

(19)



(10) **LT 2014 078 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2014 078** (51) Int. Cl. (2015.01): **C12N 9/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2012 08 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 02 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: **2012 081**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US2011/023944**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2011 02 07**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2012 08 29**

(30) Prioritetas: **61/301666, 2010 02 05, US**  
**61/387800, 2010 09 29, US**

(71) Pareiškėjas:  
**NEW ENGLAND BIOLABS, INC., 240 County Road, Ipswich, MA 01938, US**

(72) Išradėjas:  
**Zhenyu ZHU, US**  
**Aine QUIMBY, US**  
**Shengxi GUAN, US**  
**Dapeng SUN, US**  
**Yishu HUANG, CN**  
**Xuhui LAI, CN**  
**Siu-hong CHAN, US**  
**Xianghui LI, CN**  
**Shuang Yong XU, US**  
**Chunhua ZHANG, CN**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Tatjana STERLINA, UAB „Intels“, Naugarduko g. 32/2, LT-03225 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:  
**Didelio tikslumo restrikcijos endonukleazės**

(57) Referatas:

Pateikiami mutantinių fermentų su susilpnintu žvaigždiniu aktyvumu gavimo genų inžineriniai metodai ir kompozicijos, kur mutantiniai fermentai apibrėžtame buferyje turi didesnį tikslumo indeksą (FI), negu nemutuotų fermentų FI tokiame pačiame buferyje.

## **DIDELIO TIKSLUMO RESTRIKCIJOS ENDONUKLEAZĖS**

### **Teoriniai pagrindai**

Restrikcijos endonukleazės yra fermentai, kurie skaldo dvigrandę DNR, atpažindami specifines sekas (Roberts, R.J. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5905-5908 (2005); Roberts, et al. *Nucleic Acids Res* 31 : 1805-1812 (2003); Roberts, et al. *Nucleic Acids Res* 33: D230-232 (2005); Alves, et al. *Restriction Endonucleases*, "Protein Engineering of Restriction Enzymes," ed. Pingoud, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 393-407 (2004)). Jos yra plačiai paplitę tarp prokariotinių organizmų (Raleigh, et al., *Bacterial Genomes Physical Structure and Analysis*, Ch.8, eds. De Bruijn, et al., Chapman & Hall, New York, 78-92 (1998)), kuriuose jie sudaro dalį restrikcijos-modifikacijos sistemos, kuri pagrinde susideda iš endonukleazės ir metiltransferazės. Gimininga metiltransferazė metilina tokią pačią specifinę seką, kurią atpažįsta suporuota endonukleazė taip, kad šeimininko DNR būtų tinkamai apsaugota. Tačiau, jeigu yra svetimos DNR invazija, ypač bakteriofago DNR, svetima DNR gali būti suardyta prieš tai, kol ji bus pilnai metilinta. Restrikcijos-modifikacijos sistemos pagrindinė biologinė funkcija yra apsaugoti šeimininką nuo bakteriofagų infekcijos (Arber *Science* 205 : 361-365 (1979)). Yra taip pat galimos ir kitos funkcijos, tokios kaip dalyvavimas rekombinacijoje ir transpozicijoje (Carlson, et al. *Mol Microbiol*, 27 : 671-676 (1998); Heitman, *Genet Eng (N Y)* 15 : 57-108 (1993); McKane, et al. *Genetics* 139 : 35-43 (1995)).

Žinomas maždaug 3000 restrikcijos endonukleazių specifiškumas daugiau negu 250 skirtingoms taikinio sekoms. Atradus pirmosios restrikcijos endonukleazės sekai specifinę prigimtį (Danna, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 : 2913-2917 (1971); Kelly, et al., *J Mol Biol* 51 : 393-409 (1970)), netrukus mokslininkai atrado, kad tam tikros restrikcijos endonukleazės skaldo sekas, kurios yra panašios, bet neidentiškos jų apibrėžtoms atpažinimo sekoms, esant neoptimalioms sąlygoms (Polisky, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 : 3310-3314 (1975) ; Nasri, et al., *Nucleic Acids Res* 14: 811-821 (1986)). Šis susilpnintas specifiškumas yra pavadintas restrikcijos endonukleazių žvaigždiniu aktyvumu.

Žvaigždinis aktyvumas yra molekulinės biologijos reakcijų problema. Žvaigždinis aktyvumas klonavimo vektoriuose arba kitoje DNR įveda nepageidaujamus kirpimus.

Tokiuose atvejuose kaip teismo ekspertizė, kur tam tikras DNR substratas turi būti perkirptas restrikcijos endonukleaze, sukuriant unikalų individo DNR profilį („pirštų atspaudą“), žvaigždinis aktyvumas pakeičia skėlimo pobūdį, taip komplikuojamas analizė. Žvaigždinio aktyvumo išvengimas taip pat yra lemiamas tokiame pritaikyme, kaip grandinės nustūmimo amplifikacija (Walker, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 89 : 392-396 (1992)) ir nuosekli genų raiškos analizė (Velculescu, et al., Science 270 :484-487 (1995)).

## IŠRADIMO SANTRAUKA

Išradimo įgyvendinime yra pateikiamas restrikcijos endonukleazių ir jų variantų tikslumo indekso (FI) identifikavimo būdas, kuris apima reakcijos buferio ir DNR substrato, turinčio restrikcijos endonukleazės prisirišimo ir skėlimo vietą, parinkimą; sudarymą sąlygų vienodai praskiestai restrikcijos endonukleazei arba jos variantams perskelti DNR substratą; ir FI nustatymą kiekvienai restrikcijos endonukleazei ir vienam arba daugiau jos variantų.

Įgyvendinimo būdas dar apima restrikcijos endonukleazių ir jų variantų FI palyginimą, kad gautų pagerinimo faktorių, pvz., didesnę negu 2 kiekvienam variantui.

Išradimo įgyvendinime yra parinktas buferis, kuriame yra kalio acetatas, Tris acetatas ir magnio acetatas; arba magnio chloridas.

Papildomi įgyvendinimai apima:

(a) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 1, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S36, K77, P154, E163, Y165 ir K185.

(b) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 2, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K198 ir Q148.

(c) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 3, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S15, H20, E34, M58, Q95, R106, K108, T181, R187 ir R199.

(d) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 4, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš D16, D148 ir E132.

(e) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 5, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K75, N146 ir D256.

(f) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 6, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš E198 ir D200.

(g) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 7, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K229, E025, R034 ir Q261.

(h) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 8, kurioje mutacijos padėtis yra K225.

(i) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 9, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš H137, D177, K363, K408, R411, Q215, Q226 ir Q230.

(j) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 10, kurioje mutacijos padėtis yra F376.

(k) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 11, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš R78, T140, E152, R199 ir F217.

(l) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 12, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš G26, P105, T195, Q210, Y147, Y193, K114, T197, S245, D252 ir Y027.

(m) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 13, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš H10, N208, K48, K74, R75, Y56, K58 ir M117.

(n) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 14, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K014, Q069, E099, R105, R117, G135 ir Y035.

(o) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 15, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš N106, Q169, E314 ir R126.

(p) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 16, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš T20, P52, Y67, K68, R75, E86, Q90, S91, Q93, H121 ir G172.

(q) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 17 kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš E059, P065, S108, N172, K174, Q179, G182 ir Y055.

(r) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 18, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš N212 ir L213.

(s) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 19, turinčią mutaciją N65 padėtyje.

(t) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 20, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš E007, D011, E049, R073, R114, G137, S210 ir R213.

(u) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 21, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš P079, E086, H096 ir E218.

(v) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 22, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš E32, S081, G132, F60 ir S61.

(w) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 23, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš G013, G016, K018, P052, R053, K070, E071, D072, G073, S84, E086, R090, K094, R095, P099, P103, K113, N135, S151, P157, G173, T204, S206, K207, E233, N235, E237, S238, D241, K295, S301 ir S302.

(x) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 24, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S64, S80, S162, T77/T96 ir N 178.

(y) Kompozicija, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 25, kurioje R232 padėtis yra mutuota.

(z) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 26, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S50, Y81, N93 ir W207.

(aa) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 27, turintį G26 mutaciją.

(bb) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 28, turintį E122/R132 mutaciją.

(cc) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 29, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš N016, S33, P36, H76, P87, N89, R90, T138, K141, K143, Q221, Q224, N253, Q292, R296, T152, G326 ir T324.

(dd) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 30, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K024, P214, E146, N251 ir Y095.

(ee) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 31, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš G075, Q099, G155, P022 ir R90.

(ff) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 32, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S097 ir E125.

(gg) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 33, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K021, I031 ir T120.

(hh) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 34, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš K7, T10, N11, N14, Q232 ir T199.

(ii) Kompozicija, apimančia: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 35, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš P92, P144, G197 ir M 198.

Bet kuri aukščiau esanti kompozicija dar gali būti charakterizuojama tuo, kad mutuotas fermentas iš anksto numatytame buferyje turi didesnę FI, negu fermentas neturintis mutacijų iš anksto numatytame buferyje.

## TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Figūrose 1A ir 1B parodytas PvuI-HF ir PvuI-WT aktyvumo palyginimas.

Figūroje 1A žvaigždutės (\*) ženklas žymi takelį kairėje (takelis 2), kur žvaigždinis aktyvumas daugiau neaptinkamas. Ženklas (#) žymi takelį dešinėje (takelis 8), kur įvyksta dalinis suskaldymas. Pradinė PvuI-WT koncentracija buvo paskaičiuota 77 vienetai.

Figūroje 1B pilnas suskaldymas buvo stebimas iki 15 takelio, po kurio buvo stebimas žvaigždinis aktyvumas. Praskiedimo riba, įgalinanti pilną suskaldymą, buvo praplėsta nuo 6 praskiedimų iki 15 praskiedimų serijoje. Pradinė PvuI-HF koncentracija buvo paskaičiuota mažiausiai 9600 vienetai.

Figūrose 2A ir 2B parodytas HindIII-HF ir HindIII-WT aktyvumo palyginimas.

Figūroje 2A žvaigždutės (\*) ženklas žymi takelį kairėje (takelis 9), kur žvaigždinis aktyvumas daugiau neaptinkamas. Ženklas (#) žymi takelį dešinėje (takelis 15), kur įvyksta dalinis suskaldymas. Pradinė HindIII-WT koncentracija buvo paskaičiuota 9600 vienetai.

Figūroje 2B pilnas suskaldymas buvo stebimas iki 13 takelio, po kurio buvo stebimas žvaigždinis aktyvumas. Praskiedimo riba, įgalinanti pilną suskaldymą, buvo praplėsta nuo 6 praskiedimų iki 13 praskiedimų serijoje. Pradinė HindIII-HF koncentracija buvo paskaičiuota mažiausiai 2400 vienetai.

Figūrose 3A ir 3B parodytas DraIII-HF ir DraIII-WT aktyvumo palyginimas.

Figūroje 3A žvaigždutės (\*) ženklas žymi takelį kairėje (takelis 12), kur žvaigždinis aktyvumas daugiau neaptinkamas. Ženklas (#) žymi takelį dešinėje (takelis 12), kur įvyksta dalinis suskaldymas. Nei žvaigždinio aktyvumo nei dalinio DNR suskaldymo nestebima. Pradinė DraIII-WT koncentracija buvo paskaičiuota 1200 vienetai.

Figūroje 3B pilnas suskaldymas buvo stebimas iki 12 takelio, po kurio buvo stebimas žvaigždinis aktyvumas. Praskiedimo riba, įgalinanti pilną suskaldymą, buvo praplėsta nuo 6 praskiedimų iki 13 praskiedimų serijoje. Pradinė DraIII-HF koncentracija buvo paskaičiuota mažiausiai 1200 vienetai.

Figūrose 4A ir 4B parodytas KpnI-HF ir KpnI-WT aktyvumo palyginimas.

Figūroje 4A \* ženklas žymi takelį kairėje (takelis 9), kur žvaigždinis aktyvumas daugiau neaptinkamas. Ženklas # žymi takelį dešinėje (takelis 13), kur įvyksta dalinis suskaldymas. Figūroje 1A pradinė KpnI-WT koncentracija buvo paskaičiuota 2000 vienetai.

Figūroje 4B pilnas suskaldymas buvo nustatytas visą laiką be žvaigždinio aktyvumo arba dalinio skaldymo. Pradinė KpnI-HF koncentracija buvo paskaičiuota didesnė negu 12000 vienetų.

Figūrose 5A ir 5B parodytas StyI-HF ir StyI-WT aktyvumo palyginimas.

Figūroje 5A \* ženklas žymi žvaigždinio aktyvumo pradžią kairėje (takelis 6), ženklas # žymi dalinio aktyvumo pradžią dešinėje (takelis 12). Pradinis StyI-WT kiekis buvo paskaičiuotas 1000 vienetų.

Figūroje 5B žvaigždinis aktyvumas buvo nustatytas pirmuose 2 takeliuose ir dalinis skaldymas nuo 14 arba 15 takelio. Pradinis StyI-HF kiekis buvo paskaičiuotas 4000 vienetų.

