pradmenimis, kurie konverguoja menamoje

nikavimo vietoje. Jeigu nikuojantis fermentas yra specifiškas grandinei, viena sekvenavimo reakcija turėtų sustoti trūkio vietoje. Jeigu naudojama Taq DNR polimerazė sekvenuojant didezoksi terminacijos metodu, adeninas (A) pridamas prie pradmens prailginimo produkto galo nuo matricos nepriklausomo transferazinio aktyvumo.

7. *Mutacijos identifikavimas endonukleazėje*

Dominantys mutantiniai klonai sekvenuojami aminorūgščių pakeitimų nustatymui. Jeigu yra daugiau negu vienas aminorūgšties pakeitimas(i), tuomet tikslingas pakeitimas(i) patvirtinamas kryptingos mutagenezės būdu.

8. *Nikuojančio fermento aktyvumo optimizavimas*

Nikuojančio fermento aktyvumo optimizavimas gali būti baigtas vykdyti aminorūgšties liekanos, identifikuotos 7 pakopoje, kryptinga mutageneze. Kai kuriais atvejais, variantai su DNR nikuojančiu aktyvumu taip pat rodo silpną dvigrandės DNR skėlimo aktyvumą. Siekiant optimizuoti nikuojantį aktyvumą, identifikuota aminorūgšties liekana gali būti pajungiama kryptingai prisotinimo mutagenezei, išskiriant likusių aminorūgščių pakeitimus (pavyzdžiui 18 mutacijų). Tuomet nikuojantis DNR aktyvumas palyginamas tarp visų mutantų. Atrenkamas geriausiai nikuojantis variantas su minimaliu dvigrandės DNR kirpimo aktyvumu. Variantai, turintys skirtingus aminorūgščių pakeitimus toje pačioje pozicijoje, gali būti išskirti tam kad parodyti optimalų nikuojančio fermento aktyvumą. Aminorūgšties liekanos, paveikusių nikuojantį aktyvumą, gali būti atskirtos arba sujungtos tam, kad būtų gautas geresnės kokybės nikuojantis fermentas. Aminorūgšties pakeitimai, duodantys nikuojantį aktyvumą, gali būti įvesti į izoizomerus arba neoizomerus arba į fermentus su gimininga atpažinimo seka ar panašia aminorūgščių seka (nuo 15% iki 99% aminorūgščių sekos panašumas).

9. *Vietos specifinių nikuojančių endonukleazių gryninimas*

Baltymo gryninimo palengvinimui, tag baltymas (peptidas), toks kaip His-tag, chitiną surišantis domenai ar maltozę surišantis domenai gali būti pridamas prie nikuojančio fermento N- arba C- galo. Po išgryninimo, tag gali būti pašalinamas veikiant proteaze arba baltymų kirpimu (splicing).

10. *Fermento variantų atrinkimo šeimininkų kamienai*

Nikuojančių fermentų variantų atrinkimo bakteriniai šeimininkai neapsiriboja *E. coli*. Kiti bakteriniai šeimininkai, kaip *Bacillus* ir *Pseudomonas* taip pat gali būti naudojami iš anksto tikintis atitinkamo klonavimo/ekspresijos vektoriaus turėjimo ir gana didelio DNR transformacijos ar elektroporacijos efektyvumo. Termofiliniams fermentams gali būti naudojami *Thermus thermophilus* šeimininkas ir *Thermus-E. coli* purtymo (shuttle) vektorius

(Wayne et al. *Gene* 195:321-328 (1997)). Šis genetinės atrankos nikuojančių fermentų išskyrimo metodas gali būti pritaikytas ir DNR skaldantiems fermentams, tokiems kaip fago terminazė, transpozazė, rekombinazė, integrazė, introno koduojama endonukleazė arba inteino koduojama endonukleazė.

Aukščiau aprašytas baltymų inžinerijos metodas gali būti pritaikytas IIA tipo fermentuose viršutinę arba apatinę grandinę nikuojančių endonukleazių gavimui. Pavyzdžiuose IIS tipo restrikcijos endonukleazė SapI buvo modifikuota siekiant suformuoti SapI variantą, kuris daugiausia nikuoja apatinę grandinę buvo pavadintas kaip Nb.SapI 33 variantas. Be to, buvo išskirti kai kurie SapI variantai išimtinai nikuojantys viršutinę grandinę. Labiausiai aktyvus viršutinės grandinės variantas turintis aminorūgšties pakeitimą E250K ir buvo pavadintas Nt.SapI (E250K).

Yra daugeriopi nikuojančių endonukleazių pritaikymai. Jie apima:

1) Grandinės perkėlimo DNR amplifikacija. Nikuojančiu fermentu gali būti įvestas specifinis trūkis į DNR matricą. Bst DNR polimerazė arba kitos DNR polimerazės gali inicijuoti naujos grandinės sintezę nuo trūkio ir perkelti nikotą grandinę, susidarant linijiniam DNR amplifikacijos produktui.

2) Geno fragmentų surinkimo rekombinantinė technologija. Išskirstyti trūkiai gali būti įvesti į viršutinę ir apatinę grandines tam, kad susidarytų dideli lipnūs galai (8-20 bp ilgio). Komplementarūs lipnūs galai gali būti atkaitinti kartu ir taip išvengta ligavimo pakopos atkaitinta DNR gali būti naudojama tiesiog transformacijoje, elektroporacijoje ar transfekcijoje. Nikuojantys fermentai gali būti naudojami gaminant ssDNR galus DNR fragmentų surinkimui linijinėje ar apskritimo formoje. Grandinei specifiniai DNR nikuojantys fermentai yra naudojami viengrandžių sričių formavimui, nikuojant prie viengrandės srities ribos, arba priešingoje DNR grandinėje (sukuriant galines viengrandes sritis) arba toje pačioje grandinėje (sukuriant viengrandžius plyšius) (U.S. patentas Nr. 6660475).

3) Genetinio polimorfizmo nustatymas. Maži PGR fragmentai gali būti amplifikuoti nuo genominės DNR. Nikuojančiu fermentu gali būti įvestas trūkis į taikinį. Po denatūravimo HPLC, nikotas produktas gali būti „perskaitytas“ masių spektrometru siekiant nustatyti genetinius pakitimus (alteracijas). Nikuojantys fermentai gali būti naudojami onkogeninių mutacijų pašalinimui, bakterinių ar virusinių patogenų nustatymui.

4) Specifinis genomo taikiny. Nikuojantys fermentai, turintys ilgą atpažinimo seką arba pastarąją konjuguotą su PNA gali nutaikyti specifinę sritį genome.

5) DNR dupleksas, turintis vieną trūkį, rodo pakeistą migraciją judrumo gelyje bandymuose. Ši charakteristika gali būti naudojama tiriant skirtingą bazių išsidėstymą ir artimiausių kaimynų energetiką.

6) Nikuotų DNR duplesų arba DNR su plyšiais ruošimas, tiriant DNR ekscizijų atitaisymą.

Šie išradimo įgyvendinimai toliau iliustruoti sekančiais pavyzdžiais. Pavyzdžiai pateikti tam, kad padėtų suprasti išradimą ir neinterpretuojami kaip jo apribojimas. Yra susitarta, kad patyrę tyrinėtojai gali su šiuo išradimu daryti nedideles modifikacijas ir variacijas ir pasiekti tą patį rezultatą. Nuorodos pacituotos aukščiau ir žemiau čia yra įtrauktos į nuorodas.

PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys. Grandinę specifiskai nikuojančio fermento Nb.SapI konstravimas iš restrikcijos endonukleazės SapI

1. Ekspresijos vektoriaus, turinčio strategiškai fiksuotą SapI kirpimo vietą, projektas ir konstravimas.

Ekspresijos vektoriaus pACYCT7-ter (Xu et al, Mol. Gen. Genet. 260:226-231 (1998)) polilinkeris buvo modifikuotas, įvedant SapI kirpimo vietą. Du komplementarūs fosforilinti oligonukleotidai (25 nukleotidai) išvalyti poliakrilamido gelyje, atkaitinti ir liguoti į pACYCT7-ter BamHI kirpimo vietą. Iš tinkamo įterpimo, sukurto vienoje BamHI kirpimo vietoje išplaukia SapI, SalI ir BbvCI kirpimo vietos (žr. Fig. 1). Modifikuotas polilinkeris buvo patvirtintas sekvenuojant su T7 universaliu pradmeniu iš NEB Nr. S1248S, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA. Modifikuotas vektorius pavadintas pSAPV6.

5' P-GATCCGCTCTTCGTCGACCCTCAGC 3' viršutinis įterptas polilinkeris (296-332) (SEQ ID NO:1)

5' P-GATCGCTGAGGGTCGACGAAGAGCG 3' apatinis įterptas polilinkeris (296-333) (SEQ ID NO:2)

2. Klaidas sąlygojanti sapIR geno PGR mutagenezė ir mutantinės plazmidžių bibliotekos išskyrimas.

sapIR genas (1299 bp) buvo PGR amplifikuotas nuo *Saccharopolyspora* rūšies DNR (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), naudojant 0,4µM oligonukleotidų pradmenį, turintį NdeI ir BamHI kirpimo vietas:

5' AGAGTCTTGCATATGCGGAGGCTTGCTACAC 3' tiesioginis (298-022) (SEQ ID NO:3)

NdeI kirpimo vieta pabraukta.

5' TGGTTTGGATCCCCTGAAATGGGTTAGGGC 3' reversinis (298-023) (SEQ ID NO:4)

BamHI kirpimo vieta pabraukta.