Figūroje 6 parodytas BglI-HF ir BglI-WT palyginimas ant pXba. BglI-HF turi FI mažiausiai 8000, tuo tarpu BglI-WT turi FI 32, jeigu pagerinimo faktorius yra mažiausiai 250. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 7 parodytas BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas ant pBR322. BsrDI-HF turi FI mažiausiai 1000 buferyje NEB4, tuo tarpu BsrDI-WT turi  $\frac{1}{2}$  FI, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 2000. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 8 parodytas BclI-HF ir BclI-WT palyginimas buferyje NEB4 ant lambda (dam-). BclI-HF turi FI mažiausiai 2000, tuo tarpu BclI-WT turi FI 32, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 64. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 9 parodytas BglII-HF ir BglII-WT palyginimas ant pXba. BglII-HF turi FI mažiausiai 32000, tuo tarpu BglII-WT turi FI 16, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 2000. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 10 parodytas BstEII-HF ir BstEII-WT palyginimas ant lambda DNR. BstEII-HF turi FI mažiausiai 2000, tuo tarpu BstEII-WT turi FI 4, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 500. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 11 parodytas SfiI-HF ir SfiI-WT palyginimas ant pBC4. SfiI-HF turi FI mažiausiai 8000 NEB4 buferyje, tuo tarpu SfiI-WT turi FI 64, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 120. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 12 parodytas SmaI-HF ir SmaI-WT palyginimas ant pXba. SmaI-HF turi FI mažiausiai 256000, tuo tarpu SmaI-WT turi FI 64, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 4000. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 13 parodytas BsmBI-HF ir BsmBI-WT palyginimas ant lambda DNR. BsmBI-HF turi FI 250 NEB4 buferyje, tuo tarpu BsmBI-WT turi FI 4, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 64. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 14 parodytas BstNI-HF ir BstNI-WT palyginimas ant pBR322. BstNI-HF turi FI 500 NEB4 buferyje, tuo tarpu BstNI-WT turi FI 4, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 120. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 15 parodytas MluI-HF ir MluI-WT palyginimas ant lambda DNR. BstNI-HF turi FI mažiausiai 32000 NEB4 buferyje, tuo tarpu MluI-WT turi FI 32, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 120. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 16 parodytas NspI-HF ir NspI-WT palyginimas ant pUC19. NspI-HF turi FI mažiausiai 500 NEB4 buferyje, tuo tarpu NspI-WT FI turi 32, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 16. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 17 parodytas BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas ant pBR322. BsrFI-HF turi FI mažiausiai 500 NEB4 buferyje, tuo tarpu BsrFI-WT turi FI 16, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 32. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

## DETALUS ĮGYVENDINIMŲ APRAŠYMAS

Restrikcijos endonukleazių mutantų su pagerintu specifiškumu vienai sekai sukūrimas nėra paprastas. Susiduriama su daugybe problemų, kaip sekančios: mutuotas fermentas turi sumažėjusį aktyvumą arba jo visai neturi, neturi sumažinto žvaigždinio aktyvumo arba faktiškai turi padidėjusį žvaigždinį aktyvumą. Be to, mutuotas fermentas negali būti klonuotas ir tokiu būdu negali būti analizuojamas.

Nesėkmė siekiant pagaminti mutantą gali įvykti dėl daugybės galimų priežasčių, įskaitant bet kurią iš sekančių. Tai gali įvykti dėl nesėkmingos atvirkštinės PGR. Gali būti, kad mutacija, sukelianti naują specifinį aktyvumą yra toksiška ląstelei šeimininkei, netgi jeigu ji vykdo giminingos metilazės raišką, esant sąlygoms, kurios įprastai yra saugios nemutuotos restrikcijos endonukleazės raiškai. Šiomis aplinkybėmis negali būti gaunamas gyvybingas mutantinis klonas. Be to mutantas gali turėti pirmenybę tam tikram buferiui,

kad jeigu tiriama kitame buferyje, aktyvumas nenustatomas. Kitas sunkumas, su kuriuo susiduriama, yra tas, kad net jeigu paprastai tiriamas kiekvienos mutacijos neapdorotas lizatas ir lizate aktyvumas neaptikamas, laikant, kad bandymas neigiamas. Kai kuriais atvejais fermentas turi būti išgrynintas, kad būtų aptiktas aktyvumas.

Stebina tai, kad kai kuriuose pavyzdžiuose, prolino pakeitimas alaninu duoda variantus su norimu FI truputį didesniu negu 250 ir duodančiu mažiausiai dvigubą pagerinimo faktorių. Tai pailiustruota Pvul, BamHI, NruI ir SpeI variantuose.

Kiti sunkumai didelio tikslumo mutantų gavime susiję su DNR, koduojančios kai kurias restrikcijos endonukleazės, dydžiu. Tokią DNR gali būti sunku amplifikuoti PGR metodu dėl didelio matricos dydžio. Be to, PGR produktai kai kuriomis aplinkybėmis lengvai nesitransformuoja į naują šeiminką. Netgi jeigu transformacija į ląstelę šeiminkę bus sėkminga, transformuotos ląstelės ne visada duos kolonijas ir tuo būdu mutaciją bus nelengva aptikti. Kai kuriais atvejais, netgi jeigu po transformacijos kolonijos aptinkamos, jos negali būti kultivuojamos jokiomis sąlygomis.

Priežastys, mažinančios mutantų specifinį aktyvumą gali būti sekančios: mutacija sąveikauja su baltymo susilankstymu, kuris žymiai mažina raiškos lygį arba mutacija veikia specifinį fermento aktyvumą.

Pavyzdžiui, tai buvo nustatyta StyI mutantams: N34A, F35A, D58A, F65A, K66A, K67A, F100A, N148A, E213A, F250A, T251A, D258A, D262A, N283A, R293A, F294A, R295A, R296A, D298A, D299A, M304A, M310A, D318A, S337A, S346A ir F371A.

Fermentinio aktyvumo praradimas gali įvykti dėl bet kurios sekančios priežasties, apimančios: mutacija pašalina liekanas, kurios yra svarbios katalizei; mutacijos pasėkoje pakeistos liekanos, kurios yra svarbios susilankstymui, taigi, klaidingai sulankstytas mutuotas baltymas yra neaktyvus.

Pavyzdžiui, tai buvo nustatyta StyI mutantams: M33A, D37A, F41A, D55A, D71A, N77A, R79A, E80A, F81A, T82A, E83A, F97A, F101A, E136A, W137A, M138A, M140A, K144A, Q145A, R151A, R255A, R259A, S261A, T264A, F278A, R281A, T284A, M297A, H305A, N306A, D314A, D338A ir E382A.

Didelio tikslumo mutantų sukūrimas reikalauja kruopštaus darbo. Yra atrenkama ir testuojama daugybė mutantų ir santykinai tik mažas skaičius rodo didelį tikslumą. Buvo neįmanoma numatyti ekstrapoliacijos metodu, kurie mutantai galimai rodys pagerintas savybes.

Bandymų, atliktų siekiant identifikuoti didelio tikslumo restrikcijos endonukleazių variantus, pavyzdžiai parodyti 1-17 figūrose. Figūrose parodyti ir laukinio tipo ir didelio tikslumo variantų rezultatai viename buferyje. Visose figūrose parodyti perskeltos DNR kiekiai ir tipai, po dviejų skiedimų serijos gelyje iš kairės į dešinę, fermento koncentracijai mažėjant trikampio kryptimi. Lentelėje 1 pavaizduoti 33 fermentų rezultatai. Pavyzdžiuose panaudoti restrikcijos endonukleazės reakcijos buferiai (1-4 buferiai) yra apibrėžti pvz. NEB kataloge (2009/10). Kiti buferiai gali būti parinkti pagal naudotojo teikiama pirmenybę.

Bandymuose gautas FI yra didžiausios restrikcijos fermento koncentracijos, nerodančios akivaizdaus žvaigždinio aktyvumo, santykis kaip nustatyta esant juostoms, susijusioms su žvaigždiniu aktyvumu, su restrikcijos fermentų koncentracija, kuri pilnai suskaldo 1  $\mu$ g standartinio DNR substrato 50-yje  $\mu$ l reakcijos per 1 valandą nustatytoje temperatūroje, standartiniuose NEB buferiuose. 6-17 figūrose yra uždėtas rėmelis, rodantis žvaigždinio aktyvumo juostas. Išradimo įgyvendinimuose FI yra pavyzdžiui geriau bent 250, pavyzdžiui didesnis negu 500, pavyzdžiui didesnis negu 1000, pavyzdžiui didesnis negu 5000.

Tikslumo pagerinimo reikšmė yra skaičiuojama kaip varianto FI santykis padalintas iš nemutuoto fermento FI. Išradimo įgyvendinime, pagerinimo reikšmė yra pavyzdžiui geriau bent 2, pavyzdžiui geriau bent 4, pavyzdžiui geriau bent 8, pavyzdžiui geriau bent 16.

Įgyvendinime FI nurodomas didžiausio restrikcijos fermento kiekio, nerodančio akivaizdaus žvaigždinio aktyvumo, santykį su kiekiu, kuris pilnai suskaldo 1  $\mu$ g standartinio DNR substrato 50-yje  $\mu$ l reakcijos per 1 valandą būdingoje temperatūroje, standartiniuose NEB buferiuose.

1 lentelė: HF fermentų savybių santrauka

| Fermen-<br>tas | Subs-<br>tratas | FI1'              | FI2'              | FI3'                | FI4'              | Pvz. | Seka Nr. |
|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|------|----------|
| PvuI-HF        | pXba            | $\geq 2000(1/8)$  | $\geq 16000(1)$   | $\geq 4000(\%)$     | $\geq 16000(1)$   | 1    | 1        |
| HindIII-HF     | $\lambda$       | $\geq 260000(\%)$ | $\geq 260000(\%)$ | $\geq 250(1/2000)$  | $\geq 520000(1)$  | 2    | 2        |
| DraIII-HF      | $\lambda$       | $\geq 120(1/16)$  | $\geq 1000(\%)$   | $\geq 32(1/64)$     | $\geq 2000(1)$    | 3    | 3        |
| KpnI-HF        | pXba            | $\geq 1000000(1)$ | $\geq 1000000(1)$ | $\geq 30000(1/500)$ | $\geq 1000000(1)$ | 4    | 4        |
| StyI-HF        | $\lambda$       | $\geq 4000(\%)$   | $2000(1)$         | $\geq 16(1/250)$    | $4000(\%)$        | 5    | 5        |
| BsaJI-HF       | pBR322          | $\geq 1000(\%)$   | $\geq 4000(1)$    | $\geq 4000(1)$      | $\geq 4000(1)$    | 6    | 6        |
| BsaWI-HF       | pXba            | $8(1/64)$         | $120(1)$          | $\geq 120(1)$       | $\geq 4000(1)$    | 7    | 7        |
| BglI-HF        | $\lambda$       | $\geq 4000(\%)$   | $\geq 8000(1)$    | $\geq 500(1/16)$    | $\geq 8000(1)$    | 8    | 8        |
| BsrDI-HF       | pBR322          | $\geq 120(1/8)$   | $\geq 500(1)$     | $\geq 64(1/16)$     | $\geq 1000(1)$    | 9    | 9        |
| NsiI-HF        | pXba            | $\geq 250(1/32)$  | $\geq 1000(1/8)$  | $\geq 500(1/16)$    | $\geq 8000(1)$    | 10   | 10       |
| DpnII-HF       | $\lambda(-)$    | $4000(\%)$        | $2000(1/8)$       | $64(1/128)$         | $8000(1)$         | 11   | 11       |
| BclI-HF        | $\lambda(-)$    | $\geq 250(1/32)$  | $\geq 500(\%)$    | $\geq 32(1/64)$     | $\geq 2000(1)$    | 12   | 12       |
| BglII-HF       | pXba            | $\geq 8000(1/8)$  | $\geq 128000(1)$  | $2000(\%)$          | $\geq 32000(\%)$  | 13   | 13       |
| BstEII-HF      | $\lambda$       | $\geq 64(1/32)$   | $\geq 1000(\%)$   | $\geq 32(1/64)$     | $\geq 2000(1)$    | 14   | 14       |
| BanII-HF       | $\lambda(-)$    | $\geq 4000(1)$    | $\geq 2000(\%)$   | $\geq 500(1/8)$     | $\geq 2000(\%)$   | 15   | 15       |
| PspGI-HF       | pBC4            | $\geq 1000(\%)$   | $\geq 4000(1)$    | $\geq 4000(1)$      | $\geq 4000(1)$    | 16   | 16       |
| SpeI-HF        | T7              | $\geq 4000(\%)$   | $\geq 250(1/8)$   | $\geq 120(\%)$      | $\geq 1000(1)$    | 17   | 17       |
| BsmAI-HF       | FX174           | $\geq 4000(1)$    | $\geq 2000(\%)$   | $\geq 500(1/8)$     | $\geq 4000(1)$    | 18   | 18       |

|          |           |                           |                        |                          |                          |    |    |
|----------|-----------|---------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|----|----|
| BstXI-HF | $\lambda$ | $\geq 500(\frac{1}{2})$   | $\geq 1000(1)$         | $\geq 500(1/2)$          | $\geq 1000(1)$           | 19 | 19 |
| SfiI-HF  | pBC4      | 250( $\frac{1}{2}$ )      | $\geq 1000(1/8)$       | $\geq 32(1/250)$         | $\geq 8000(1)$           | 20 | 20 |
| PmeI-HF  | pXba      | $\geq 2000(1/8)$          | $\geq 500(1/16)$       | $\geq 32(1/250)$         | $\geq 8000(1)$           | 21 | 21 |
| SmaI-HF  | pXba      | $\geq 2000(1/500)$        | $\geq 32000(1/32)$     | $\geq 32(1/32000)$       | $\geq 256000(1)$         | 22 | 22 |
| AatII-HF | pXba      | NC                        | NC                     | NC                       | $\geq 1000(1)$           | 23 | 23 |
| ApoI-HF  | pXba      | $\geq 2000(\frac{1}{2})$  | $\geq 4000(1)$         | $\geq 1000(\frac{1}{4})$ | $\geq 2000(\frac{1}{2})$ | 24 | 24 |
| BsmBI-HF | $\lambda$ | 32( $\frac{1}{2}$ )       | 120( $\frac{1}{2}$ )   | $\geq 120(\frac{1}{2})$  | 250(1)                   | 25 | 25 |
| BmtI-HF  | pXba      | 25600( $\frac{1}{4}$ )    | 25600( $\frac{1}{4}$ ) | 2000(1/500)              | 1000000(1)               | 26 | 26 |
| BstNI-HF | pBR322    | $\geq 120(\frac{1}{2})$   | $\geq 500(1)$          | $\geq 120(\frac{1}{4})$  | 500(1)                   | 27 | 27 |
| MluI-HF  | $\lambda$ | $\geq 16000(\frac{1}{2})$ | $\geq 32000(1)$        | $\geq 2000(1/16)$        | $\geq 32000(1)$          | 28 | 28 |
| BanI-HF  | $\lambda$ | $\geq 1000(\frac{1}{2})$  | $\geq 250(1/8)$        | $\geq 250(1/8)$          | $\geq 2000(1)$           | 29 | 29 |
| KasI-HF  | pBR322    | $\geq 8000(\frac{1}{2})$  | $\geq 16000(1)$        | $\geq 2000(1/8)$         | $\geq 16000(1)$          | 30 | 30 |
| NruI-HF  | $\lambda$ | $\geq 64(1/250)$          | $\geq 1000(1/16)$      | $\geq 100(1/16)$         | $\geq 16000(1)$          | 31 | 31 |
| NspI-HF  | pUC19     | $\geq 4000(1)$            | 500(1)                 | $\geq 250(1/8)$          | 500(1)                   | 32 | 32 |
| BsrFI-HF | pBR322    | $\geq 500(1)$             | $\geq 64(1/8)$         | >100                     | $\geq 500(1)$            | 33 | 33 |

Skiedikliai (Dil) A, B ir C ir 1-4 buferiai yra apibrėžti 2009/10 NEB kataloge, 87 psl.

Visos šioje paraiškoje pacituotos nuorodos, kaip ir US laikinosiose paraiškose, paduotos 2010 m. vasario 5 d, Nr. 61/301666 ir 2010 m. rugsėjo 29 dieną, Nr. 61/387800, yra įtrauktos į šią paraišką su nuoroda į minėtas paraiškas.

## PAVYZDŽIAI

### Pavyzdys 1: Didelio tikslumo (HF) PvuI konstravimas

#### 1. PvuI raiška

PvuI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pUC19-PvuIR ir pACYC184-PvuI-M, kiekviena iš kurių turi PvuI endonukleazės ir metilazės genus. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

#### 2. PvuI-HF mutagenezė

Visos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr liekanos buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 11, 12, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 77, 78, 80, 81, 82, 87, 88, 90, 92, 93, 96, 97, 101, 102, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 115, 116, 119, 120, 121, 122, 126, 127, 129, 131, 132, 135, 138, 139, 144, 146, 147, 148, 150, 151, 152, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 162, 163, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 192, 194, 195, 196, 201, 202, 203, 205, 206, 210, 211, 214, 215, 218, 219, 220, 221, 226, 230, 231, 232, 233, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 246, 247, 248, 249, 251, 253, 254; tuo tarpu Tyr buvo pakeista į Phe padėtyse 18, 52, 56, 84, 91, 130, 143, 165, 204, 242.

Mutagenezė buvo atlikta inversinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Produktas buvo transformuotas į *E.coli* ER2683 kamieną.

#### 3. PvuI-HF atranka

PvuI-HF atranka buvo atlikta naudojant NEB3 ir NEB 4 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA (NEB) aktyvumo palyginimą, naudojant pXba DNR kaip substratą. PvuI-WT turėjo didesnę aktyvumą NEB3. Buvo atrinktas pvz. su didesniu NEB4 aktyvumu. Buvo rasti 6 mutantai turintys didesnę aktyvumą NEB4: S36A, K77A, P154A, E163A, Y165F ir K185A. P154A turėjo daug didesnę aktyvumą, negu WT NEB4. Paprastai, mutantas su didesniu aktyvumu NEB4 buferyje buvo mutantas su pagerintu žvaigždiniu aktyvumu. PvuI(P154A) buvo pavadintas PvuI-HF. Tai buvo pirmas kartas, kai buvo efektyvi mutacija proliną pakeitus į alaniną.

#### 4. PvuI-HF gryninimas

Du litrai EK2683(pUC19-PvuI(P154A), pACYC184-PvuIM)) ląstelių buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml 30 °C per naktį. Ląstelės surenkamos

ir veikiamos ultragarsu 20-yje ml Tris-HCl, kurio pH 7,5 ir 50 mM NaCl. Po 30 min centrifugavimo prie 15000 rpm, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Didesnio aktyvumo frakcijos buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, now Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) ir laikomos glicerine prie -20 °C.

### 5. PvuI-HF ir PvuI-WT palyginimas

PvuI-HF ir PvuI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba DNR keturiuose NEB buferiuose, su B skiedikliu. Palyginimas parodytas 1 figūroje, rezultatai pateikti lentelėje 2 (žemiau).

Lentelė 2: PvuI-HF ir PvuI-WT palyginimas

| Buferis | PvuI-HF   |        | PvuI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|--------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI     | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 12,5 %    | ≥2000  | 6,3 %     | 32 | ≥64                  |
| NEB2    | 100 %     | ≥16000 | 25 %      | 32 | ≥500                 |
| NEB3    | 25 %      | ≥4000  | 100 %     | 32 | ≥125                 |
| NEB4    | 100 %     | ≥16000 | 12,5 %    | 32 | ≥500                 |

PvuI-HF geriausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferiuose, kur FI buvo  $\geq 16000$ ; WT PvuI geriausias aktyvumas buvo NEB3 buferyje, kur FI buvo 32. Taigi, bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 16000/32 = \geq 500$ .

### Pavyzdys 2: HF HindIII konstravimas

HindIII atpažįsta ir skaldo A/AGCTT, kaip aprašyta Tarptautinės publikacijos Nr. WO2009/009797 21-ame pavyzdyje. HindIII(K198A) mutantas buvo atrinktas kaip HindIII HF versija. Tolimesnis šio mutanto charakterizavimas atskleidžia, kad netgi jeigu HindIII(K198A) elgesys vienos valandos skalėje yra puikus, tačiau jis nėra puikus skaldyme per naktį. Tuo tarpu didesnio skaičiaus mutantų paieška parodė, kad

HindIII(Q148A) taip pat yra dalinai geras. Sekantis žingsnis tolesnio pagerinimo kryptimi buvo alanino pakeitimas kita aminorūgšties liekana. Tarp kitų, HindIII(Q148I) pasirodė puikiai ir vienos valandos skaldyme ir skaldyme per naktį ir jis pavadintas HindIII-HF (Figūra 2).

HindIII-HF raiška buvo vykdoma *ER3081*(puC19-HindIII(Q148I)M). Auginimo ir gryninimo metodai buvo atliekami pagal WO/2009/009797.

Sekančioje lentelėje (Lentelė 3) palyginama HindIII-HF ir HindIII-WT FI.

Lentelė 3: HindIII-HF ir HindIII-WT palyginimas

| Buferis | HindIII-HF |              | HindIII-WT |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|------------|--------------|------------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas  | FI           | Aktyvumas  | FI |                      |
| NEB2    | 100%       | $\geq 16000$ | 25%        | 32 | $\geq 500$           |
| NEB3    | 25%        | $\geq 4000$  | 100%       | 32 | $\geq 125$           |
| NEB4    | 100%       | $\geq 16000$ | 12.5%      | 32 | $\geq 500$           |

Geriausias HindIII-HF aktyvumas buvo NEB4 buferyje; HindIII-HF FI NEB4 buvo  $\geq 520000$ ; HindIII-WT geriausias aktyvumas buvo NEB2 buferyje. HindIII-WT FI NEB2 buferyje buvo 250. Taigi bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 2000$ .

### Pavyzdys 3: HF DraIII konstravimas

#### **1. DraIII raiška**

DraIII atpažįsta ir skaldo CACNNN/GTG. DraIII raiška buvo vykdoma *E.coli* ER3081 ląstelėse su plazmidėmis pAGR3-DraIIIR() ir pACYC-DraIIIM(). Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

#### **2. DraIII mutagenezė**

DraIII baltymo ilgis yra 227 aminorūgštys. Pradžioje buvo numatytas mutuoti į Ala (arba Phe) bendras 132 aminorūgščių saitų. Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Gly ir Trp buvo mutuotos į Ala. Try buvo mutuota į Phe. Tai buvo: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 51, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 76, 77, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 91,

93, 94, 95, 96, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 123, 124, 127, 128, 130, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 150, 154, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 165, 167, 169, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 180, 181, 183, 184, 185, 187, 189, 190, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 22 ir 223.

Atrinktų mutantų taškinė mutagenėzė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu. PGR reakcija buvo vykdoma 100 µl reakcijos tūryje, esant 2 µl kiekvieno PGR pradmens, 1 µl pAGR3-DraIIIIR, 400 µl dNTP, 4 vienetus Deep Vent™ DNA polimerazės (NEB), ir 10 ul 10X Thermopol buferio su papildomu vandens kiekiu.

PGR reakcijos sąlygos buvo 94 °C, 5 min, 25 ciklai prie 94 °C 30 s, 55 °C 60 s, 72 °C 4 min ir paskutinis prailginimo laikas prie 72 °C 7 min. PGR produktas buvo skaldomas 20 vienetų DpnI 1 valandą. Suskaldytas produktas buvo transformuojamas į *E. coli* ER3081(pACYC-DraIIIM).

### 3. DraIII-HF atrinkimas

Kiekvienos mutacijos keturios kolonijos buvo užaugintos LB terpėje su Amp ir Cam 37 °C per naktį. Standartiniai ir žvaigždinio aktyvumo DraIII tyrimai buvo atlikti naudojant pXba kaip substratą NEB4 buferyje ir 10 % glicerolį.

Mutantai S15A, H20A, E34A, M58A, Q95A, R106A, K108A, T181A, R187A, R199A, N202D, T181G, T181N, T181Q, T181C, T181V, T181L, T181I, T181M, D55A, D55S, D55C, D55G, D55N, T12A, H20A, E34A, H45A, T57A, M58A, T60A, S66A, R76A, F90A, M94A, T101A, C115A, F169A, N172A, R173A, H189A, N193A ir Q95A/K104A buvo atrinkti atrankos bandymuose. Po keleto palyginimo skirtingose sąlygose su skirtingais substratais ciklu, buvo surasta, kad DraIII(T181A) yra pageidaujamas mutantas, išlaikantis aukštą skaldymo aktyvumą, bet turintis iš esmės sumažintą žvaigždinį aktyvumą. DraIII(T181A) buvo pažymėtas DraIII-HF.

### 4. DraIII-HF ir DraIII-WT palyginimas

DraIII-WT ir DraIII-HF(T181A) baltymai buvo išgryninti, panaudojant hepariną ir Source 15S kolonėlę. Detalaus palyginimo bandymo sąlygos buvo sekančios: NEB4 (arba NEB1, 2, 3), 37 °C, 1h; 2 µl išgryninto baltymo 20 µl reakcijos sistemos; lambda DNR kaip substratas. Palyginimas parodytas figūrose 3A ir 3B, ir rezultatai išdėstyti lentelėje 4.

Lentelė 4: DraIII-HF ir DraIII-WT palyginimas

| Buferis   | DraIII-HF(T181A) |        | DraIII-WT |     | Pagerinimo faktorius |
|-----------|------------------|--------|-----------|-----|----------------------|
|           | Aktyvumas        | FI     | Aktyvumas | FI  |                      |
| Buferis 1 | 6,25 %           | ≥120   | 16 %      | 16  | ≥8                   |
| Buferis 2 | 50 %             | ≥1000  | 100 %     | 2   | ≥500                 |
| Buferis 3 | 1,56 %           | ≥32    | 50 %      | 2   | ≥16                  |
| Buferis 4 | 100 %            | ≥64000 | 50 %      | 0,5 | ≥128000              |

DraIII-HF turi didžiausią aktyvumą NEB4, kuriame FI buvo mažiausiai 64000; DraIII-WT turi didžiausią aktyvumą NEB2, kuriame FI yra 2. Bendras FI pagerinimo faktorius buvo mažiausiai 32000-kartinis.

#### Pavyzdys Nr.4: HF KpnI konstravimas

KpnI atpažįsta ir skelia GGTAC/C kaip aprašyta tarptautinės publikacijos Nr. WO2009/009797 pavyzdyje Nr. 26. Trigubas mutantas KpnI(D16N/E132A/D148E) buvo atrinktas kaip KpnI didelio tikslumo versija. Kadangi D148E ir E132A buvo įvestos vietos specifinės mutagenezės metodu, D16N buvo įvesta PGR metodu. Tolimesnis šio trigubo mutanto mutacijų charakterizavimas parodė, kad E132A pašalinimas toliau pagerina restrikcijos fermentą, ypač fermento specifinio aktyvumo aspektu. Trigubas mutantas KpnI(D16N/E132A/D148E) turi 200000 vienetų/mg baltymo specifinį aktyvumą, tuo metu KpnI(D16N/D148E) turi 1800000 vienetų/mg baltymo specifinį aktyvumą. Dvigubas mutantas yra 9 kartus aktyvesnis, negu ankstesnis trigubas mutantas, taigi dvigubas mutantas KpnI(D16N/D148E) buvo pavadintas KpnI-HF.