Termociklinimas buvo atliktas per 30 ciklų (94°C 30 s, 56°C 30 s ir 72°C 90 s) esant NEB ThermoPol buferio (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), turinčio 7 mM MgSO₄ ir penkis vienetus Taq DNR polimerazės. Kad būtų įtakojamas mutacijos dažnumas, buvo dedama nevienoda dNTP koncentracija: 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1.0 mM dCTP ir 1.0 mM dTTP. Termociklinimas buvo atliekamas naudojant Gene Amp® 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). PGR produktas buvo išvalytas, naudojant Qiagen spin kolonėlę, hidrolizuotas su NdeI/BamHI ir išvalytas iš agarozės gelio. Išvalyta genų biblioteka buvo liguota į pSAPV6, paruoštą hidrolizuojant NdeI/BamHI ir veikiant CIP. Inkubavus per naktį 16°C temperatūroje, ligavimo mišinys buvo kaitinamas 10 min 65°C temperatūroje ir 4 valandas dializuojamas prieš distiliuotą vandenį. Pabaigoje ligavimo mišinys buvo elektroporacijos arba cheminės transformacijos būdu transformuotas į ER1992 ląsteles ir išsėtas ant LB agaro, turinčio 30µg/ml chloramfenikolo ir 80 µg/ml X-gal. ER1992 yra DNR pakenktas indikatorinis kamienas, turintis *dinD1:lacZ* genų suliejimą (U.S. patentas Nr. 5498535). Jeigu ląstelės yra išsėjamos ant terpės, turinčios X-gal, mėlynos spalvos išsivystymas žymi SOS atsako indukciją. Buvo padaryta prielaida, kad pilnai nikuojantis endonukleazės klonas gali indukuoti SOS atsaką *E. coli* ląstelėse. Todėl 120 vidutiniškai mėlynų išaugusių kolonijų buvo sutelkta į dvi grupes. Dvi sankaupos po 10ml buvo auginama iki prisotinimo 37°C temperatūroje ir išskiriama plazmidinė DNR.

3. SapI klonų, pasirinktinai nikuojančių dvigrandę DNR, atranka *in vitro*.

Kiekviena grupė buvo kryptingai nikuojama arba su N.BbvCIA arba N.BbvCIB 37°C temperatūroje 60 min. N.BbvCIA buvo taikomas viršutinės grandinės nikutų SapI klonų atrinkimui (Fig. 3) ir N.BbvCIB buvo taikomas apatinės grandinės nikutų SapI klonų atrinkimui (Fig. 2). Paskui nikuojantys fermentai buvo pašalinti naudojant Qiagen centrifugavimo kolonėlę ir sudėtos adapterio ligavimo reakcijos. N.BbvCIA nikauta DNR

buvo liguota su 10 pmol fosforilinto 296-334 adapterio per naktį 16°C temperatūroje. N.BbvCIB nikuota DNR buvo liguota su 10 pmol fosforilinto 296-335 adapterio per naktį 16°C temperatūroje:

5' P-TCGACCCTCACTACGTTAGTTCGCATCTGC 3' (296-334) (SEQ ID NO:5)

5' GCAGATGCGAACTAACGTAGGGGT 3' (296-335) (SEQ ID NO:6)

Klionovo fragmentas (0.5 vieneto) ir 30 µM dNTP buvo pridėta prie "B ligavimo", viršutinės DNR grandinės, komplementarios suliguotam adapteriui, gavimui. Ši pakopa yra būtina, norint gauti matricą apačiai specifinės amplifikacijos strategijai (Fig. 2). Po užpildymo Klionovo fragmentu, polimerazė ir adapterio perteklius pašalinti Qiagen centrifugavimo kolonėle. Užbaigiant, "A ligavimo" ir "B ligavimo" produktai buvo amplifikuoti PGR, naudojant tą pačią porą pradmenų (298-024 ir 275-224):

5' P-GGGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACG 3' (298-024) (SEQ ID NO:7) yra tiesioginis pradmuo, kuris leidžia klonuoti į SmaI kirpimo vietą priešais T7 promotorių.

5' GCAGATGCGAACTAACGTAG 3' (275-224) (SEQ ID NO:8) yra strateginis reversinis pradmuo.

PGR amplifikacija buvo atlikta per 33 ciklus (94°C 30 s, 56°C 30 s ir 72°C 90 s) esant TermoPol buferiui, 0.2 µM kiekvieno dNTP, 0.4 µM kiekvieno pradmens ir *Taq*/Vent polimerazių mišiniui (5/0.1 vieneto). Laukiamas 1493 bp produktas buvo stebimas abiejose A ir B matricose, į kurias ligavimo metu buvo įdėtas adapteris. Matricos iš tariamo ligavimo (į kurį nebuvo įdėtas adapteris) nedavė norimo PGR produkto. Pakankamam produkto kiekiui gauti, reikalingam perklonavimui į pSAPV6, buvo praveistos papildomos PGR reakcijos per 35 ciklus, naudojant 58°C anilinimo temperatūrą. PGR produktai išvalyti per kolonėlę, sukarpyti BamHI ir suliguoti su pSAPV6, paruošta su SmaI/BamHI ir paveikta CIP. Ligavimo reakcijos mišinys transformuotas į T7 ekspresijos šeimininką ER2744 [*hhuA2 lacZ::T7 gene1 glnV44e14-rfbD1? RelA1? EndA1 spoT1? Thy-1 (mcrC-mrr)114::IS10*], turintį dvigubą metilazės kloną pBR322-SapIM1M2 (U.S. patentas Nr. 5663067).

4. Nikuojančių fermentų atranka iš ląstelių ekstraktu.

Fermento superprodukas buvo atliktas inokuliuojant atskirus transformantus į 10 ml LB, turinčios 30 µg/ml chloramfenikolo ir 100 µg/ml ampicilino, auginant iki vėlyvosios

log fazės ir indukuojant su 0.1 mM IPTG 37°C temperatūroje per naktį. Ląstelės buvo išsodintos centrifuguojant ir 1.0 ml ląstelių ekstrakto buvo gauta dalinai suardžius ultragarsu 10 mM Tris-HCL (pH 7.8), 10 mM β-merkaptetanolio ir 0.1 mM EDTA. Nikuojantis aktyvumas buvo tiriamas inkubuojant pUC19 (viena SapI kirpimo vieta) su 3 μl ląstelių ekstrakto 45 min. 37°C temperatūroje, esant 1XNEB buferio 4 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). Iš 16 spėjimų apatinei grandinei specifinių klonų vienas ląstelių ekstraktas parodė žymų nikuojantį aktyvumą (Fig. 4). Šis klonas nuo pat pradžių buvo pavadintas N.33. Iš 32 spėjimų viršutinei grandinei specifinių klonų, nė vienas ląstelių ekstraktas nerodė nikuojančio aktyvumo. Sekvenuojant N.33 kloną *sapIR* geną parodytos mutacijos atskleidžiančios 4 aminorūgščių pakeitimus: D34Y/182V/P168L/R420I.

5. SapI N.33 varianto specifiškumo grandinei nustatymas.

pUC19 DNR substratas buvo inkubuojamas arba su N.33 ląstelių ekstraktu, arba dalinai išvalytu baltymu. Nikuotas DNR produktas buvo valomas iš 1% žemos lydymosi temperatūros agarozės gelio. Nikuota matrica buvo identifikuota sekvenuojant dvigrandę matricą su dviem pradmenimis, kurie susilieja SapI atpažinimo vietoje: (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA).

5'GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG 3' (266-113) (SEQ ID NO:9)
anilinamas prie pUC transkripcijos pradžios taško.

5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3' (SEQ ID NO:10) (Nr. S1224S) M13/pUC
sekvenavimo pradmuo.

Sekvenavimo reakcija, naudojant Nr. S1224S pradmenį sustoja ties GCTCTTCCGCTA (SEQ ID NO:11) (Fig. 6). Ši sutrumpinta seka yra nikutos apatinės grandinės panaudojimo matrica produktas. Apatinė grandinė nikuojama tarp 4-to ir 5-to nukleotido už SapI atpažinimo sekos. Galinis adeninas (A) yra klaidingas, kadangi jis yra pridedamas Tag DNR polimerazės transferazinio aktyvumo. Patvirtinus grandinės specifiškumą, N.33 buvo pervadintas Nb.SapI (33 variantas).

6. Nb.SapI (33 variantas) išvalymas ir charakterizavimas.

N.33 klonas buvo transformuotas į iš anksto modifikuotas ER2848 [Er2744 su *lacI^r* su F' (TetR)] su pBR322-SapIM1M2. Išankstinė modifikacija yra atliekama transformuojant į ER2848 metilazinę plazmidę ir po to gaminant kompetentines ląsteles CaCl₂ metodu. ER2848[pACYCT7ter-N.33, pBR322-SapIM1M2] buvo auginamos prie 30°C galutiniame 3

litrų tūryje. Nikuojančio fermento superprodukcija buvo indukuojama pridedant 0.5 mM IPTG per paskutines 5 augimo valandas. Ląstelės išsodinamos centrifuguojant ir šaldomos prie -20°C . Valymo procedūra buvo numatyta atitinkamai pagal laukinio tipo SapI restrikcijos endonukleazės valymo procedūrą. Ląstelių nuosėdos buvo resuspenduojamos, pridedant 60 mL HEPES skaldymo buferio: 20 mM HEPES (pH 7,7), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerolio. Ląstelės buvo lizuojamos suardant ultragarsu, kuris buvo kontroliuojamas Bradfordo būdu matuojant išsiskyrusį baltymą. Ląstelių lizatas buvo centrifuguojamas prie 15000 aps ir nuskaidrėjęs lizatas buvo užneštas ant DEAE-Sefarozės kolonėlės prieš tai ekvilibruotos su HEPES skaldymo buferiu. Pratekėjęs skystis buvo surenkamas ir užnešamas ant heparino-sacharozės FF kolonėlės, prieš tai ekvilibruotos su HEPES skaldymo buferiu (be EDTA). Buvo surinkta trisdešimt frakcijų, suformuojant 0,2-1,0 M NaCl eliucijos gradientą. Iš jų 3-16 frakcijos, ištyrus su pUC19, turėjo žymų nikuojantį aktyvumą. Aktyvusis telkinys buvo užneštas ant hidroksiapatito biogelio HTP kolonėlės, prieš tai ekvilibruotos su HEPES skaldymo buferiu (be EDTA). A fosfato gradientas tarnavo baltymo išplovimui iš hidroksiapatito dervos. A menzūra su HEPES buferiu (be EDTA), tuo tarpu B buferis turi 0,9 M kalio fosfato (pH 7,7), 200 mM NaCl, 1 mM DTT ir 10% glicerolio. Iš dvidešimt aštuonių išplautų frakcijų, 9-14 rodė nikuojantį aktyvumą. Aktyvusis telkinys buvo praleistas per antrą DEAE pakopą, kad būtų atliktas nukleorūgšties pašalinimas. Antroji DEAE kolonėlė buvo ekvilibruota su 20 mM HEPES (pH 7,7), 200 mM NaCl, 0,3 mM EDTA, 1 mM DTT ir 10% glicerolio. Paskutinėje kolonėlėje buvo frakcionuojama heparin sefaroze FF, naudojant 0,2-1,0 M NaCl HEPES skaldymo buferyje (turinčiame 1 mM EDTA). Paskutiniai 15 ml sanakaupa buvo dializuota per naktį SapI saugojimo buferyje (be BSA): 10 mM Tris-HCL (pH7,5), 300 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT ir 50% glicerolio. Po dializės tūris buvo sumažintas iki 5,5 ml.

Išvalyta Nb.SapI (33 variantas) partija buvo titruojama 50 μl reakcijos tūryje, turinčiame 4xNEB buferį (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), 1 μg pUC19 ir 2 μl praskiesto fermento (Fig. 5). 4-kartinis fermento praskiedimas po 60 min prie 37°C pašalina visas superspiralizuotas pUC19 formas. Tuo būdu, išvalyta 33 varianto partija turi 2 vienetus/ μl . (Vienas vienetas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, reikalingas 1 μg pUC19 paversti į atviro apskritimo formą per 60 min, esant optimaliai reakcijos temperatūrai.)

Po išgryninimo ER2848 [pACYCT7ter-Nb.SapI33, pBR322-SapIM1M2] kamienas išskiria 1100 vienetų Nb.SapI (33 variantas) iš ląstelių gramo.

7. Individualių aminorūgščių pakaitų, rastų 33 variante, reikšmės analizavimas kryptingos mutagenezės būdu.

Prisotinimo mutagenizei buvo pasirinktos 34, 168 ir 420 pozicijos. Buvo rasti daugybiniai pakeitimai 420 padėtyje fermentuose, geriausiai nikuojančiuose pUC19. Analizuojant variantus iš ląstelių ekstrakto, 420 pozicijoje buvo patvirtintos, leidžiančios didžiausią konversiją į nikuojančią formą, sekančios liekanos: asparaginas, serinas, treoninas, leucinas, izoleucinas, valinas, alaninas ir glicinas.

5'GCGGGATCCGTTTCAGTCCAGTGGTAGTGCTTCATCGAGAAGTGCGTCTGGNNNT
TCCTTCAACTTCTC 3' (300-045) (SEQ ID NO:12) reversinis pradmuo dėl 420
randomizacijos

N = tolygus A, C, G, T mišinys

Molekulinės biologijos metodikos, pritaikytos šiame darbe:

Plazmidinės DNR išskyrimo metodika: Qiagen centrifugavimo kolonėlės buvo naudojamos plazmidinės DNR išskyrimui. Ląstelių lizė, baltymų ir ląstelinės DNR denatūracija buvo atliekama pridedant P1, P2 ir N3 buferius. Nuskaidrintas supernatantas, turintis plazmidinę DNR, buvo užnešamas ant Qiagen centrifugavimo kolonėlių ir plaunamas PE buferiu. Plazmidinė DNR išplaunama distiliuotu vandeniu.

Transformacijos atlikimo metodika: Chemiškai kompetentinės ląstelės buvo paruoštos veikiant eksponentinės fazės *E. coli* ląsteles ledo šaltumo 70 mM CaCl_2 30 min. Kompetentinės ląstelės sumaišytos su plazmidine DNR buvo inkubuotos lede 30 min. Po 3-5 min. temperatūrinio veikimo 37°C, buvo pridedamas vienodas tūris LB terpės ir ląstelės inkubuojamos 37°C temperatūroje vieną valandą. Plazmidžių atrinkimui transformantai išsėjami ant LB agarų lėkštelių su atitinkamu antibiotiku.

Elektroporacijos atlikimo metodika: Elektrokompentinės ląstelės buvo paruoštos dukart paveikiant eksponentinės fazės *E. coli* ląsteles su ledo šaltumo 10% gliceroliu (500 ml 10% glicerolio ląstelių nuosėdoms iš 500 ml ląstelių kultūros). Sumaišius 50mL ląstelių su DNR, atliekama elektroporacija, esant sekančioms sąlygoms: 1.8 kV, 200 Ω , 25 mF, 0.1 cm kiuvetė. Į ląsteles pridedama SOC terpės (0.5 ml) ir inkubuojama 1 val. transformantų išdauginimui. Plazmidžių atrinkimui transformantai išsėjami ant LB agarų lėkštelių su atitinkamu antibiotiku.

“Run-off” sekvenavimas ir DNR sekvenavimas: “Run-off” sekvenavimui buvo naudojami nikuoti produktai arba iš gelio išvalyti nikuoti produktai. Sekvenavimo reakcijose

buvo naudojama Big dye AmpliTag didezoksi terminatorinis sekvenavimo rinkinys (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNR seka buvo nustatyta automatinio sekvenatoriumi AB1373A. DNR seka buvo redaguojama ir analizuojama su DNASTAR Lasergene ir GCG programomis.

2 pavyzdys. Viršutinę grandinę specifiskai nikuojančio fermento Nt.SapI konstravimas iš restrikcijos endonukleazės SapI

Nepasisekimas tiesiogiai išskirti viršutinę grandinę nikuojantį variantą buvo labiausiai tikėtinas padarant riboto dydžio pradinę biblioteką (tik 120 klonų). Be to, vėliau buvo nustatyta, kad genetinė atranka ER1992 kamiene buvo nepakankamai griežta tiksliai variantų su dvigubos grandinės skėlimo aktyvumu išskyrimui. Retai kerpančio fermento atvejais (t.y. SapI) buvo naudinga genetinės selekcijos stadiją atlikti su kamienu, koduojančiu T7 RNR polimerazę, kad būtų sumažinta konstitutyvime SapI ekspresija iš pSAPV6.

1. Mutatinės plazmidžių bibliotekos išskyrimas genetinė atranka iš ER2848.

Toks pat mutagenizuotas *sapIR* genas, aprašytas 1 pavyzdyje, buvo liguotas į pSAPV6 ir transformuotas į ER2848 elektroporacijos būdu. Transformacijos mišinys buvo išsėtas ant LB agaro su Km ir inkubuotas per naktį 30 °C ir 37 °C temperatūrose. Prie abiejų inkubavimo temperatūrų buvo vienodas kolonijų skaičius. Vidutiniškai 600 išaugusių kolonijų buvo surinkta į 500 ml LB terpės su Km. Kultūra auginama iki vėlyvos log fazės 37 °C temperatūroje, išsodinama centrifuguojant ir plazmidinė DNR išskiriama naudojant Qiagen Maxiprep.

2. Nikuotos plazmidžių bibliotekos atranka *in vitro* elektroforeze agarozės gelyje.

Mažas mėginys (2 iš 150 µl) ER2848 plazmidžių bibliotekos buvo pajungta elektroforezei agarozės gelyje (0.7% agarozė, 150 mV 90 min). Lėčiau migruojanti DNR buvo išpjautra iš gelio ir išvalyta adsorbcija prie silicio dioksido (Compass DNA purification kit, American Bioanalytical, Natick, MA). Ši stadija pašalina daugumą superspiralizuotos plazmidinės DNR ir tarnauja bibliotekos praturtinimui nikuota plazmidine DNR.

3. SapI klonų, kurie pasirinktinai nikuoja dvigrandės DNR viršutinę grandinę, atranka *in vitro*.

Praturtinta plazmidžių biblioteka buvo inkubuojama su N.BbvCIA 60 min prie 37 °C, kad būtų linearizuoti plazmidžių klonai, prieš tai nikuoti viršutinėje grandinėje SapI kirpimo vietoje *in vivo*. Tokiu atveju, apatinės grandinės nikavimas N.BbvCIA sukuria 10-ties bazių lipnų galą (Fig. 3). Po to, N.BbvCIA buvo pašalintas su Qiagen centrifugavimo kolonėle ir atlikta adapterio ligavimo reakcija. Su N.BbvCIA nikuota DNR buvo liguota su fosforilintu adapteriu 296-334 pernakt 16 °C temperatūroje. Adapterio pridėjimas atliekamas po nikuotos

DNR kaitinimo 65 °C temperatūroje, kad būtų garantuotas 10-ties bazių lipnaus galo atskyrimas. T4 DNR ligazė (1000 vienetai) pridedama atšaldžius iki kambario temperatūros. Taip pat buvo sudedamas kontrolinis ligavimas be adapterio.

5' P-TCGACCCTCACTACGTTAGTTCGCATCTGC 3' (296-334) (SEQ ID NO:13)

Po ligavimo per naktį 16 °C temperatūroje adapterio perteklius pašalinamas Qiagen centrifugavimo kolonėle. "A ligavimo" produktas PGR amplifikuojamas, naudojant pradmenų 298-024 ir 275-224 porą. Matrica, turinti suliguotą adapterį, davė numatyto dydžio (1493 bp) PGR produktą, tuo tarpu kai matrica iš kontrolinio ligavimo produkto nedavė. "A ligavimo" produktai buvo surinkti (400 ml), išvalyti per Qiagen centrifugavimo kolonėlę ir hidrolizuoti su NdeI ir BamHI. Po išvalymo iš gelio, genų biblioteka buvo liguojama į pSAPV6. Ligavimo reakcijos mišinys transformuotas į ER2744 [pBR322-SapM1M2] elektroporacijos būdu ir, inkubavus per naktį 37 °C temperatūroje, išsėtas ant LB agaro lėkštelių su Am ir Km.

4. Nikuojančio fermento variantų atranka iš ląstelių ekstraktų.

Keturiasdešimt aštuonios kolonijos buvo individualiai inokuliuotos į 10 ml LB kultūros su Am ir Km. Kultūros buvo auginamos 37 °C temperatūroje iki vėlyvosios log-fazės ir per naktį indukuotos 0.1 mM IPTG. Kultūros buvo centrifuguojamos ir ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 1 ml ultragarsinio buferio: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM β-merkaptotanolio ir 0.1 mM EDTA. Ultragarsinimas buvo atliekamas naudojant Ultrasonic Cell Disruptor. Nikuojantis aktyvumas buvo tiriamas inkubuojant pUC19 (su viena SapI kirpimo vieta) su 3 μl ląstelių ekstrakto 60 min 37 °C temperatūroje, esant 1XNEB buferio 4 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). Penki iš 48 ląstelių ekstraktų rodė žymų nikuojantį aktyvumą (Fig. 7). Visi penki klonai (Nr. 2, Nr. 11, Nr. 9, Nr. 15 ir Nr. 18) atsakingų aminorūgščių pakeitimų nustatymui buvo sekvenuoti. Du aktyviausiai nikuojantys variantai (Nr. 11 ir Nr. 15) turėjo tris dažniausius pakeitimus: K80E, E250K ir K273R. Kryptinga PGR mutagenėzė (persidengiančio prailginimo metodas) buvo atlikta nustatyti kuris pakaitas(i) atsakingas už nikuojantį fenotipą. Iš šių tyrinėjimų nustatyta, kad abu viengubi E250K ir K273R variantai produkuoja išimtinai viršutinę grandinę nikuojantį pUC19 produktą, kadangi K80E variantas buvo negatyvus nikuojančiam aktyvumui. Kituose tyrimuose Q240R ir G271R irgi rodė viršutinę grandinę nikuojantį aktyvumą, kai buvo tiriama su pUC19. Keturi viršutinę grandinę nikuojantys variantai buvo pavadinti Nt.SapI (E250K), Nt.SapI (K273R), Nt.SapI (Q240R) ir Nt. SapI (G271R). Visų keturių viršutinę

grandinę nikuojančių variantų palyginamoji analizė parodė, kad E250K pakeitimo rezultate gautas aktyviausias viršutinę grandinę nikuojantis SapI variantas.