KpnI-HF raiška buvo vykdoma ER2523(pAGR3-KpnI(D16N/D148E), pSYX20-KpnIM). Auginimo ir gryninimo metodai buvo atliekami pagal WO/2009/009797.

Sekančioje lentelėje (Lentelė 5) palyginami KpnI-HF ir KpnI-WT FI.

Lentelė 5: KpnI-HF ir KpnI-WT palyginimas

| Buferis | KpnI-HF              |                  | KpnI-WT              |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|----------------------|------------------|----------------------|----|----------------------|
|         | Santykinis aktyvumas | FI               | Santykinis aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 100%                 | $\geq 1,000,000$ | 100%                 | 16 | 62,500               |
| NEB2    | 100%                 | $\geq 1,000,000$ | 25%                  | 16 | 62,500               |
| NEB3    | 0.2%                 | $\geq 30,000$    | 6%                   | 8  | 3,750                |
| NEB4    | 100%                 | $\geq 1,000,000$ | 50%                  | 4  | 250,000              |

KpnI-WT turėjo geriausią aktyvumą NEB1, KpnI-WT FI NEB1 buvo 16; KpnI-HF turėjo geriausią aktyvumą NEB1, NEB2 ir NEB4 buferiuose. KpnI-HF FI šiuose trijuose buferiuose buvo visų didžiausias  $\geq 1000000$ . Bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 62500$ .

#### Pavyzdys Nr.5: HF StyI konstravimas

##### **1. StyI taiška**

StyI atpažįsta ir skaldo C/CWWGG. StyI raiška buvo vykdoma *E. coli* (ER2833) su pACYC-StyIM ir placzz-StyIR plazmidėmis. Ląstelės buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

##### **2. StyI mutagenezė**

Atrinktų mutacijų taškinė mutagenezė buvo atlikta su atvirkštinės PGR metodu. StyI buvo atliktos 237 aminorūgščių mutacijos sekančiai: Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutuotos į Ala. Tyr buvo mutuotas į Phe. Tai buvo padėtyse : 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 49, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 65, 66, 69, 70, 73, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 135, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 158, 159, 163, 164, 165, 166, 167, 170, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 181, 183, 187, 188, 192, 193, 194, 195, 196, 200, 203, 204, 205, 207, 209, 211, 212, 213, 214, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 227, 229, 230, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 242, 245, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 266, 267, 269, 272, 274, 277, 280, 282, 283, 284, 286,

288, 289, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 303, 304, 305, 307, 308, 309, 313, 317, 318, 319, 320, 323, 324, 326, 327, 329, 331, 335, 336, 337, 339, 340, 343, 345, 346, 347, 349, 350, 351, 353, 355, 356, 359, 360, 361, 363, 365, 366, 368, 369, 370, 372, 373, 376, 377, 379, 381 ir 382.

Pradmenų projektavimo (design) ir PGR metodai gali būti atliekami kaip aprašyta ir paskelbta PCT paraiškoje WO2009/0029376 (Pavyzdys Nr. 1). PGR produktas buvo skaldomas DpnI ir transformuotas į kompetentines ląsteles ER2833(pACYC-StyIM0).

### 3. StyI-HF atranka

Kiekvienos mutacijos keturios kolonijos buvo auginamos LB terpėje su Amp ir Cam 37 °C per naktį. Giminingo aktyvumo ir žvaigždinio aktyvumo bandymai buvo atliekami naudojant lambda DNR NEB4 ir ExoI buferyje bei 20 % glicerolį atitinkamai.

K75, N146A ir D256A mutantai buvo atrinkti atrankos bandymo metu. Po keleto palyginimo ciklų skirtingose sąlygose ir substratuose, K75A buvo rastas kaip geriausias mutantas, išlaikantis didelį skaldymo aktyvumą, bet rodantis iš esmės žemą žvaigždinį aktyvumą. StyI(K75A) buvo pažymėtas kaip StyI-HF.

### 4. StyI-HF ir StyI-WT palyginimas

StyI-HF ir StyI-WT palyginimas NEB4 buferyje parodytas 5A ir 5B figūrose ir rezultatai išdėstyti 6-oje lentelėje.

Lentelė 6: StyI-HF ir StyI-WT palyginimas

| Buferis | HindIII-HF              |       | HindIII-WT              |    | Pagerini<br>mo<br>faktorius |
|---------|-------------------------|-------|-------------------------|----|-----------------------------|
|         | Santykinis<br>aktyvumas | FI    | Santykinis<br>aktyvumas | FI |                             |
| NEB1    | 50 %                    | ≥4000 | 25 %                    | 32 | ≥125                        |
| NEB2    | 100 %                   | 2000  | 100 %                   | 16 | 125                         |
| NEB3    | 0,4 %                   | ≥16   | 50 %                    | 32 | ≥0,5                        |
| NEB4    | 50 %                    | 4000  | 25 %                    | 16 | 250                         |

StyI-WT ir StyI-HF turėjo geriausią aktyvumą NEB2. StyI-WT FI buvo 16 ir StyI-HF – buvo 2000. Bendras FI pagerinimo faktorius buvo 125.

## Pavyzdys 6: HF BsaJI konstravimas

### **1. BsaJI raiška**

BsaJI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pRRS-BsaJIR+M, kuri turi BsaJI endonukleazės ir metilazės geną toje pačioje plazmidėje. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

### **2. BsaJI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr, Phe, Trp buvo pakeistos į Ala padėtyse 9, 10, 14, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 27, 30, 32, 35, 39, 42, 43, 48, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 78, 79, 81, 83, 84, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 94, 95, 99, 101, 103, 104, 106, 110, 111, 113, 114, 117, 119, 120, 121, 123, 127, 129, 131, 132, 134, 136, 138, 140, 141, 142, 147, 152, 153, 157, 158, 159, 162, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 175, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 194, 196, 197, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 206, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 233, 238, 239, 240, 241, 246, 247, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 257, 260, 262, 265, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 274, 276, 277, 280, 281, 282, 283, 285, 287, 288, 290, 291, 293, 294, 295, 298 ir 299; tuo tarpu Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 21, 59, 62, 77, 89, 105, 130, 191, 208, 272, 286 ir 296.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR su poriniais pradmenimis metodu ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo transformuotas į *E.coli* ER3081 kamieną.

### **3. BsaJI-HF atrinkimas**

BsaJI-HF atrinkimas buvo atliekamas naudojant BEB3 ir NEB4 palyginimą ir naudojant pBR322 DNR kaip substratą. E198A ir D200A turi didžiausią aktyvumą. D200A turėjo NEB4 buferyje žymiai mažesnę žvaigždinę aktyvumą, negu WT. BsaJI(D200A) yra pavadintas BsaJI-HF.

### **4. BsaJI-HF gryninimas**

Du litrai ląstelių *ER3081* (pRRS-BsaJIR(D200A)+M) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp, 33 µg/ml Cam ir 0,5 mM IPTG prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 50-yje ml 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po 30 minučių centrifugavimo prie 15000 rpm, supernatantas švirkštu buvo leidžiamas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM

Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Amicon® Ultra 30KDa (Millipore, U.S. A; dabar Merck, Germany). Į koncentruotą BsaJI-HF buvo pridėtas toks pat tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. BsaJI-HF ir BsaJI-WT palyginimas

BsaJI-HF ir BsaJI-WT FI buvo nustatyti ant pBR322 DNR atskirai keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 7.

Lentelė 7: BsaJI-HF ir BsaJI-WT palyginimas

| Buferis | BsaJI-HF  |             | BsaJI-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI          | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 25 %      | $\geq 1000$ | 100 %     | 64 | $\geq 15$            |
| NEB2    | 100 %     | $\geq 4000$ | 100 %     | 64 | $\geq 60$            |
| NEB3    | 100 %     | $\geq 4000$ | 25 %      | 16 | $\geq 250$           |
| NEB4    | 100 %     | $\geq 4000$ | 100 %     | 64 | $\geq 60$            |

BsaJI-HF geriausiai veikė NEB2, 3 ir 4, kuriuose FI buvo  $\geq 4000$ ; BsaJI-WT geriausiai veikė NEB1, 2 ir 4, kuriuose FI buvo 64. Taigi NEB4 pagerinimo faktorius buvo  $\geq 4000/64 \geq 64$ .

### Pavyzdys 7: HF BsaWI konstravimas

#### 1. BsaWI raiška

BsaWI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pLacZZ1-BsaWIR ir pACYC-MspIM, kurių kiekviena turi BsaWI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam ir indukuotos 30 °C su 0,5 mM IPTG 18 valandų.

#### 2. BsaWI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 9, 10, 13, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 39, 42, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 71, 74, 75, 78, 80, 81, 82,

84, 85, 86, 88, 89, 92, 93, 96, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 107, 109, 113, 114, 115, 117, 121, 112, 123, 124, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 145, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 160, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 181, 184, 189, 195, 196, 197, 200, 202, 203, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 218, 219, 221, 222, 228, 229, 230, 231, 233, 234, 237, 239, 241, 243, 247, 248, 250, 251, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 264, ir 266; o Tyr yra pakeista į Phe padėtyse 11, 57, 106, 147, 157, 215, 224, 236 ir 265.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo transformuotas į *E.coli* ER3081 kamieną.

### 3. BsaWI-HF atranka

BsaWI-HF atranka buvo atlikta, panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant lambda DNR kaip substratą. Sekantys mutantai rodė pakeitimus: K229A, E025A, R034A ir Q261A. BsaWI-WT gali pilnai suskaldyti abiejuose buferiuose, jeigu auginama mažoje kultūroje; buvo pastebėta, kad Q261A davė tik stabilų dalinį vaizdą. Tai galėjo būti tik dėl to, kad mutantas blogai augo mažoje kultūroje. Jeigu auginama didelėje kultūroje ir išgryninama, dalinis vaizdas buvo pašalintas ir substratas suskaldytas pilnai ir rezultatas buvo patvirtintas didelio tikslumo mutantu, jeigu buvo testuojama ant pXba substrato.

### 4. BsaWI-HF gryninimas

Du litrai *ER3081* (pLacZZI-BwaWI(Q261A), pACYC-MspIM)) buvo auginamos 30 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml. Po 8 val. kultūra buvo indukuota 0,5 mM IPTG. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min supernatantas buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsaWI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

## 5. BsaWI-HF ir BsaWI-WT palyginimas

BsaWI-HF ir BsaWI-WT FI buvo nustatyti atskirai keturiuose NEB buferiuose ant pXba DNR, su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti 8 lentelėje (žemiau).

Lentelė 8: BsaWI-HF ir BsaWI-WT palyginimas

| Buferis | BsaWI-HF             |             | BsaWI-WT             |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|----------------------|-------------|----------------------|----|----------------------|
|         | Santykinis aktyvumas | FI          | Santykinis aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 1,6 %                | 8           | 12,5 %               | 4  | 2                    |
| NEB2    | 100 %                | 120         | 50 %                 | 8  | $\geq 15$            |
| NEB3    | 3,1 %                | $\geq 250$  | 3,1 %                | 64 | $\geq 4$             |
| NEB4    | 100 %                | $\geq 4000$ | 100 %                | 16 | $\geq 250$           |

BsaWI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferiuose, kur geriausias FI yra  $\geq 4000$ ; BsaWI-WT didžiausią aktyvumą rodė NEB4, kur FI yra 16. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 4000/16 \approx 250$ .

### Pavyzdys 8: Didelio tikslumo BglI konstravimas

#### 1. BglI raiška

BglI raiška buvo vykdoma E.coli, transformuotose pUC19-BglIR ir pSYX20-BglI-M, kiekviena turi BglI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kan.

#### 2. BglI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 34, 36, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 52, 54, 55, 57, 60, 61, 65, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 107, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 128, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 152, 158, 159, 160, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 193, 194, 196, 197, 202, 203, 204, 205, 208, 211, 215, 216, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 234, 236, 239, 241, 242, 243, 245, 249, 250, 251, 255, 256, 259, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271,

272, 275, 276, 277, 279, 281283, 286, 287, 289, 290, ir 291 ; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 19, 13, 33, 53, 66, 119, 127, 153, 199, 218, 233, 252 ir 258.

Mutagenezės metodai buvo atvirkštinė PGR su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo transformuotas į *E.coli* ER2566 kamieną.

## 2. BglI-HF atrinkimas

BglI-HF atranka buvo vykdoma naudojant aktyvumo palyginimą NEB4 buferyje, naudojant lambda DNR kaip substratą. BglI-WT turi žemą aktyvumą NEB4, nei vienas mutantas su panašiu ar didesniu aktyvumu kaip WT NEB4 buferyje nebuvo atrinktas, tuomet jie buvo tikrinami prieš su gliceroliu, dėl žvaigždinio aktyvumo lygio palyginimo. Tik vienas mutantas K225A rodė panašų aktyvumą kaip WT NEB4 buferyje, o taip pat mažėjantį žvaigždinį aktyvumą, kai tiriama glicerolyje. BglI(K225A) yra pavadintas BglI-HF.

## 3. BglI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2566(pUC19-BglI(K225A), pSYX20-BglIM) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 pg/ml Kan at 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surenkamos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15,000 rpm 30 minučių supernatantas buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Didesnio aktyvumo frakcijos dar buvo koncentruotos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar SartoriusVivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BglI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir saugomas prie -20 °C.

## 4. BglI-HF ir Bgl-WT palyginimas

BglI-HF ir Bgl-WT FI buvo nustatyti atskirai ant lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su B skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 6 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 9 (žemiau).