E250K mutagenizės pradmenys:

5' GCACTTATCACACGTAAGCGAAAGATATTCCTG 3' (304-120 tiesioginis) (SEQ ID NO:14)

5' CAGGAATATCTTTCGCTTACGTGTGATAAGTGC 3' (304-121 atvirkštinis) (SEQ ID NO:15)

5. Nt.SapI (E250K) grandinės specifiškumo nustatymas.

pUC19 (1 µg) DNR substrato buvo inkubuojama su 5 µl E250K ląstelių ekstrakto. Nikuotas DNR produktas išvalytas iš 1% žemos lydymosi temperatūros agarozės gelio. Nikuota matrica buvo identifikuota sekvenuojant dvigrandę matricą su dviem pradmenimis, kurie susieina SapI kirpimo vietoje: (266-113 ir New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, katalogo Nr. S1224S). Naudojant 266-113 pradmenį sekvenavimo reakcija baigiasi ties GGAAGCA (Fig. 9). Ši sutrumpinta seka gaunama naudojant matricą viršutinę nikuotą grandinę. Viršutinę grandinę nikuojama tarp 1-mo ir 2-ro nukleotidų už SapI atpažinimo sekos. Galinis adeninas (A) yra klaidingas, kadangi jis prijungiamas Taq DNR polimerazės transferazinio aktyvumo.

6. Nt.SapI (E250K) superprodukuojimas.

Nt.SapI buvo superprodukuotas ER2848[pACYCT7ter-Nt.SapI, pBR322-SapIM1M2, pSYX33-EarIM1M2] kamienne, auginant LB terpėje su Km/Am/Kn 30 °C temperatūroje iki vėlyvosios log fazės ir po to 5 val. indukuojant 0,5 mM IPTG 30 °C temperatūroje. Ląstelių ekstraktas iš 10 ml Nt.SapI (E250K) buvo titruotas 50-yje µl reakcijos, turinčios 4NEB buferio (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), 1 µg pUC19 ir 2 µl ekstrakto arba praskiesto ekstrakto (Fig. 8). Reakcija su 2 µl nepraskiesto ekstrakto po 60 min 37 °C temperatūroje iš esmės pašalina superspiralizuotą pUC19 formą. Taigi, Nt.SapI produkavimo lygis iš ER2848 [pACYCT7ter-Nt.SapI, pBR322-SapIM1M2, pSYX-EarIM1M2] nustatytas 10000 vienetų/gramo šviežių ląstelių.

Išradimo apibrėžtis

1. Grandinei specifinių nikuojančių endonukleazių konstravimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima:

a) ląstelių-šeimininkių, stokojančių metilazinės apsaugos prieš restrikcijos endonukleazes, transformavimą plazmidžių biblioteka, turinčia atsitiktinai mutotą geną, koduojantį restrikcijos endonukleazę, plazmides be to dar apimančias sekos vietą išorėje geno, kuris yra skaldomas arba nikuojamas geno ekspresuojama endonukleaze;

(b) auginimą (a) pakopos transformantų, išskyrimą iš jų plazmidžių ir atlikimą fakultatyvios atrankos *in vitro*, nustatant, kuri plazmidė yra nikuota *in vivo*;

(c) skaldymą (b) pakopos plazmidžių su iš anksto nustatyta grandinei specifine nikuojančia endonukleaze, turinčia skirtingą skėlimo vietą, negu atsitiktinai mutagenizuotos restrikcijos endonukleazės skėlimo vieta ir iš anksto paruoštus priešingoje grandinėje pirmą ir antrą lipnius galus plazmidėje;

(d) atsitiktinai mutagenizuoto endonukleazės geno lipnių galų naudojimą amplifikacijai plazmidėse ir po to klonavimą amplifikuoto geno ląstelėse-šeimininkėse arba selektyvaus markerio ligavimą į plazmidę tarp pirmo ir antro lipnių galų ir geno klonavimas selektyvioje terpėje; ir

(e) žinomo grandinės specifiškumo nikuojančios endonukleazės gavimą iš (d) pakopos DNR klono.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad restrikcijos endonukleazės skėlimo vieta yra lokalizuota transkripcijos kryptimi už geno.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (b) pakopa be to apima: transformantų surinkimą prieš išskiriant plazmides.

4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (b) pakopa be to apima: surinktų transformantų praturtinimą genais, ekspresuojančiais nikuojančią endonukleazę.

5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad praturtinimo punktas apima: plazmidinės DNR išskyrimą iš surinktų transformantų, plazmidžių analizavimą atskyrimo

būdais, atskiriant nikuotą DNR nuo superspiralizuotos ir linijinės DNR, ir retransformavimą iš anksto modifikuotų *E. coli* ląstelių-šeimininkų nikuota plazmidine DNR.

6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atskyrimo priemonės yra parinktos iš gelio elektroforezės ir tankio centrifugavimo.

7. Būdas pagal 3, 4, ir 5 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad be to apima dviejų auginamų transformantų telkinių formavimą, kad vienas telkinys būtų testuojamas viršutinės grandinės skėlimo aktyvumui nustatyti, o kitas telkinys apatinės grandinės skėlimo aktyvumui nustatyti.

8. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (d) pakopa be to apima viengrandžio DNR adaptoriaus ligavimą su iš anksto nustatytu lipniu galu geno amplifikavimui.

9. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antra iš anksto nustatyta skėlimo vieta yra fiksuota viršutinėje plazmidės grandinėje, apatinės grandinės trūkio vietos nustatymui.

10. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antra iš anksto nustatyta skėlimo vieta yra fiksuota apatinėje plazmidės grandinėje, viršutinės grandinės trūkio vietos nustatymui.

11. Būdas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (c) pakopa be to apima viengrandžio adaptoriaus ligavimą su pirmu lipniu galu, kur pirmas lipnus galas yra gretimas genui.

12. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutagenizuotas restrikcijos endonukleazės genas turi vieno ar daugiau nukleotidų deleciją, inserciją ar pakeitimą.

13. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutagenizuotas genas turi daugybę mutacijų.

14. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutagenizuotas genas turi vieną mutaciją.
15. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutagenizuotas genas turi deleciją nukleotidų srityje nuo 3 iki 600.
16. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (a) pakopos ląstelės-šeimininkės paruošimas yra parinktas iš gramneigiamų arba gramteigiamų bakterijų.
17. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad be to apima: mutacijos identifikavimą nikuojančioje endonukleazėje, palyginus su laukinio tipo restrikcijos endonukleaze, iš kurios ji yra gauta ir ekvivalentinės mutacijos įvedimą kryptingos mutagenizės būdu į restrikcijos endonukleazės izošizomerą arba neošizomerą
18. Būdas pagal 1 punktą be to apimantis papildomos mutacijos įvedimą į (f) pakopos nikuojančią endonukleazę kryptingos mutagenizės būdu nikuojančio aktyvumo sustiprinimui arba dvigrandės DNR skėlimo minimizavimui, arba abiem variantams.
19. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutagenizuotas restrikcijos endonukleazės genas yra IIA tipo endonukleazės genas.
20. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nikuojanti endonukleazė yra termostabili nikuojanti endonukleazė.
21. Grandinei specifinės DNR nikuojančios endonukleazės konstravimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima:
- (a) ląstelių-šeimininkių transformavimą plazmidėmis, turinčiomis atsitiktinai mutagenizuotą restrikcijos endonukleazės geną, ląstelės-šeimininkės stokoja apsauginio metilinimo;
 - (b) viengrandžio adaptoriaus ligavimą su sutelktomis plazmidėmis, išskirtomis iš išaugusių (a) pakopos transformantų, nustatymui kuri plazmidė koduoja viršutinę grandinę arba apatinę grandinę nikuojančius restrikcijos endonukleazės variantus;
 - (c) mutagenizuoto restrikcijos endonukleazės geno amplifikavimą ląstelių-šeimininkių transformacijai;

(d) nustatymą kurios ląstelės-šeimininkės turi nikuojantį aktyvumą ir jų nikuojantį fenotipą; ir

(e) sukonstruotų nikuojančių endonukleazių gavimą.

22. Būdas pagal 1 arba 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad restrikcijos endonukleazė yra SapI.

23. Nikuojanti endonukleazė apimanti Nt.SapI.

24. Nikuojanti endonukleazė apimanti Nb.SapI.

25. Nikuojanti endonukleazė pagaminta pagal 1 punktą.

26. Vieno arba daugiau vietos specifinių trūkių įvedimo į iš anksto parinktas DNR duplekso grandines būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas apima: DNR duplekso hidrolizę nikuojančia endonukleaze, pagaminta pagal 1 punktą palankiomis nikuojančiam aktyvumui sąlygomis.

<110> New England Biolabs, Inc.
Xu, Shuang-yong
Samuelson, James

<120> Grandines specifiškai nikuojančių endonukleazių konstravimo
iš restrikcijos endonukleazių būdas

<130> NEB-237-LT

<150> JAV 60/530,754
<151> 2003-12-18

<160> 30

<170> PatentIn versija 3.2

<210> 1
<211> 25
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinis

<400> 1
gatccgctct tcgtcgaccc tcagc 25

<210> 2
<211> 26
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 2
gatcgctgag ggctcgacgaa gagccg 26

<210> 3
<211> 31
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 3
agagtcttgc atatgcggag gcttgctaca c 31

<210> 4
<211> 30
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 4
tggtttgat cccctgaaat gggtagggc 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinis

<400> 5
 tcgaccctca ctacgttagt tcgcatctgc

30

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

<220>
 <223> sintetinis

<400> 6
 gcagatgcga actaacgtag gggc

24

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 7
 gggagatctc gatcccgcgga aattaatagc

30

<211> 20
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 8
 gcagatgcga actaacgtag

20

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 9
 gggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacg

34

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 10
cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

<210> 11
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 11
gctcttccgc ta

12

<210> 12
<211> 68
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<220>
<221> įvairūs požymiai
<222> (51)..(53)
<223> n=tolygus mišinys a,c,g,t

<400> 12
gcgggatccg ttcagtccag tggtagtgc tcatcgagaa gtgcgtctgg nnnttccttc

60

aacttctc

68

<210> 13
<211> 30
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinis

<400> 13
tcgaccctca ctacgttagt tcgcatctgc

30

<210> 14
<211> 33
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> pradmuo

<400> 14
gcacttatca cacgtaagcg aaagatattc ctg

33

<210> 15

<211> 33
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> pradmuo

<400> 15
 caggaatatac tttcgcttac gtgtgataag tgc

33

<210> 16
 <211> 26
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinis

<400> 16
 ggatccgctc ttcgtcgacc ctcagc

26

<210> 17
 <211> 15
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinis

<400> 17
 gctcttcgctc gaccc

15

<210> 18
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinis

<400> 18
 tcgaccctca ctacgttagt tcgcatctgc

30

<210> 19
 <211> 29
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>
 <223> sintetinis

<400> 19
 tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcg

29

<210> 20
 <211> 29
 <212> DNR
 <213> nežinomas

<220>

<223> sintetinis

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (24)..(24)

<223> nukleotidas pridėtas polimerazės pagalba

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (25)..(29)

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

<400> 20

tgcggtattgg gcgctcttcc gctannnnn

29

<210> 21

<211> 24

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinis

<400> 21

gggcgctctt ccgcttcttc gctc

24

<210> 22

<211> 19

<212> DNR

<213> nežinomas

<220>

<223> sintetinis

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (13)..(13)

<223> nukleotidas pridėtas polimerazės pagalba

<220>

<221> įvairūs požymiai

<222> (14)..(19)

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

<400> 22

gagcgaggaa gcannnnnn

19

<210> 23

<211> 1299

<212> DNA

<213> Saccharopolyspora sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1299)

<400> 23

atg cgg agg ctt gct aca caa cga cgc gag gac gcg tac aaa tca aat

48

LT 5263 B

Met	Arg	Arg	Leu	Ala	Thr	Gln	Arg	Arg	Glu	Asp	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asn		
1				5					10					15			
agg gat tat cag acc gtg cac gaa gct cag agc ctt cga gtc aac tcg 96																	
Arg	Asp	Tyr	Gln	Thr	Val	His	Glu	Ala	Gln	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Ser		
			20					25					30				
acc gat gat gac aac ctg agc ctc ttc ctc ttg aaa gat att tca ccc 144																	
Thr	Asp	Asp	Asp	Asn	Leu	Ser	Leu	Phe	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Ser	Pro		
			35				40					45					
cgc gaa gat tct aaa aat att gta gga ttt gga ggc ttc gtc aag ccc 192																	
Arg	Glu	Asp	Ser	Lys	Asn	Ile	Val	Gly	Phe	Gly	Gly	Phe	Val	Lys	Pro		
	50					55					60						
gaa atc gcc acc acc atg gcg ctt acc tta acg aca gac atc gat aaa 240																	
Glu	Ile	Ala	Thr	Thr	Met	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ile	Asp	Lys		
	65				70				75				80				
caa ata aaa tca gtg ccg tta tcc tcg aat tgg aat cgg atc agc atc 288																	
Gln	Ile	Lys	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn	Trp	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile		
				85					90				95				
gtt gca aag ttc gcg agc aac ccg tct gtt agc att act ctg gga ttt 336																	
Val	Ala	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Gly	Phe		
			100					105					110				
gat caa acc cca tgg gtc gat ttc tgg ggc atc aat tcg gac gat atc 384																	
Asp	Gln	Thr	Pro	Trp	Val	Asp	Phe	Trp	Gly	Ile	Asn	Ser	Asp	Asp	Ile		
			115				120					125					
ggc ctt tca ttt gta tcg gac gca gtc cct ctt gaa atg agc atg att 432																	
Gly	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Glu	Met	Ser	Met	Ile		
	130					135					140						
gat agc ata cat att gcc ccc gaa aca cta tac ctt gat cac tca agc 480																	
Asp	Ser	Ile	His	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Leu	Tyr	Leu	Asp	His	Ser	Ser		
	145				150					155				160			
gca tgt ctc ctt gac att gat cca gtg gaa tcg aca cgc ttc aaa aca 528																	
Ala	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Phe	Lys	Thr		
				165				170						175			
ggc cat ggt gac cct tta agt ctg aag aaa tgc tca tac tgc ggc cgc 576																	
Gly	His	Gly	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gly	Arg		
			180					185					190				
ctt ctt cct ata gac ctc gag cgt ccc ggc aag ctg tct ttt cac aaa 624																	
Leu	Leu	Pro	Ile	Asp	Leu	Glu	Arg	Pro	Gly	Lys	Leu	Ser	Phe	His	Lys		
			195				200						205				
cat cga gcc aaa atc act aat cat cag aac gag tgt cgt tca tgt aag 672																	
His	Arg	Ala	Lys	Ile	Thr	Asn	His	Gln	Asn	Glu	Cys	Arg	Ser	Cys	Lys		
	210					215				220							
aag tgg cga ata aac aac tcc ttc aat ccg atg cgc acg att gac cag 720																	
Lys	Trp	Arg	Ile	Asn	Asn	Ser	Phe	Asn	Pro	Met	Arg	Thr	Ile	Asp	Gln		
	225				230					235				240			
ctt aac gag tca gca ctt atc aca cgt gag cga aag ata ttc ctg caa 768																	
Leu	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Arg	Glu	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Gln		
				245					250					255			
gaa cca gaa att ctt cag gaa att aag gat agg acc ggc gcg gga ctt 816																	

LT 5263 B

Glu Pro Glu Ile Leu Gln Glu Ile Lys Asp Arg Thr Gly Ala Gly Leu	
260 265 270	
aaa agt caa gtg tgg gaa cga ttc cat cgc aag tgc ttc aac tgt aga	864
Lys Ser Gln Val Trp Glu Arg Phe His Arg Lys Cys Phe Asn Cys Arg	
275 280 285	
aaa gat ctc aaa cta agc gag gtt caa ctg gac cac act cgg ccg ctt	912
Lys Asp Leu Lys Leu Ser Glu Val Gln Leu Asp His Thr Arg Pro Leu	
290 295 300	
gca tac cta tgg ccg att gat gag cat gcg act tgc ttg tgc gca caa	960
Ala Tyr Leu Trp Pro Ile Asp Glu His Ala Thr Cys Leu Cys Ala Gln	
305 310 315 320	
tgc aac aat acc aaa aaa gac cgc ttt cct gta gat ttc tat agc gaa	1008
Cys Asn Asn Thr Lys Lys Asp Arg Phe Pro Val Asp Phe Tyr Ser Glu	
325 330 335	
cag cag ata cgc gaa ctg tcg gac att tgc gga ctt ccg tat cag gat	1056
Gln Gln Ile Arg Glu Leu Ser Asp Ile Cys Gly Leu Pro Tyr Gln Asp	
340 345 350	
cta tgt gct cgc tcg ttg aat tta gat caa ctc gat agg atc gag cgt	1104
Leu Cys Ala Arg Ser Leu Asn Leu Asp Gln Leu Asp Arg Ile Glu Arg	
355 360 365	
aat atc gca gag ttc tcc aaa gaa tgg gat gta aga act ttc gca tca	1152
Asn Ile Ala Glu Phe Ser Lys Glu Trp Asp Val Arg Thr Phe Ala Ser	
370 375 380	
acc gcc cgg aga ata tcg gaa gtt tac ccc gcg cga gac cta ttt gaa	1200
Thr Ala Arg Arg Ile Ser Glu Val Tyr Pro Ala Arg Asp Leu Phe Glu	
385 390 395 400	
act ctt aag aag gaa agc gag tca gcg tac aat aaa att att gag aag	1248
Thr Leu Lys Lys Glu Ser Glu Ser Ala Tyr Asn Lys Ile Ile Glu Lys	
405 410 415	
ttg aag gaa aga cca gac gca ctt ctc gat gaa gca cta cca ctg gac	1296
Leu Lys Glu Arg Pro Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ala Leu Pro Leu Asp	
420 425 430	
tga	1299

<210> 24
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> Saccharopolyspora sp.

<400> 24

Met Arg Arg Leu Ala Thr Gln Arg Arg Glu Asp Ala Tyr Lys Ser Asn
1 5 10 15

Arg Asp Tyr Gln Thr Val His Glu Ala Gln Ser Leu Arg Val Asn Ser
20 25 30

Thr Asp Asp Asp Asn Leu Ser Leu Phe Leu Leu Lys Asp Ile Ser Pro
35 40 45

LT 5263 B

Arg Glu Asp Ser Lys Asn Ile Val Gly Phe Gly Gly Phe Val Lys Pro
50 55 60

Glu Ile Ala Thr Thr Met Ala Leu Thr Leu Thr Thr Asp Ile Asp Lys
65 70 75 80

Gln Ile Lys Ser Val Pro Leu Ser Ser Asn Trp Asn Arg Ile Ser Ile
85 90 95

Val Ala Lys Phe Ala Ser Asn Pro Ser Val Ser Ile Thr Leu Gly Phe
100 105 110

Asp Gln Thr Pro Trp Val Asp Phe Trp Gly Ile Asn Ser Asp Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Ser Phe Val Ser Asp Ala Val Pro Leu Glu Met Ser Met Ile
130 135 140