Lentelė 9: BglI-HF ir Bgl-WT palyginimas

| Buferis | BglI-HF   |    | BglI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|----|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI | Aktyvumas | FI |                      |

|      |       |             |        |     |            |
|------|-------|-------------|--------|-----|------------|
| NEB1 | 50 %  | $\geq 4000$ | 25,0 % | 64  | $\geq 62$  |
| NEB2 | 100 % | $\geq 8000$ | 100 %  | 64  | $\geq 125$ |
| NEB3 | 6,3 % | $\geq 500$  | 100 %  | 250 | $\geq 2$   |
| NEB4 | 100 % | $\geq 8000$ | 50 %   | 32  | $\geq 250$ |

BglI HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferiuose, kuriuose FI buvo  $\geq 8000$ ; BglI-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 250. Bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 8000/250 = \geq 32$ .

#### Pavyzdys 9: HF BsrDI konstravimas

##### **1. BsrDI raiška**

BsrDI fermentas turi du subvienetus: BsrDIA ir BsrDIB.

Norint gauti gryną BsrDIA subvienetą, buvo naudojama IMPACT (Intein-Mediated purification with an Affinity Chitin-Binding Tag) sistema (NEB katalogas: E6901) vienos pakopos BsrDIA gryninimui. Trumpai sakant, BsrDIA genas buvo subklonuotas į pTXB1 vektorių, kuris po to buvo transformuotas į kompetentinį kamieną, turintį T7 polimerazę, kontroliuojamą lac operono (NEB Nr.ER2566). Po atrankos ir sekvenavimo buvo atrinktas tinkamas kamienas. Ląstelės buvo auginamos LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml) prie 37 °C iki OD<sub>600</sub> pasiekia 0,5. Tuomet buvo pridedama IPTG iki galutinės koncentracijos 0,4 mM dėl BsrDIA indukcijos 3 valandas. Ląstelių kultūra buvo išsodinta, resuspenduota lediniame kolonėlės buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM HCl) ir lizuota, veikiant ultragarsu. Gautas ląstelių lizatas buvo centrifuguojamas, norint pašalinti ląstelių nuolaužas. Po to, supernatantas buvo užneštas ant nulygsvarintos chitino kolonėlės. Po praplovimo su užnešimo buferiu, kolonėlė buvo inkubuota su skaldymo buferiu (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM NaCl ir 50 mM DTT) prie 4 °C per naktį. Galiausiai, BtsI.A baltymas buvo eliuotas dialize prieš saugojimo buferį (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM KCl ir 50 % glicerolio).

BsrDIB subvieneto raiška buvo vykdoma E.coli, transformuotose pUC19-BsrDIRB ir pLG-BsrBIM1M2, kiekviena iš kurių turi BsrDI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kam.

## 2. BsrDI-HF mutagenezė

Visos BsrDIB liekanos, įskaitant Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 11, 12, 14, 15, 17, 21, 22, 25, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37, 40, 45, 46, 47, 51, 52, 56, 58, 62, 64, 65, 67, 68, 71, 72, 74, 75, 81, 83, 90, 91, 92, 93, 99, 100, 101, 106, 108, 109, 112, 113, 115, 116, 120, 122, 123, 124, 132, 133, 136, 137, 138, 139, 142, 143, 144, 145, 146, 150, 155, 157, 158, 161, 162, 164, 168, 170, 171, 173, 174, 176, 177, 179, 180, 182, 185, 189, 190, 193, 197, 200, 202, 203, 206, 210, 213, 215, 217, 218, 221, 224, 225, 226, 228, 229, 230, 232, 237, 238, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 249, 253, 258, 259, 261, 264, 265, 268, 271, 272, 273, 274, 276, 278, 279, 281, 285, 287, 288, 292, 294, 295, 299, 300, 301, 306, 307, 308, 312, 314, 315, 317, 318, 320, 321, 324, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 335, 337, 341, 343, 345, 347, 352, 353, 354, 355, 356, 360, 361, 362, 363, 364, 370, 373, 374, 376, 380, 381, 385, 387, 389, 392, 393, 395, 396, 397, 405, 406, 408, 411, 415, 418, 420, 422, 425, 426, 430, 431, 432, 434, 437, 445, 446, 449, 450, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 463, 465, 466, 467, 469, 470, 475, 481 ; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 9, 38, 63, 87, 118, 129, 169, 178, 198, 216, 251, 286, 291, 303, 357, 358, 367, 371, 402, 442, 443, 448.

Mutagenezės metodai buvo inversinė PGR su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo transformuotas į *E.coli* ER2566 kamieną.

## 3. BsrDI-HF atranka

BsrDI-HF atranka buvo vykdoma naudojant žvaigždinio aktyvumo tarp BsrDIB WT sumaišyto su BsrDIA ir mutantinio BsrDIB sumaišyto su BsrDIA NEB4 buferyje ant pBR322 DNR, kaip substrato. Buvo rasti aštuoni mutantai, turintys mažesnę žvaigždinį aktyvumą NEB4: H137A, D177A, K363A, K408A, R411A, Q215A, Q226A, Q230A.

Tolimesniam žvaigždinio aktyvumo sumažinimui, kombinuojant mutacijas, buvo padaryti dvigubi mutantai: K363A/Q230A, K363A/K408A, Q230A/K408A. Tuomet BsrDI su mutacijomis Q230A/K363A ant BsrDIB yra pavadintas kaip BsrDI-HF.

## 4. BsrDI-HF gryninimas

Du litrai *ER2566*(pUC19-BsrDI(Q230A/K363A), pLG-BsrDIM1M2)) buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kam. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min supernatantas buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto

subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM-1M NaCl linijinis gradientas ir 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsrDI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

### 5. BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas

BsrDI-HF ir BsrDI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBR322 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai parodyti figūroje 7 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 10 (žemiau).

Lentelė 10: BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas

| Buferis | BsrDI-HF  |       | BsrDI-WT  |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 12,5 %    | ≥120  | 6 %       | 1   | ≥120                 |
| NEB2    | 100 %     | ≥500  | 100 %     | 4   | ≥120                 |
| NEB3    | 6 %       | ≥64   | 12,5 %    | 4   | ≥16                  |
| NEB4    | 100 %     | ≥1000 | 25 %      | 1/2 | ≥2000                |

BsrDI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥1000; BsrDI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB3, kur FI buvo 64. Bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 1000/0,5 = \geq 2000$ .

### Pavyzdys 10: HF NsiI konstravimas

#### 1.NsiI raiška

NsiI raiška buvo vykdoma E.coli, transformuotose placzz1-NsiIR ir pACYX-NsiIR M, kiekviena turi NsiIR endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

## 2. NsiI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr, Phe, Trp, buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 32, 34, 35, 42, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 69, 70, 73, 74, 79, 80, 84, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 110, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 144, 145, 146, 149, 151, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 166, 167, 170, 173, 174, 175, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 188, 189, 190, 191, 192, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 206, 207, 209, 210, 211, 213, 215, 216, 217, 219, 221, 222, 225, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 239, 242, 243, 244, 245, 246, 249, 250, 251, 256, 257, 259, 260, 261, 263, 264, 268, 269, 271, 272, 273, 276, 277, 278, 279, 281, 282, 283, 285, 287, 288, 290, 292, 294, 295, 297, 298, 299, 302, 303, 306, 307, 308, 309, 310, 312, 315, 316, 319, 320, 323, 325, 327, 329, 333, 334, 336, 337, 338, 340, 341, 344, 347, 349, 350, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 362, 363, 365, 366, 367, 371, 372, 373, 375, 376 ir 377; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse of 30, 40, 62, 65, 71, 76, 83, 86, 141, 226, 233, 255, 289, 311, 326, 335, 351, 357, 378.

Mutagenezė buvo atlikta atv irkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER3081 kamieną.

## 3. NsiI-HF atranka

NsiI-HF atranka buvo atlikta, panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant pXba DNR kaip substratą. NsiI-WT turėjo didžiausią aktyvumą NEB3, buvo atrinktas vienas su didžiausiu aktyvumu NEB4. Rasti 148 mutantai, turintys didžiausią aktyvumą NEB4. F376A turėjo daug didesnę aktyvumą NEB4, negu WT. Paprastai mutantas su didžiausiu aktyvumu NEB4 yra mutantas su pagerintu žvaigždiniu aktyvumu. NsiI(F376A) yra pavadintas kaip NsiI-HF.

## 4. NsiI-HF gryninimas

Du litrai *ER3081* (placzsl- NsiI(F376A), pACYC-NsiIM)) buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam ir 0,5 mM IPTG. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 50 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min. Supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM

Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to sekanti 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl pakopa. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Amicon Ultra 30 KDa (Millipore, U.S.A.; dabar Merck, Germany). Į koncentruotą NsiI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. NsiI-HF ir NsiI-WT palyginimas

NsiI-HF ir NsiI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiediklio. Rezultatai išdėstyti lentelėje 11 (žemiau).

Lentelė 11: NsiI-HF ir NsiI-WT palyginimas

| Buferis | NsiI-HF   |       | NsiI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 3 %       | ≥250  | 6,3 %     | 32 | ≥8                   |
| NEB2    | 12,5 %    | ≥1000 | 25 %      | 32 | ≥30                  |
| NEB3    | 6 %       | ≥500  | 100 %     | 32 | ≥15                  |
| NEB4    | 100 %     | ≥8000 | 12,5 %    | 32 | ≥250                 |

NsiI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥8000; NsiI-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 32. taip pagerinimo faktorius NEB4 buvo  $\geq 8000/32 = \geq 250$ .

### Pavyzdys 11: DpnII konstravimas

#### 1. DpnII raiška

DpnII raiška buvo vykdoma *E. coli* 3081, transformuotose pBAD241-DpnII RM. Ląstelės buvo auginamos 30 °C temperatūroje LB terpėje su AMP per naktį.

#### 2. DpnII mutagenezė

Atrinktų mutacijų taškinė mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu. DpnII buvo padarytos sekančios 189 aminorūgščių mutacijos: Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutautos į Ala. Try buvo mutuos į Phe. Tai buvo: 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 69, 76, 77, 78, 80, 81,

82, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 125, 126, 129, 130, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 164, 168, 169, 171, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 180, 181, 183, 184, 186, 188, 189, 191, 192, 193, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 208, 211, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 254, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281 ir 282.

Pradmenų projektavimo ir PGR metodas is similar to that described previously. PGR produktas buvo suskaldytas su DpnI ir transformuotas į kompetentines *E. coli* 3081 ląsteles.

### 3. DpnII-HF atranka

Kiekvienos mutacijos keturios kolonijos buvo užaugintos 37 °C LB terpėje su Amp per naktį. Buvo atliktas standartinis DpnII atrankos testas, naudojant dam' lambda substratą NEB4 buferyje ir 5 % glicerolyje.

Iš atrankos testo buvo atrinkti R78A, T140A, E152A, R199A ir F217A mutantai. Po keleto patikrinimo ciklų skirtingose sąlygose ir buferiuose, kaip kandidatas buvo pasirinktas R199A, išlaikantis aukštą kanoninį fermento aktyvumą, bet rodantis iš esmės sumažintą žvaigždinį aktyvumą. R199A buvo pažymėtas kaip DpnII-HF.

### 4. DpnII-HF gryninimas

Du litrai *E. coli* (pBAD241.DpnII.RM(R199A)) buvo auginamos 30 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po 30 min. centrifugavimo prie 15000 rpm supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), kuri iš anksto buvo subalansuota tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę buvo leidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruojamos. Į koncentruotą DpnII-HF buvo pridėtas toks pat tūris glicerolio ir laikoma prie -20 °C.

### 5. DpnII-HF ir DpnII-WT palyginimas

DpnII-HF buvo 2 kartus paeiliui praskiestas B buferiu ir tiriamas keturiuose NEB buferiuose. Rezultatai yra išdėstyti lentelėje 12.

Lentelė 12: DpnII-HF ir DpnII-WT palyginimas

| Buferis | DpnII-HF  |      | DpnII-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI   | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 50 %      | 4000 | 25 %      | 1  | 4000                 |
| NEB2    | 25 %      | 2000 | 25 %      | 1  | 2000                 |
| NEB3    | 0,8 %     | 64   | 100 %     | 32 | 2                    |
| NEB4    | 100 %     | 8000 | 25 %      | 1  | 8000                 |

DpnII-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur geriausias FI buvo =8000; DpnII-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 32. Bendras pagerinimo faktorius FI buvo  $8000/32=250$ .

### Pavyzdys 12: Didelio tikslumo BclI konstravimas

#### 1. BclI raiška

BclI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pRRS-BclIR ir pACYC184-BclIM, kiekviena iš kurių turi endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo užaugintos per naktį 37 °C LB terpėje su Amp.

#### 2. BclI-HF atranka

BclI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą glicerolyje ir NEB4, naudojant *dam*<sup>-</sup> lambda kaip substratą. Jei tik įtariamas žemesnis žvaigždinis aktyvumas, mutantai taip pat palyginami su normaliu aktyvumu vandenyje ir NEB4 ant to paties substrato. Buvo atrinkti mutantai su panašiu į WT NEB4 buferyje ir taip pat potencialiai turintys žemesnį žvaigždinį aktyvumą. Yra surasti 6 mutantai, turintys tokias charakteristikas: G26A, P105A, T195A, Q210A, Y147F ir Y193F. Kai kurie mutantai (K114A, T197A, S245A, D252A ir Y027F) rodė žemesnį aktyvumą vandenyje, bet sumažintą žvaigždinį aktyvumą taip pat; jie paprastai turėjo aukštesnį aktyvumą giminingą aktyvumą negu WT, esant aukštesnei glicerolio koncentracijai. Vienas mutantas rodė

aukštesnį aktyvumą negu WT ir taip pat žemesnį žvaigždinį aktyvumą: Y192F. BclI(Y192F) yra pavadintas kaip BclI-HF.

#### 4. BclI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *EK2984*(pRRS-BclI(Y192F), pACYC184-BclIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas buvo švirkštu įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), kuri iš anksto buvo subalansuota tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę buvo leidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BclI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

#### 5. BclI-HF ir BclI-WT palyginimas

BclI-HF ir BclI-WT FI buvo nustatomi atskirai ant *dam* lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas yra parodytas figūroje 8 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 13 (žemiau).

Lentelė 13: BclI-HF ir BclI-WT palyginimas

| Buferis | BclI-HF   |       | BclI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 12,5 %    | ≥250  | 50 %      | 120 | ≥2                   |
| NEB2    | 100 %     | ≥500  | 100 %     | 32  | ≥16                  |
| NEB3    | 25 %      | ≥32   | 50 %      | 64  | ≥1/2                 |
| NEB4    | 100 %     | ≥2000 | 100 %     | 32  | ≥60                  |

BclI HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferiuose, kuriuose FI buvo ≥2000; BclI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB4, kur FI buvo 32. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 2000/32 = \geq 64$ .

### Pavyzdys 13: HF BglII konstravimas

#### **1. BglII raiška**

BglII raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pLacZZ-BglIIR ir pACYC-BglIIM, kurių kiekviena turi BglII endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

#### **2. BglII-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 35, 37, 38, 39, 41, 42, 45, 48, 49, 53, 54, 55, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 93, 95, 96, 97, 98, 101, 104, 105, 106, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 124, 125, 131, 132, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 142, 146, 147, 149, 150, 151, 153, 154, 157, 159, 161, 162, 166, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 179, 182, 183, 184, 187, 188, 189, 191, 192, 193, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 203, 206, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 219, 222; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 8, 56, 99, 144, 145, 158, 185 ir 190.

Mutagenezė buvo atlikta inversinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER3081 kamieną.

#### **3. BglII-HF atranka**

BglII-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferyje, naudojant *pXba* DNR kaip substratą. BglII-WT turėjo didesnę aktyvumą NEB3 buferyje, taigi buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu NEB4 buferyje. Visi mutantai su didesniu aktyvumu buvo po to palyginti su WT aktyvumu glicerolyje, ieškant žvaigždinio aktyvumo. Normaliai mutantai su didesniu aktyvumu NEB4 buferyje turi pagerintą žvaigždinį aktyvumą. Mutantai, kurie buvo teikiantys vilčių (H10A, N208A, K48A, K74A, R75A, Y56F, K58A, M117A) buvo galiausiai tiriami su ExoI buferiu vandenyje, kurie galėjo pakelti žvaigždinį aktyvumą. Mažoje kultūroje šis mutantas gali pasirodyti turintis stabilų dalinį aktyvumą, kurį mes galime nustatyti, yra kitas indikatorius, kad tikslumas pasikeitė. BglII(N208A) pavadintas kaip BglII-HF.

#### **4. BglII-HF gryninimas**

Du litrai ląstelių *ER3081*(pLacZZ-BglII(N208A), pACYC184-BglIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo

surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas buvo užneštas ant 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlės (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotos su tuo pačiu buferiu švirkšto injekcija. kolonėlė buvo po to užnešama ant sistemos pagal sekančią procedūrą: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BglII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

#### 4. BglII-HF ir BglII-WT palyginimas

BglII-HF ir BglII-WT FI buvo nustatomi atskirai ant pXba DNR keturiuose NEB buferiuose su B skiedikliu. Palyginimas yra parodytas figūroje 9 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 14 (žemiau).

Lentelė 13: BglII-HF ir BglII-WT palyginimas

| Buferis | BclI-HF   |        | BclI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|--------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI     | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 12,5 %    | ≥8000  | 25 %      | 250 | ≥32                  |
| NEB2    | 100 %     | ≥12800 | 100 %     | 64  | ≥2000                |
| NEB3    | 50 %      | ≥2000  | 100 %     | 120 | ≥16                  |
| NEB4    | 25 %      | ≥32000 | 6,3 %     | 16  | ≥2000                |

BglII-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2, kuriame FI buvo  $\geq 128000$ ; BglII-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 120. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 128000/120 = \geq 1000$ .

#### Pavyzdys 14: HF BstEII konstravimas

##### 1. BstEII raiška

BstEII raiška buvo vykdoma *E. coli* 3081, transformuotose pUC19-BstEII<sup>R</sup> ir pACYC-BstEII<sup>M</sup>, kiekviena iš kurių turi BstEII endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

## 2. BstEII-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 9, 10, 14, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 32, 36, 37, 40, 41, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 72, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 98, 99, 101, 102, 103, 105, 106, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 147, 150, 151, 152, 154, 155, 157, 160, 161, 162, 163, 165, 166, 167, 171, 172, 175, 176, 178, 179, 180, 182, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 199, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 227, 228, 232, 233, 234, 236, 238, 243, 244, 245, 246, 247, 251, 252, 255, 256, 258, 261, 262, 264, 265, 266, 272, 274, 277, 278, 279, 281 ; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 8, 15, 24, 27, 35, 43, 77, 129, 131, 139, 156, 188, 203, 229, 257 ir 263.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2683 kamieną.

## 3. BstEII-HF atranka

BstEII-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferyje, naudojant lambda DNR kaip substratą. BstEII-WT turėjo didesnę aktyvumą NEB3 buferyje, taigi buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu NEB4 buferyje. Buvo rasti septyni mutantai, turintys pagerintą aktyvumą NEB4 buferyje: K014A, Q069A, E099A, R105A, R117A, G135A ir Y035F. R105A turėjo didžiausią aktyvumo skirtumą, palyginus su WT NEB4 buferyje ir vandenyje ir taip pat rodė sumažintą žvaigždinį aktyvumą, kai buvo tiriamas kartu glicerolyje su ExoI buferiu, sąlyga, kuri rodė žvaigždinį aktyvumą WT. BstEII(R105A) yra pavadintas BstEII-HF.

## 4. BstEII-HF gryninimas

Du litrai ląstelių ER2683(pUC19-BstEII(R105),pACYC-BstEII<sup>M</sup>) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su

tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BstEII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

### 5. BstEII-HF ir BstEII-WT palyginimas

BstEII-HF ir BstEII-WT FI buvo nustatyti atskirai ant lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 10 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 15 (žemiau).

Lentelė 13: BstEII-HF ir BstEII-WT palyginimas

| Buferis | BstEII-HF |       | BstEII-WT |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 3 %       | ≥64   | 50 %      | 16 | ≥4                   |
| NEB2    | 50 %      | ≥1000 | 100 %     | 4  | ≥250                 |
| NEB3    | 1,6 %     | ≥32   | 50 %      | 16 | ≥2                   |
| NEB4    | 100 %     | ≥2000 | 100 %     | 4  | ≥500                 |

BstEII-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥2000; BstEII-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB4, kur FI buvo 4. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 2000/4 = \geq 500$ .

### Pavyzdys 15: HF BanII konstravimas

#### 1. BanII raiška

BanII raiška buvo vykdoma *E. coli* 3081, transformuotose pUC19-BanIIR ir pACYC-BanIIM, kiekviena iš kurių turi BanII endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

## 2. BanII mutagenezė

Visos liekanos, išskyrus Tyr (ir tas, kurios jau buvo Ala) buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 35, 38, 39, 43, 44, 45, 47, 49, 54, 59, 61, 63, 64, 66, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 81, 83, 84, 87, 88, 92, 94, 95, 96, 97, 99, 100, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 135, 139, 142, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 152, 153, 155, 156, 163, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 183, 184, 186, 190, 191, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 207, 208, 211, 213, 214, 215, 216, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 239, 240, 242, 245, 246, 247, 248, 252, 254, 256, 257, 258, 259, 261, 262, 263, 264, 266, 267, 270, 271, 272, 274, 276, 278, 279, 281, 284, 285, 286, 287, 289, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 302, 303, 305, 309, 311, 312, 314, 317, 318, 319, 322, 326, 327, 328, 330, 331, 334, 338, 339, 341, 342, 344, 346, 347, 348, 349, 351, 352, 355, 356 ir 358; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 27, 50, 80, 160, 182, 197, 244, 251, 260, 307 ir 313.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2566 kamieną.

## 3. BanII-HF atranka

BanII-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą NEB4 su vandeniu su žvaigždiniu aktyvumu, ExoI buferyje ir glicerolyje, naudojant lambda DNR kaip substratą. Mutantai, kurie rodė panašų arba pagerintą aktyvumą, lyginant su WT vandenyje ir NEB4, jeigu taip pat rodė pagerintą žvaigždinį aktyvumą, buvo atrinkti tolimesniam tyrimui. Šie mutantai sudarė N106A, Q169A ir E314A. R126A buvo atrinktas, kadangi rodė pastovų dalinį vaizdą, kuris, kaip mes parodėme, taip pat buvo didelio tikslumo indikatorius. Po išgryninimo R126A rodė geriausią žvaigždinio aktyvumo sumažėjimą. BanII(R126A) yra pavadintas BanII-HF.

## 2. BanII gryninimas

Du litrai ląstelių *ER2566*(pUC19-BanII(R126A),pACYC-BanIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM

NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BanII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. BanII-HF ir BanII-WT palyginimas

BanII-HF ir BanII-WT FI buvo nustatyti atskirai ant *dam*<sup>-</sup> lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 16 (žemiau).

Lentelė 16: BanII-HF ir BanII-WT palyginimas

| Buferis | BanII-HF  |       | BanII-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 100 %     | ≥4000 | 100 %     | 64 | ≥64                  |
| NEB2    | 50 %      | ≥2000 | 100 %     | 64 | ≥32                  |
| NEB3    | 12,5 %    | ≥500  | 12,5 %    | 16 | ≥32                  |
| NEB4    | 50 %      | ≥2000 | 100 %     | 16 | ≥125                 |

BanII-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB1 buferyje, kur FI buvo ≥4000; BanII-WT aktyviausias buvo NEB1, NEB2 ir NEB4, kur FI buvo 64. Taigi, bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 4000/64 = \geq 64$ .

### Pavyzdys 16: HF PspGI konstravimas

#### 1. PspGI raiška

PspGI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pRRS-PspGIRM, kurios turi PspGI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp.

#### 2. PspGI-HF mutagenezė

PspGI baltymo ilgis yra 272 aminorūgštys. Visos PspGI baltymo 166 a.r. vietos buvo numatytos mutuoti į Ala (arba Phe). Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutuos į Ala. Try buvo mutauta į Phe. Tai buvo: 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 32, 34, 35, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 60, 61, 62, 65, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 82, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 109, 110, 113, 134, 135, 136, 137, 138, 142, 143, 145, 149, 150, 151, 152, 153, 158, 160, 161, 162, 164 ir 165. Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo tuomet transformuotas į *E. coli* ER2984 kamieną.

### 3. PspGI-HF atranka

PspGI-HF atranka buvo atlikta naudojant mutantų ir WT aktyvumo palyginimą NEB4 buferyje ir naudojant pBC4 DNR kaip substratą. PspGI atrankos bandymai buvo atliekami naudojant pBC4 DNR kaip substratą NEB4 buferyje (2h skaldymas prie 69 °C). Rasta 11 mutantų, turinčių didesnę aktyvumą, negu WT NEB4 buferyje: T20A, P52A, Y67F, K68A, R75A, E86A, Q90A, S91A, Q93A, H121A ir G172A. PspGI (R75A) turėjo daug didesnę aktyvumą, negu WT NEB4 buferyje. Paprastai, mutantas su didžiausiu aktyvumu NEB4 turi pagerintą žvaigždinį aktyvumą. Po keleto ciklų palyginimų skirtingomis sąlygomis ir esant skirtingiems substratams, rasta, kad PspGI yra pageidaujamas mutantas, išlaikantis aukštą skėlimo aktyvumą, bet rodantis iš esmės sumažintą žvaigždinį aktyvumą. PspGI (R75A) yra pavadintas PspGI-HF.

### 4. PspGI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *E. coli* 2984(pRRS-PspGIRM(R75A)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare; dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą PspGI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. PspGI-HF ir PspGI-WT palyginimas

PspGI-HF ir PspGI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBC4 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 17 (žemiau).

Lentelė 17: PspGI-HF ir PspGI-WT palyginimas

| Buferis | PspGI-HF  |             | PspGI-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI          | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 25 %      | $\geq 1000$ | 12,5 %    | 1  | $\geq 1000$          |
| NEB2    | 100 %     | $\geq 4000$ | 100 %     | 4  | $\geq 1000$          |
| NEB3    | 100 %     | $\geq 4000$ | 100 %     | 8  | $\geq 500$           |
| NEB4    | 100 %     | $\geq 4000$ | 100 %     | 1  | $\geq 4000$          |

PspGI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2, NEB3 ir NEB4 buferiuose, kur pageidaujamas FI buvo  $\geq 4000$ ; PspGI-WT aktyviausias buvo NEB2, NEB3 ir NEB4. Kur geriausias PspGI-WT FI NEB 3 buferyje buvo 8. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 4000/8 = \geq 500$ .

#### Pavyzdys 17: HF SpeI konstravimas

##### **1. SpeI raiška**

SpeI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pRRS-SpeI ir pASYX20-SpeIM9, kiekviena turi SpeI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kan.