Asp Ser Ile His Ile Ala Pro Glu Thr Leu Tyr Leu Asp His Ser Ser
145 150 155 160

Ala Cys Leu Leu Asp Ile Asp Pro Val Glu Ser Thr Arg Phe Lys Thr
165 170 175

Gly His Gly Asp Pro Leu Ser Leu Lys Lys Cys Ser Tyr Cys Gly Arg
180 185 190

Leu Leu Pro Ile Asp Leu Glu Arg Pro Gly Lys Leu Ser Phe His Lys
195 200 205

His Arg Ala Lys Ile Thr Asn His Gln Asn Glu Cys Arg Ser Cys Lys
210 215 220

Lys Trp Arg Ile Asn Asn Ser Phe Asn Pro Met Arg Thr Ile Asp Gln
225 230 235 240

Leu Asn Glu Ser Ala Leu Ile Thr Arg Glu Arg Lys Ile Phe Leu Gln
245 250 255

Glu Pro Glu Ile Leu Gln Glu Ile Lys Asp Arg Thr Gly Ala Gly Leu
260 265 270

Lys Ser Gln Val Trp Glu Arg Phe His Arg Lys Cys Phe Asn Cys Arg
275 280 285

Lys Asp Leu Lys Leu Ser Glu Val Gln Leu Asp His Thr Arg Pro Leu
290 295 300

LT 5263 B

Ala Tyr Leu Trp Pro Ile Asp Glu His Ala Thr Cys Leu Cys Ala Gln
305 310 315 320

Cys Asn Asn Thr Lys Lys Asp Arg Phe Pro Val Asp Phe Tyr Ser Glu
325 330 335

Gln Gln Ile Arg Glu Leu Ser Asp Ile Cys Gly Leu Pro Tyr Gln Asp
340 345 350

Leu Cys Ala Arg Ser Leu Asn Leu Asp Gln Leu Asp Arg Ile Glu Arg
355 360 365

Asn Ile Ala Glu Phe Ser Lys Glu Trp Asp Val Arg Thr Phe Ala Ser
370 375 380

Thr Ala Arg Arg Ile Ser Glu Val Tyr Pro Ala Arg Asp Leu Phe Glu
385 390 395 400

Thr Leu Lys Lys Glu Ser Glu Ser Ala Tyr Asn Lys Ile Ile Glu Ly
405 410 415

Leu Lys Glu Arg Pro Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ala Leu Pro Leu Asp
420 425 430

<210> 25

<211> 432

<212> PRT

<213> nežinomas

<220>

<223> Saccharopolyspora species Variantas 33

<400> 25

Met Arg Arg Leu Ala Thr Gln Arg Arg Glu Asp Ala Tyr Lys Ser Asn
1 5 10 15

Arg Asp Tyr Gln Thr Val His Glu Ala Gln Ser Leu Arg Val Asn Ser
20 25 30

Thr Tyr Asp Asp Asn Leu Ser Leu Phe Leu Leu Lys Asp Ile Ser Pro
35 40 45

Arg Glu Asp Ser Lys Asn Ile Val Gly Phe Gly Gly Phe Val Lys Pro
50 55 60

Glu Ile Ala Thr Thr Met Ala Leu Thr Leu Thr Thr Asp Ile Asp Lys
65 70 75 80

Gln Val Lys Ser Val Pro Leu Ser Ser Asn Trp Asn Arg Ile Ser Ile

85

90

95

Val Ala Lys Phe Ala Ser Asn Pro Ser Val Ser Ile Thr Leu Gly Phe
 100 105 110

Asp Gln Thr Pro Trp Val Asp Phe Trp Gly Ile Asn Ser Asp Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Ser Phe Val Ser Asp Ala Val Pro Leu Glu Met Ser Met Ile
 130 135 140

Asp Ser Ile His Ile Ala Pro Glu Thr Leu Tyr Leu Asp His Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Cys Leu Leu Asp Ile Asp Leu Val Glu Ser Thr Arg Phe Lys Thr
 165 170 175

Gly His Gly Asp Pro Leu Ser Leu Lys Lys Cys Ser Tyr Cys Gly Arg
 180 185 190

Leu Leu Pro Ile Asp Leu Glu Arg Pro Gly Lys Leu Ser Phe His Lys
 195 200 205

His Arg Ala Lys Ile Thr Asn His Gln Asn Glu Cys Arg Ser Cys Lys
 210 215 220

Lys Trp Arg Ile Asn Ile Ser Phe Asn Pro Met Arg Thr Ile Asp Gln
 225 230 235 240

Leu Asn Glu Ser Ala Leu Ile Thr Arg Glu Arg Lys Ile Phe Leu Gln
 245 250 255

Glu Pro Glu Ile Leu Gln Glu Ile Lys Asp Arg Thr Gly Ala Gly Leu
 260 265 270

Lys Ser Gln Val Trp Glu Arg Phe His Arg Lys Cys Phe Asn Cys Arg
 275 280 285

Lys Asp Leu Lys Leu Ser Glu Val Gln Leu Asp His Thr Arg Pro Leu
 290 295 300

Ala Tyr Leu Trp Pro Ile Asp Glu His Ala Thr Cys Leu Cys Ala Gln
 305 310 315 320

Cys Asn Asn Thr Lys Lys Asp Arg Phe Pro Val Asp Phe Tyr Ser Glu
 325 330 335

Gln Gln Ile Arg Glu Leu Ser Asp Ile Cys Gly Leu Pro Tyr Gln Asp

340

345

350

Leu Cys Ala Arg Ser Leu Asn Leu Asp Gln Leu Asp Arg Ile Glu Arg
 355 360 365

Asn Ile Ala Glu Phe Ser Lys Glu Trp Asp Val Arg Thr Phe Ala Ser
 370 375 380

Thr Ala Arg Arg Ile Ser Glu Val Tyr Pro Ala Arg Asp Leu Phe Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Lys Lys Glu Ser Glu Ser Ala Tyr Asn Lys Ile Ile Glu Lys
 405 410 415

Leu Lys Glu Ile Pro Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ala Leu Pro Leu Asp
 420 425 430

<210> 26

<211> 432

<212> PRT

<213> nežinomas

<220>

<223> Saccharopolyspora species variantas E250K

<400> 26

Met Arg Arg Leu Ala Thr Gln Arg Arg Glu Asp Ala Tyr Lys Ser Asn
 1 5 10 15

Arg Asp Tyr Gln Thr Val His Glu Ala Gln Ser Leu Arg Val Asn Ser
 20 25 30

Thr Asp Asp Asp Asn Leu Ser Leu Phe Leu Leu Lys Asp Ile Ser Pro
 35 40 45

Arg Glu Asp Ser Lys Asn Ile Val Gly Phe Gly Gly Phe Val Lys Pro
 50 55 60

Glu Ile Ala Thr Thr Met Ala Leu Thr Leu Thr Thr Asp Ile Asp Lys
 65 70 75 80

Gln Ile Lys Ser Val Pro Leu Ser Ser Asn Trp Asn Arg Ile Ser Ile
 85 90 95

Val Ala Lys Phe Ala Ser Asn Pro Ser Val Ser Ile Thr Leu Gly Phe
 100 105 110

Asp Gln Thr Pro Trp Val Asp Phe Trp Gly Ile Asn Ser Asp Asp Ile
 115 120 125

LT 5263 B

Gly Leu Ser Phe Val Ser Asp Ala Val Pro Leu Glu Met Ser Met Ile
130 135 140

Asp Ser Ile His Ile Ala Pro Glu Thr Leu Tyr Leu Asp His Ser Ser
145 150 155 160

Ala Cys Leu Leu Asp Ile Asp Pro Val Glu Ser Thr Arg Phe Lys Thr
165 170 175

Gly His Gly Asp Pro Leu Ser Leu Lys Lys Cys Ser Tyr Cys Gly Arg
180 185 190

Leu Leu Pro Ile Asp Leu Glu Arg Pro Gly Lys Leu Ser Phe His Lys
195 200 205

His Arg Ala Lys Ile Thr Asn His Gln Asn Glu Cys Arg Ser Cys Lys
210 215 220

Lys Trp Arg Ile Asn Ile Ser Phe Asn Pro Met Arg Thr Ile Asp Gln
225 230 235 240

Leu Asn Glu Ser Ala Leu Ile Thr Arg Lys Arg Lys Ile Phe Leu Gln
245 250 255

Glu Pro Glu Ile Leu Gln Glu Ile Lys Asp Arg Thr Gly Ala Gly Leu
260 265 270

Lys Ser Gln Val Trp Glu Arg Phe His Arg Lys Cys Phe Asn Cys Arg
275 280 285

Lys Asp Leu Lys Leu Ser Glu Val Gln Leu Asp His Thr Arg Pro Leu
290 295 300

Ala Tyr Leu Trp Pro Ile Asp Glu His Ala Thr Cys Leu Cys Ala Gln
305 310 315 320

Cys Asn Asn Thr Lys Lys Asp Arg Phe Pro Val Asp Phe Tyr Ser Glu
325 330 335

Gln Gln Ile Arg Glu Leu Ser Asp Ile Cys Gly Leu Pro Tyr Gln Asp
340 345 350

Leu Cys Ala Arg Ser Leu Asn Leu Asp Gln Leu Asp Arg Ile Glu Arg
355 360 365

Asn Ile Ala Glu Phe Ser Lys Glu Trp Asp Val Arg Thr Phe Ala Ser
370 375 380

LT 5263 B

Thr Ala Arg Arg Ile Ser Glu Val Tyr Pro Ala Arg Asp Leu Phe Glu
385 390 395 400

Thr Leu Lys Lys Glu Ser Glu Ser Ala Tyr Asn Lys Ile Ile Glu Lys
405 410 415

Leu Lys Glu Arg Pro Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ala Leu Pro Leu Asp
420 425 430