##### **2. SpeI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 9, 10, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 40, 43, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 65, 66, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 81, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 96, 97, 101, 102, 103, 105, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 115, 116, 118, 121, 122, 125, 126, 128, 130, 131, 137, 138, 139, 140, 142, 146, 149, 151, 152, 154, 157, 158, 159, 160, 161, 163, 166, 167, 169, 170, 172, 174, 175, 179, 180 ir 182; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 13, 19, 28, 55, 104, 120, 129 ir 164.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER1038 kamieną.

### 3. SpeI-HF atranka

SpeI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant kiekvieno mutanto aktyvumo palyginimą NEB4 buferyje su vandeniu ir pXba DNR, kuri pirma buvo suskaldyta su SacI-HF kaip substratu, glicerolio reakcija su ExoI ir normalia pXba. SacI-HF suskaldyta pXba pripažinta kaip didesnio grynumo, kai tiriamas mutantų aktyvumas, palyginus su WT. Glicerolio reakcija buvo naudojama žvaigždinio aktyvumo rezultatų palyginimui. Kai kurie mutantai rodė aukštą giminingą aktyvumą ir tuo pat metu žvaigždinio aktyvumo sumažėjimą: E059A, P065A, S108A, N 172A, K174A, Q179A, G182A ir Y055F. Po išgrynintų pavyzdžių palyginimo, SpeI(P065A) buvo pavadintas kaip SpeI-HF.

### 3. SpeI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER 3081*(pRRS-SpeIM7(P065A), pSYX20-SpeIM9)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą SpeI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. SpeI-HF ir SpeI-WT palyginimas

SpeI-HF ir SpeI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba keturiuose NEB buferiuose su C skiedikliu ir rezultatai parodyti lentelėje 18 (žemiau).

Lentelė 18: SpeI-HF ir SpeI-WT palyginimas

| Buferis | SpeI-HF   |       | SpeI-WT   |      | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|------|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI   |                      |
| NEB1    | 50 %      | ≥4000 | 100 %     | 100  | ≥1000                |
| NEB2    | 12,5 %    | ≥2000 | 100 %     | 500  | ≥2                   |
| NEB3    | 12,5 %    | ≥2000 | 12,5 %    | 2000 | ≥1/8                 |
| NEB4    | 100 %     | ≥8000 | 50 %      | 500  | ≥2                   |

SpeI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo  $\geq 8000$ ; SpeI-WT aktyviausias buvo NEB1, kur FI buvo 1000. Taigi, bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 8$ .

### Pavyzdys 18: HF BsmAI konstravimas

#### **1. BsmAI raiška**

BsmAI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pBAD241-BsmAIR ir pACYC184-BsmAIM, kiekviena iš kurių turi BsmAI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo užaugintos per naktį 37 °C LB terpėje su Amp ir Cam ir po to indukuotos arabinoze 4 valandas.

#### **2. BsmAI-HF mutagenezė**

Dėl homologijos tarp BsaI, BsmBI ir BsmAI, buvo pasirinktos aminorūgštys BsmAI 210-227 srityje nuosekliam mutavimui į Ala, kadangi BsaI ir BsmBI didelio tikslumo mutantai buvo rasti panašioje į šią srityje.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER3081 kamieną.

#### **3. BsmAI-HF atranka**

BsmAI-HF atranka buvo pasiekta naudojant BsmAI mutanto ir BsmAI WT žvaigždinio aktyvumo palyginimą NEB4 ant FX174 DNR kaip substrato. Du mutantai turėjo mažesnę žvaigždinį aktyvumą, negu BsmAI WT: N212A ir L213A. BsmAI(N212A) mutantas pavadintas kaip BsmAI-HF.

#### **4. BsmAI-HF gryninimas**

Du litrai ląstelių *EK2566*(pBAD241-BsmAI(N212A), pACYC184-BsmAIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Po to ląstelės buvo indukuotos 4 val. arabinoze, kurios galutinė koncentracija 0,2 %. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos

Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsmAI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. BsmAI-HF ir BsmAI-WT palyginimas

BsmAI-HF ir BsmAI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant FX174 DNR keturiuose NEB buferiuose su B skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 19 (žemiau).

Lentelė 19: BsmAI-HF ir BsmAI-WT palyginimas

| Buferis | BsmAI-HF  |       | BsmAI-WT  |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 100 %     | ≥4000 | 50 %      | 120 | ≥32                  |
| NEB2    | 50 %      | ≥2000 | 50 %      | 500 | ≥4                   |
| NEB3    | 12,5 %    | ≥500  | 50 %      | 500 | 1                    |
| NEB4    | 100 %     | ≥4000 | 100 %     | 250 | ≥8                   |

BsmAI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB1 ir NEB4 buferiuose, kur FI buvo ≥4000; BsmAI-WT aktyviausias buvo NEB4, kur FI buvo 250. Taigi, bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 4000/250 = \geq 16$ .

### Pavyzdys 19: HF BstXI konstravimas

BstXI atpažįsta ir skaldo ties CCANNNNN/NTGG kaip aprašyta tarptautinės paraiškos publikacijoje Nr. WO 2009/009797. BstXI (N65A) mutantas buvo atrinktas kaip BstXI didelio tikslumo versija. Sekanti geresnio su mažesniu žvaigždiniu aktyvumu BstXI paieškos pakopa buvo N65 mutavimas į kitas aminorūgščių liekanas. Iš visų buvo rasta, kad BstXI(N65T) turi mažą žvaigždinį aktyvumą ir jis buvo pavadintas BstXI-HF.

BstXI-HF raiška buvo vykdoma ER2833 (pBAD241-BstXI(N65T), pACYC-BstXIM. Auginimo ir gryninimo metodai buvo atliekami pagal WO/2009/009797.

Sekančioje lentelėje (Lentelė 20) palyginti BstXI-HF ir BstXI-WT FI.

Lentelė 20: BstXI-HF ir BstXI-WT palyginimas

| Buferis | BstXI-HF  |             | BstXI-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI          | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 50 %      | $\geq 500$  | 6 %       | 4  | $\geq 125$           |
| NEB2    | 100 %     | $\geq 1000$ | 100 %     | 32 | $\geq 32$            |
| NEB3    | 100 %     | $\geq 1000$ | 100 %     | 2  | $\geq 500$           |
| NEB4    | 100 %     | $\geq 1000$ | 100 %     | 32 | $\geq 32$            |

BstXI-HF geriausią aktyvumą rodė NEB2, NEB3 ir NEB4 buferiuose, geriausias BstXI-HF FI buvo  $\geq 1000$ ; WT BstXI turėjo geriausią aktyvumą NEB2, NEB3 ir NEB4 buferiuose. WT BstXI FI NEB2 buferyje ir NEB4 buferyje buvo 32. Taigi, bendras pagerinimo faktorius buvo  $\geq 32$ .

#### Pavyzdys 20: HF SfiI konstravimas

##### **1. SfiI raiška**

SfiI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pRRS-SfiIR ir pSX33-SfiIM, kiekviena turi SfiI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kan.

##### **2. SfiI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 55, 56, 58, 59, 63, 66, 67, 69, 71, 72, 73, 76, 79, 81, 82, 84, 87, 88, 89, 90, 91, 94, 95, 100, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 133, 135, 137, 140, 141, 145, 146, 148, 149, 150, 153, 156, 157, 158, 162, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 179, 180, 185, 187, 188, 190, 192, 193, 194, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 213, 214, 215, 218, 220, 224, 225, 227, 228, 231, 233, 235, 236, 238, 240, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 254, 255, 257, 258, 259, 261, 262, 263; Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 31, 60, 68, 80, 164, 165, 175, 182, 195, 222, 239, ir 245.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2169 kamieną.

### 3. SfiI-HF atranka

SfiI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą tarp mutantų ir WT vandenyje su NEB ExoI buferiu ir BSA, panaudojant kaip substratą pXba DNR, iš anksto suskaldytą EcoRI-HF. Buvo atrinkti mutantai su panašiu arba didesniu aktyvumu negu laukinis tipas, taip pat rodantys žvaigždinio aktyvumo pasikeitimą tam tikrame buferyje, lyginant su WT. Rasta keletas mutantų, turinčių didesnę aktyvumą NEB4: E007A, DOHA, E049A, R073A, R0114A, G137A, S210A ir R213A. Po gryninimo P114A pasirodė turintis didžiausią žvaigždinio aktyvumo sumažėjimą. SfiI(R114A) yra pavadintas SfiI-HF.

Taip pat įsidėmėtini buvo mutantai, kurių žvaigždinis aktyvumas padidėjo: N071A, D079A, H 162A, R225A, K227A, Y068F ir Y182F. Y068F anksčiau buvo pastebėti, kad turi skirtingą skėlimą, negu WT.

### 4. SfiI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių ER2169(pRRS-SfiI(R114A), pSX33-SfiIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kan prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą SfiI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. SfiI-HF ir SfiI-WT palyginimas

SfiI-HF ir SfiI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBC4 DNR keturiuose NEB buferiuose su C skiedikliu. Palyginimas parodytas 11 figūroje ir rezultatai išdėstyti lentelėje 21 (žemiau).

Lentelė 21: SfiI-HF ir SfiI-WT palyginimas

| Buferis | SfiI-HF   |             | SfiI-WT   |      | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------------|-----------|------|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI          | Aktyvumas | FI   |                      |
| NEB1    | 50 %      | $\geq 250$  | 12,5 %    | 64   | $\geq 4$             |
| NEB2    | 12,5 %    | $\geq 4000$ | 100 %     | 250  | $\geq 4$             |
| NEB3    | 0,4 %     | $\geq 32$   | 100 %     | 2000 | $\geq 1/64$          |
| NEB4    | 100 %     | $\geq 8000$ | 25 %      | 64   | $\geq 125$           |

SfiI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferijee, kur FI buvo  $\geq 8000$ ; SfiI-WT aktyviausias buvo NEB3, kuriame FI buvo 2000. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 8000/2000 \Rightarrow 4$ .

### Pavyzdys 21: HF PmeI konstravimas

#### **1. PmeI raiška**

PmeI raiška buvo vykdoma *E. coli* 3081, transformuotose pRRS-PmeIR ir pACYC-EsaS91M, kiekviena iš kurių turi PmeI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

#### **2. PmeI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 10, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 25, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 37, 39, 41, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 54, 55, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 87, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 121, 123, 124, 127, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 138, 145, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 160, 162, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 172, 177, 180, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 190, 191, 192, 193, 194, 199, 200, 201, 202, 204, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 215, 218, 219, 221, 222, 223, 225; Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 111, 129, 146 ir 161.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2426 kamieną.

### 3. PmeI-HF atranka

PmeI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą tarp mutantų ir WT vandeniniame NEB4, naudojant lambda DNR kaip substratą, su tais pat mutantais glicerolyje su NEB Thermopol buferiu ir pXba kaip substratu. PmeI mutantų ir WT tyrimas vandenyje ant lambda DNR leido palyginti gretimus aktyvumus ir buvo atrinkti mutantai su panašiu arba didesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje. Tačiau mutantai su priimtiniu aktyvumu paskui buvo atmesti, jeigu jie nerodė žvaigždinio aktyvumo pasikeitimo, tiriant esant glicerolio sąlygoms su Thermopol buferiu ir pXba. Keletas mutantų parodė turintys žvaigždinio aktyvumo skirtumus: P079A, E086A, H096A ir E218A. PmeI(E086A) yra pavadintas kaip PmeI-HF.

### 4. PmeI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2426(pRRS-PmeI(P154A), pACYC184-EsaS9IM)) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą SfiI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. PmeI-HF ir PmeI-WT palyginimas

PmeI-HF ir PmeI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas Rezultatai išdėstyti lentelėje 22 (žemiau).

Lentelė 22: PmeI-HF ir PmeI-WT palyginimas

| Buferis | PmeI-HF   |       | PmeI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 12,5 %    | ≥2000 | 100 %     | 250 | ≥64                  |
| NEB2    | 6,3 %     | ≥500  | 100 %     | 250 | ≥500                 |

|      |       |             |      |     |            |
|------|-------|-------------|------|-----|------------|
| NEB3 | 0,4 % | $\geq 32$   | 50 % | 120 | $\geq 125$ |
| NEB4 | 100 % | $\geq 8000$ | 25 % | 64  | $\geq 500$ |

PmeI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo  $\geq 8000$ ; PmeI-WT aktyviausias buvo NEB1 ir NEB2, kur FI buvo 250. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 8000/250 \Rightarrow 16$ .

### Pavyzdys 21: HF SmaI konstravimas

#### **1. SmaI raiška**

SmaI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pRRS-SmaIR ir pSYX20-SmaIM, kiekviena iš kurių turi SmaI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Kan.

#### **2. SmaI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala; visi Tyr buvo pakeisti į Phe.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2428 kamieną.

#### **3. SmaI-HF atranka**

SmaI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą vandeniniame NEB4, naudojant pXba DNR kaip substratą su žvaigždinį aktyvumą duodančiomis glicerolio sąlygomis NEb standartiniame Taq buferyje. Mutantai, kurie rodė žvaigždinio aktyvumo pasikeitimus nurodytame buferyje, buvo atrinkti, jeigu išlaikė panašų arba aukštą giminingą aktyvumą WT. Buvo rasta keletas mutantų: E32R, S081A, G132A ir dvigubas mutantas F60L/S61R. SmaI(F60L/S61R) yra pavadintas kaip SmaI-HF.

#### **4. SmaI-HF gryninimas**

Du litrai ląstelių EK2428(pRRS-SmaI(F60L/S61R), pSYX20-SmaIM)) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kan prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM

Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspın® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą SmaI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. SmaI-HF ir SmaI-WT palyginimas

SmaI-HF ir SmaI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 12 ir rezultatai parodyti lentelėje 23 (žemiau).