<210> 27
<211> 11
<212> DNR
<213> nežinomas
<220>
<223> sintetinis

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

<400> 27
cgannnnntg c

11

<210> 28
<211> 11
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinis

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

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

<400> 28
acnnnngtay c

11

<210> 29
<211> 11
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinis

<220>
<221> įvairūs požymiai

<222> (3)..(9)
<223> n=g,a,c arba t

<400> 29
ccnnnnnnng g

11

<210> 30
<211> 10
<212> DNR
<213> nežinomas

<220>
<223> sintetinis

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

<400> 30
gagtcnnnnn

10

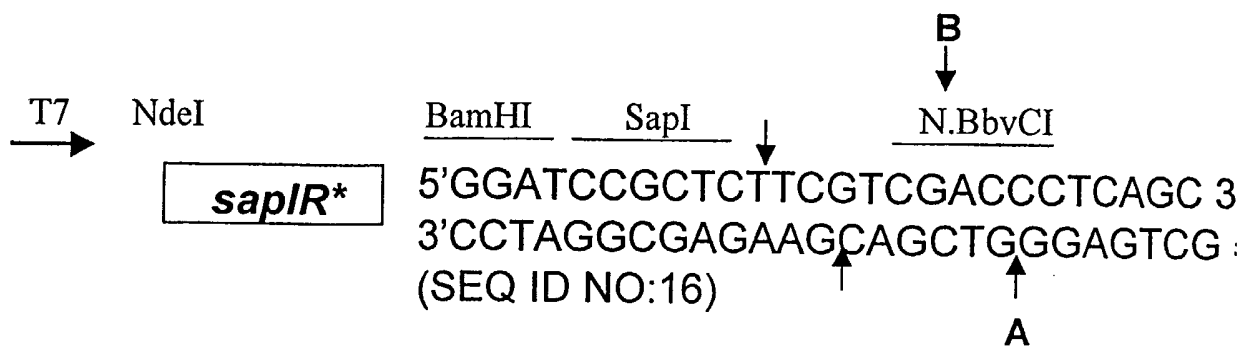


Fig. 1

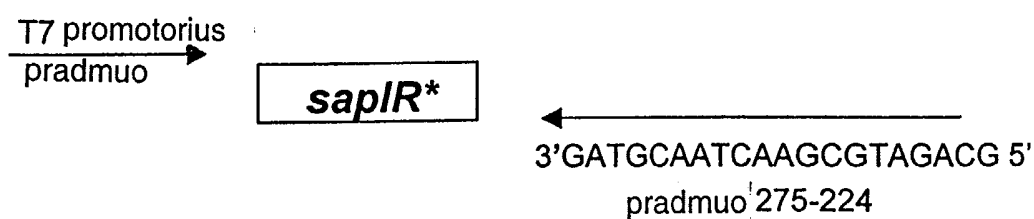
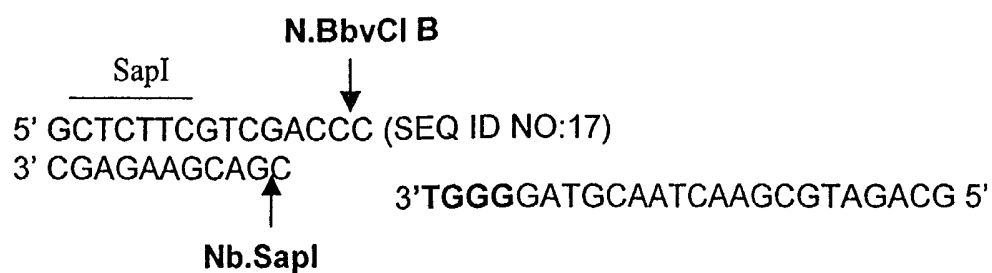


Fig. 2

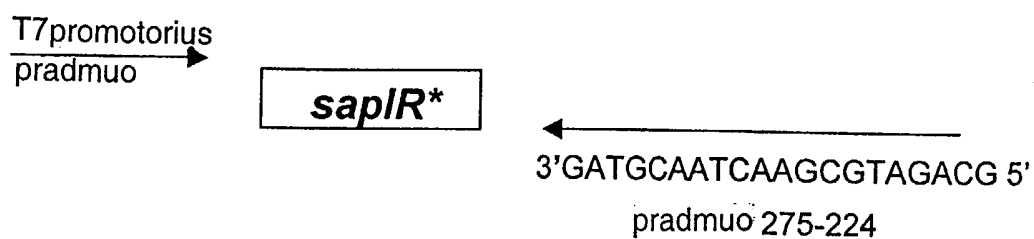
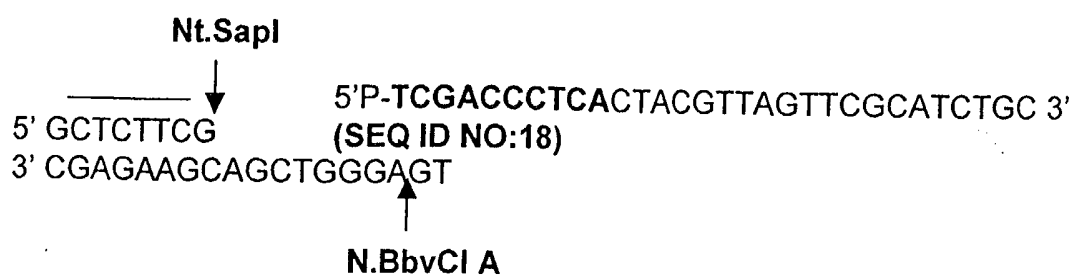


Fig. 3

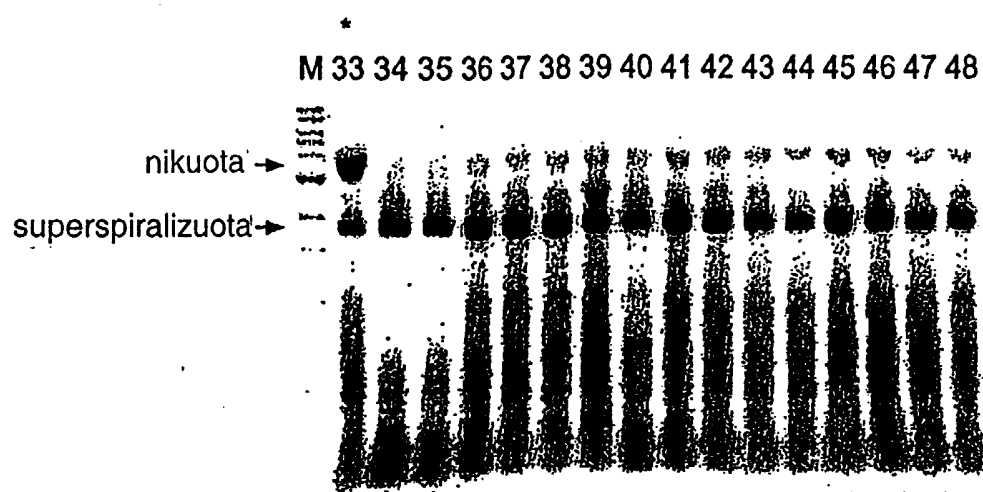


Fig. 4

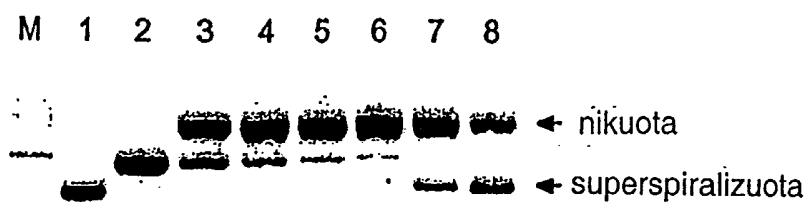


Fig. 5

pUC19 substratas

5' TCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG 3'
(SEQ ID NO:19)
3' ACGCATAACCCGCGAGAAGGCGAAGGAGC 5'

Nb.SapI
Geliu išvalytas nikuotas produktas

pradmuo

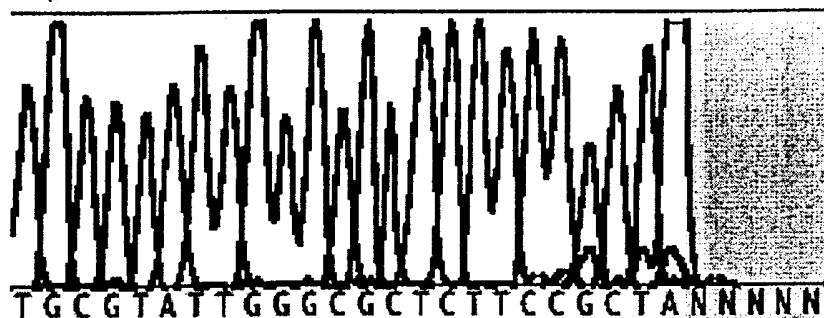
Run-off seka

5' TCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTannnnn 3'
(SEQ ID NO:20)

Nikuota matrica

3' ACGCATAACCCGCGAGAAGGCGA 5'

Run-off sekvenavimas nuo nikuotos apatinės grandinės



Sekvenavimas matrica naudojant intaktinę viršutinę grandinę

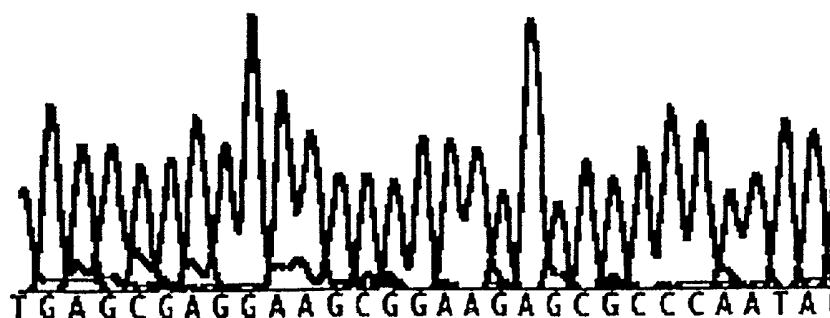


Fig. 6

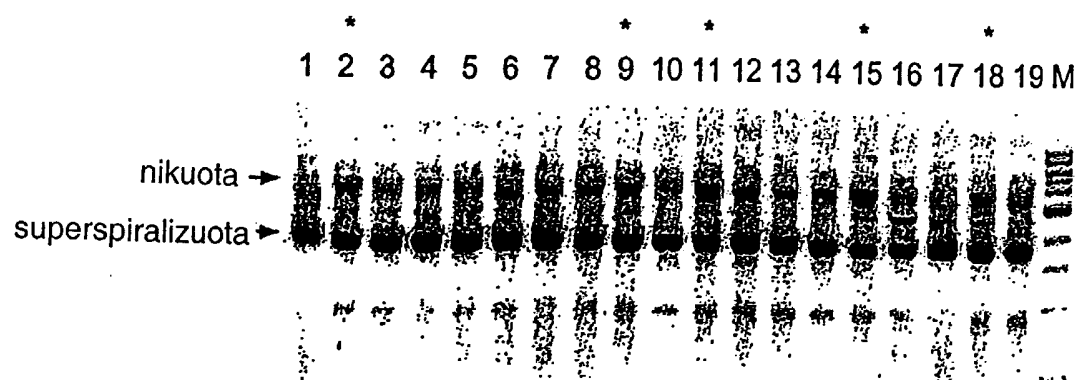


Fig. 7

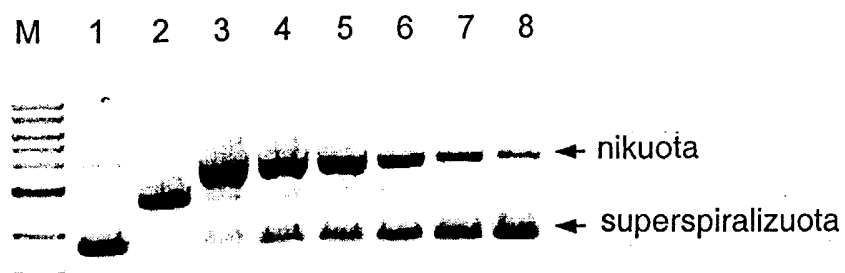
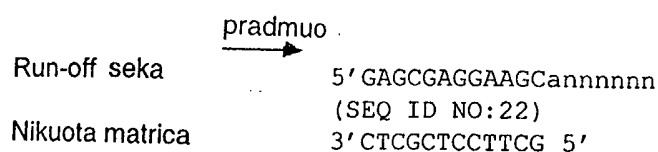
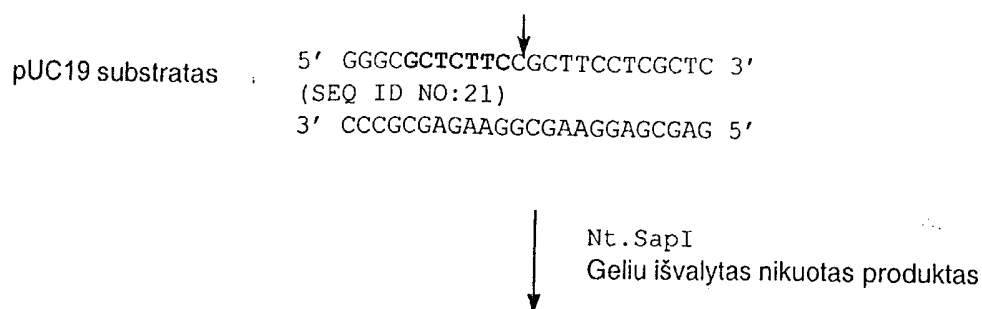
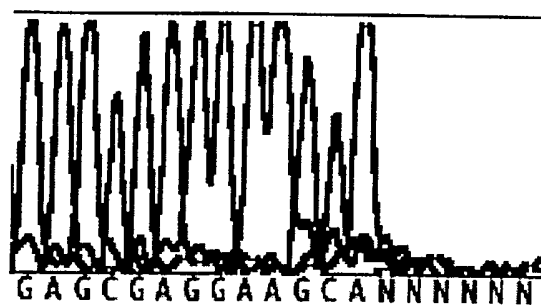


Fig. 8



„Run-off“ sekvenavimas nuo nikuotos viršutinės grandinės



Sekvenavimas matrica naudojant intaktingą apatinę grandinę

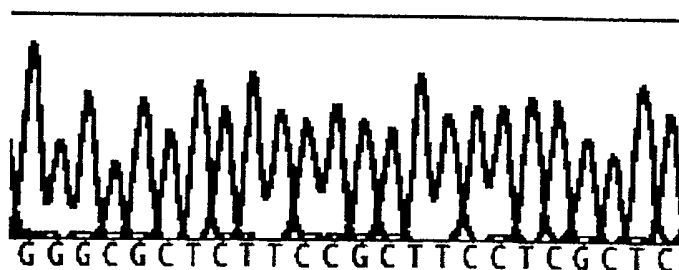


Fig. 9

(SEQ ID NO:23)

```

      ATGCGGAGGCTTGCTACACAACGACGCGAGGACGCGTACAAATCAAATAGGGATTATCAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
      M R R L A T Q R R E D A Y K S N R D Y Q
      ACCGTGCACGAAGCTCAGAGCCTTCGAGTCAACTCGACCGATGATGACAACCTGAGCCTC
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
      T V H E A Q S L R V N S T D D D N L S L
      TTCCTCTTGAAAGATATTTACCCCG CGAAGATTCTAAAAATATTGTAGGATTGAGGCG
121  -----+-----+-----+-----+-----+ 180
      F L L K D I S P R E D S K N I V G F G G
      TTCGTCAAGCCCGAAATCGCCACCACCATGGCGCTTACCTTAACGACAGA CATCGATAAA
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 240
      F V K P E I A T T M A L T L T T D I D K
      CAAATAAAATCAGTGCCGTTATCCTCGAATTGGAATCGGATCAGCATCGTTGCAAAGTTC
241  -----+-----+-----+-----+-----+ 300
      Q I K S V P L S S N W N R I S I V A K F
      GCGAGCAACCCGTCTGTTAGCATTACTCTGGGATTGATCAAACCCCATGGGTCGATTTC
301  -----+-----+-----+-----+-----+ 360
      A S N P S V S I T L G F D Q T P W V D F
      TGGGGCATCAATTGCGACGATATCGGCCCTTTCATTGTATCGGACGCAGTCCCTCTTGAA
361  -----+-----+-----+-----+-----+ 420
      W G I N S D D I G L S F V S D A V P L E
      ATGAGCATGATTGATAGCATACATATTGCCCCGAAACACTATACCTTGATCACTCAAGC
421  -----+-----+-----+-----+-----+ 480
      M S M I D S I H I A P E T L Y L D H S S
      GCATGTCTCCTTGACATTGATCCAGTGAATCGACACGCTTCAAAACAGGCCATGGTGAC
481  -----+-----+-----+-----+-----+ 540
      A C L L D I D P V E S T R F K T G H G D
      CCTTTAAGTCTGAAGAAATGCTCATACTGCGGCCGCTTCTTCCTATAGACCTCGAGCGT
541  -----+-----+-----+-----+-----+ 600
      P L S L K K C S Y C G R L L P I D L E R
      CCCGGCAAGCTGTCTTTTACAAACATCGAGCCAAATCACTAATCATCAGAACGAGTGT
601  -----+-----+-----+-----+-----+ 660
      P G K L S F H K H R A K I T N H Q N E C
      CGTTCATGTAAGAAGTGGCGAATAAACAACCTCCTTCAATCCGATGCGCACGATTGACCAG
661  -----+-----+-----+-----+-----+ 720
      R S C K K W R I N N S F N P M R T I D Q
      CTTAACGAGT CAGCACTTATCACACGTGAGCGAAAGATATTCCTGCAAGAACCAGAAATT
721  -----+-----+-----+-----+-----+ 780
      L N E S A L I T R E R K I F L Q E P E I

```

Fig. 10-1

{ SEQ ID NO:23 lqsinyS }

```

CTTCAGGAAATTAAGGATAGGACCGGCGGGGACTTAAAAGTCAAGTGTGGGAACGATTC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
L Q E I K D R T G A G L K S Q V W E R F
CATCGCAAGTGCTTCAACTGTAGAAAAGATCTCAAATAAGCGAGGTTCAACTGGACCAC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
H R K C F N C R K D L K L S E V Q L D H
ACTCGGCCGCTTGCATACCTATGGCCGATT GATGAGCATGCGACTTGCTTGTGCGCACAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
T R P L A Y L W P I D E H A T C L C A Q
TGCAACAATACCAAAAAAGACCGCTTTCCTGTAGATTCTATAGCGAACAGCAG ATACGC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
C N N T K K D R F P V D F Y S E Q Q I R
GAACTGTCGACATTTGCGGACTTCCGTATCAGGATCTATGTGCTCGCTCGTTGAATTTA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
E L S D I C G L P Y Q D L C A R S L N L
GATCAACTCGATAGGATCGAGCGTAATATCGCAGAGTTCTCCAAAGAATGGGATGTAAGA
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
D Q L D R I E R N I A E F S K E W D V R

ACTTTTCGCATCAACCGCCCGGAGAATATCGGAAGTTTACCCGCGCGAGACCTATTTGAA
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
T F A S T A R R I S E V Y P A R D L F E
ACTCTTAAGAAGGAAAGCGAGTCAGCGTACAATAAAATTATTGAGAAGTTGAAGGAAAGA
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
T L K K E S E S A Y N K I I E K L K E R
CCAGACGCACTTCTCGATGAAGCACTACCACTGGACTGA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1299
P D A L L D E A L P L D *

```

Fig. 10-2

(SEQ ID NO:25)

1 MRRLATQRRE DAYKSNRDYQ TVHEAQLRV NST ~~Q~~DDNLSL FLLKDISPRE
 51 DSKNIVGFGG FVKPEIATTM ALTLTDDIDK Q ~~Q~~KSVPLSSN WNRISIVAKF
 101 ASNPSVSITL GFDQTPWVDF WGINSDDIGL SFVSDAVPLE MSMIDSIHIA
 151 PETLYLDHSS ACLLDID ~~Q~~VE STRFKTGHGD PLSLKKCSYC GRLLPIDLER
 201 PGKLSFHKHR AKITNHQNEC RSCKKWRINI SFNPMRTIDQ LNESALITRE
 251 RKIFLQEPEI LQEIKDRTGA GLKSQVWERF HRKCFNCRKD LKLSEVQLDH
 301 TRPLAYLWPI DEHATCLCAQ CNNTKKDRFP VDFYSEQQIR ELSDICGLPY
 351 QDLCARSLNL DQLDRIERNI AEFSKEWDVR TFASTARRIS EVYPARDLFE
 401 TLKKESESAY NKIIEKLKE ~~Q~~ PDALLDEALP LD*

(SEQ ID NO:26)

1 MRRLATQRRE DAYKSNRDYQ TVHEAQSLRV NSTDDNLSL FLLKDISPRE
51 DSKNIVGEGG FVKPEIATTM ALTLTDDIDK QIKSVPLSSN WNRISIVAKF
101 ASNPSVSITL GFDQTPWVDF WGINSDDIGL SFVSDAVPLE MSMIDSIHIA
151 PETLYLDHSS ACLLDIDPVE STRFKTGHGD PLSLKKCSYC GRLLPIDLER
201 PGKLSFHKHR AKITNHQNEC RSCKKWRINI SFNPMRTIDQ LNESALITR K
251 RKIFLQPEI LQEIKDRTGA GLKSQVWERF HRKCFNCRKD LKLSEVQLDH
301 TRPLAYLWPI DEHATCLCAQ CNNTKKDRFP VDFYSEQQIR ELSDICGLPY
351 QDLCARSLNL DQLDRIERNI AEFSKEWDVR TFASTARRIS EVYPARDLFE
401 TLKKESESAY NKIEKLKER PDALLDEALP LD*