Lentelė 23: SmaI-HF ir SmaI-WT palyginimas

| Buferis | SmaI-HF   |         | SmaI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|---------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI      | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 0,2 %     | ≥2000   | 3 %       | ≥16 | ND                   |
| NEB2    | 3,2 %     | ≥32000  | 12,5 %    | ≥64 | ND                   |
| NEB3    | 0,0032 %  | ≥32     | 0,8 %     | ≥8  | ND                   |
| NEB4    | 100 %     | ≥256000 | 100 %     | 64  | ≥4000                |

ND: nenustatyta

SmaI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥256000; SmaI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB4, kur FI buvo 64. Bendras pagerinimo faktorius yra  $256000/64 \Rightarrow 4000$ .

### Pavyzdys 23: Didelio tikslumo AatII konstravimas

#### 1. AatII raiška

AatII raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pRRS-AatII ir pACYC184-AatIIM, kiekviena iš kurių turi AatII endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo užaugintos per naktį 37 °C LB terpėje su Amp ir Cam.

#### 2. AatII-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 45, 46, 49, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 83, 84, 86, 87, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 99, 100, 103, 104, 106, 107, 111, 113, 114,

117, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 153, 155, 156, 157, 160, 164, 165, 167, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 179, 181, 182, 186, 189, 191, 192, 193, 194, 196, 198, 200, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 213, 214, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 226, 228, 230, 231, 233, 235, 236, 237, 238, 240, 241, 244, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 272, 273, 275, 280, 281, 282, 283, 286, 298, 292, 293, 295, 296, 297, 298, 301, 302, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 317, 319, 321, 325, 327, 329, 330, 333, 334, 335, 336; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 82, 89, 98, 112, 232, 305 ir 306.

Mutagenėzė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2426 kamieną.

### 3. AatII-HF atranka

AatII-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą vandeniniame NEB4 su NEB ExoI buferyje glicerolyje, naudojant pXba DNR kaip substratą. Mutantai, kurie rodė žvaigždinio aktyvumo pasikeitimus, esant glicerolio sąlygoms, buvo atrinkti tolimesniam tyrimui iki tol, kol jie turėjo panašų arba aukštesnį aktyvumą negu WT esant normalioms sąlygoms vandenyje. Po pradinės atrankos buvo atrinkta keletas mutantų tolimesniam tyrimui: G013A, G016A, K018A, P052A, R053A, K070A, E071A, D072A, G073A, S84A, E086A, R090A, K094A, R095A, P099A, P103A, K113A, N 135A, S151A, P157A, G173A, T204A, S206A, K207A, E233A, N235A, E237A, S238A, D241A, K295A, S301A ir S302A. AatII(N235A) yra pavadintas kaip AatII-HF.

### 4. AatII-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2426(pRRS-AatII(N235A), pACYC184-AatIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą AatII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 3. AatII-HF ir AatII-WT palyginimas

AatII-HF ir AatII-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBR322 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas Rezultatai išdėstyti lentelėje 24 (žemiau).

Lentelė 24: AatII-HF ir AatII-WT palyginimas

| Buferis | AatII-HF  |       | AatII-WT  |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | NC        | NC    | 3 %       | 32  | ND                   |
| NEB2    | NC        | NC    | 100 %     | 1/4 | ND                   |
| NEB3    | NC        | NC    | NC        | NC  | ND                   |
| NEB4    | 100 %     | ≥1000 | 50 %      | 16  | ≥64                  |

NC: nežbaigta; ND: neišmatuojama

AatII-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo  $\geq 1000$ ; AatII-WT aktyviausias buvo NEB2, kur FI buvo 1/4. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 1000/1/4 \Rightarrow \geq 4000$ .

### Pavyzdys 24: HF ApoI konstravimas

#### 1. ApoI raiška

ApoI raiška buvo vykdoma *E. coli* 3081, transformuotose pRRS-ApoIR ir pACYC184-ApoIM, kiekviena iš kurių turi ApoI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

#### 2. ApoI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin ir Arg, buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 33, 35, 36, 37, 39, 41, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 124, 125, 128, 129, 131, 132, 133, 136, 137, 143, 144, 145, 148, 153, 155, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 166, 167, 169, 170, 175, 176, 178, 179, 181,

184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 199, 201, 202, 204, 206, 207, 209, 210, 214, 216, 217, 218, 221, 226, 227, 229 ir 230.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2426 kamieną.

### 3. ApoI-HF atranka

ApoI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant lambda DNR kaip substratą. Buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 buferyje yra padidinto tikslumo indikatorius. Buvo rasti sekantys mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: S64A, S80A, S162A, T77A/T96A ir N178A. ApoI(T77A/T96A) yra pavadintas kaip ApoI-HF.

### 4. ApoI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2426(pRRS-ApoI(T77A/T96A), pACYC184-ApoIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą ApoI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. ApoI-HF ir ApoI-WT palyginimas

ApoI-HF ir ApoI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pXba DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas Rezultatai išdėstyti lentelėje 24 (žemiau).

Lentelė 24: ApoI-HF ir ApoI-WT palyginimas

| Buferis | ApoI-HF   |    | ApoI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|----|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI | Aktyvumas | FI |                      |

|      |       |             |       |     |            |
|------|-------|-------------|-------|-----|------------|
| NEB1 | 50 %  | $\geq 2000$ | 25 %  | 120 | $\geq 16$  |
| NEB2 | 100 % | $\geq 4000$ | 100 % | 32  | $\geq 125$ |
| NEB3 | 25 %  | $\geq 1000$ | 100 % | 64  | $\geq 16$  |
| NEB4 | 50 %  | $\geq 2000$ | 50 %  | 32  | $\geq 64$  |

ApoI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 buferyje, kur FI buvo  $\geq 4000$ ; ApoI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB3, kur FI buvo 64. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 4000/64 = \geq 64$ .

#### Pavyzdys 25: HF BsmBI konstravimas

BsmBI atpažįsta ir skaldo CGTCTCN1/N5 kaip aprašyta Tarptautinės publikacijos Nr. WO2009/009797 23 pavyzdyje. BsmBI(R232A) mutantas buvo atrinktas kaip BsmBI didelio tikslumo versija. Tolimesnis šio mutanto charakterizavimas atskleidė, kad nors BsmBI(R232A) elgesys vienos valandos skalėje yra labai geras, tačiau jis nepasirodo puikiu skaldyme per naktį. Atliekant paiešką tarp didesnio sakaičiaus mutantų, BsmBI(W238A) buvo surastas, kad yra puikus ir vienos valandos reakcijoje ir reakcijoje per naktį ir pavadintas BsmBI-HF (Figūra 13).

BsmBI-HF raiška buvo vykdoma ER3081 (pBAD241-BsmBIR(W238A)/pACYC-BsmAIM). Auginimo ir gryninimo metodai buvo atlikti pagal WO/2009/009797.

Sekančioje lentelėje (lentelė 26) palyginami BsmBI-HF ir BsmBI-WT FI.

Lentelė 26: BsmBI-HF ir BsmBI-WT palyginimas

| Buferis | BsmBI-HF  |     | BsmBI-WT  |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-----|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI  | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 50 %      | 32  | 12,5 %    | 1   | 32                   |
| NEB2    | 50 %      | 120 | 50 %      | 8   | 25                   |
| NEB3    | 12,5 %    | 250 | 100 %     | 120 | 2                    |
| NEB4    | 100 %     | 250 | 25 %      | 4   | 64                   |

BsmBI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur BsmBI-HF FI NEB4 buvo 250; BsmBI-WT aktyviausias buvo NEB3. FI BsmBI-WT NEB2 buvo 120. Bendras pagerinimo faktorius yra 2.

## Pavyzdys 26: Didelio tikslumo BmtI konstravimas

### **1. BmtI raiška**

BmtI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pACYC-BmtIM ir placzz1-BmtIR. pACYC yra mažakopijinė suderinama plazmidė. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

### **2. BmtI mutagenezė**

Atrinktų mutantų taškinė mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu. Buvo padarytos 150 sekančių BmtI aminorūgščių mutacijų. Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutuotos į Ala. Try buvo mutuota į Phe. Tai buvo: 5, 9, 11, 12, 16, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 45, 46, 49, 50, 51, 53, 56, 58, 59, 60, 63, 65, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 101, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 112, 113, 116, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 152, 154, 156, 157, 161, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 175, 178, 179, 180, 181, 185, 186, 189, 190, 191, 193, 194, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 226, 228, 229, 230, 231, 234, 236, 237, 238, 239 ir 241. Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER3081 kamieną.

### **3. BmtI-HF atranka**

Kiekvienos mutacijos keturios kolonijos buvo užaugintos LB terpėje su Amp ir Cam 37 °C per naktį. Standartiniai BmtI giminingi ir žvaigždinio aktyvumo bandymai buvo atlikti naudojant pBC4 ExoI buferyje ir 10 % DMSO.

Mutantai S50A, Y81F, N93A ir W207A buvo atrinkti patikrinimo bandymuose. Po keleto palyginimo skirtingose sąlygose raundų buvo rasta, kad S50A yra privilegijuotas mutantas, išlaikantis aukštą kanoninį fermento aktyvumą, bet disponuojantis iš esmės sumažintu žvaigždiniu aktyvumu. BmtI(S50A) buvo pažymėtas kaip BmtI-HF.

#### 4. BmtI-HF gryninimas

Du litrai *E. coli* ląstelių 3081 (placzzi-BmtIR(S50A), pACYC-BmtIM) buvo užaugintos LB terpėje su 100 µg/ml Amp and 30 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriama eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspın® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BmtI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

#### 5. BmtI-HF ir BmtI-WT palyginimas

BmtI-HF buvo du kartus paeiliui praskiestas A skiedikliu ir juo veikama pXba. Rezultatas yra parodytas lentelėje 27.

Lentelė 27: BmtI-HF ir BmtI-WT palyginimas

| Buferis | BmtI-HF   |          | BmtI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|----------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI       | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 25 %      | ≥256000  | 50 %      | 32 | ≥8000                |
| NEB2    | 25 %      | ≥256000  | 100 %     | 16 | ≥16000               |
| NEB3    | 0,2 %     | ≥2000    | 6,3 %     | 32 | ≥64                  |
| NEB4    | 100 %     | ≥1000000 | 100 %     | 16 | ≥62500               |

BmtI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥1000000; BmtI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB4, kur FI buvo 16. Bendras pagerinimo faktorius FI buvo  $\geq 1000000/16 = \geq 62500$ .

#### Pavyzdys 27: HF BstNI konstravimas

### 1. BstNI raiška

BstNI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pBAD241-BstNIR and pACYC184-BstNIM, kiekviena iš kurių turi BstNI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam, praskiestos iki 1/10 LB terpe ir tuomet indukuotos arabinoze 4 valandas.

### 2. BstNI-HF mutagenėzė ir atranka

Serijos BstNI mutacijų sukūrimo eksperimento metu buvo surastas BstNI(G26N), turintis mažesnę žvaigždinę aktyvumą negu WT BstNI. Ieškant geresnių BstNI mutantų su netgi mažesniu žvaigždiniu aktyvumu, G26 buvo mutotas į visas kitas aminorūgštis. Tarp visų šių mutantų BstNI(G26T) turėjo mažiausią žvaigždinę aktyvumą ir yra pavadintas kaip BstNI-HF.

### 3. BstNI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2833(pBAD241-BstNI(G26T), pACYC184-BstNIM) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Po to ląstelės buvo praskiestos 1:10 LB terpe ir indukuotos arabinoze, kurios galutinė koncentracija 0,2 %, keturias valandas. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BstNI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 3. BstNI-HF ir BstNI-WT palyginimas

BstNI-HF ir BstNI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBR322 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 14, ir rezultatai išdėstyti lentelėje 28 (žemiau).

Lentelė 28: BstNI-HF ir BstNI-WT palyginimas

| Buferis | BstNI-HF  |    | BstNI-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|----|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI | Aktyvumas | FI |                      |

|      |       |            |       |     |            |
|------|-------|------------|-------|-----|------------|
| NEB1 | 50 %  | $\geq 120$ | 50 %  | 8   | $\geq 16$  |
| NEB2 | 100 % | $\geq 500$ | 100 % | 64  | 8          |
| NEB3 | 25 %  | $\geq 120$ | 100 % | 250 | $\geq 1/8$ |
| NEB4 | 100 % | 500        | 50 %  | 4   | $\geq 32$  |

BstNI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferiuose, kur FI buvo  $\geq 500$ ; BstNI-WT aktyviausias buvo NEB2 ir NEB3, kur FI buvo 250. Bendras pagerinimo faktorius FI buvo  $\geq 500/250 \Rightarrow \geq 2$ .

### Pavyzdys 28: HF MluI konstravimas

#### **1. MluI raiška**

MluI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pUC19-MluIR ir pACYC-MluIM, kiekviena iš kurių turi MluI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 30 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

#### **2. MluI mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 10, 11, 13, 16, 21, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 42, 44, 48, 50, 51, 54, 57, 59, 60, 61, 67, 68, 71, 72, 74, 75, 78, 79, 81, 83, 84, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 95, 97, 99, 101, 102, 104, 106, 108, 111, 112, 114, 116, 117, 119, 120, 121, 123, 125, 128, 130, 131, 132, 134, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 148, 152, 154, 155, 156, 157, 159, 161, 163, 165, 166, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 189, 192, 195, 196, 197, 200, 206, 207, 208, 210, 211, 214, 216, 218, 219, 220, 221, 223, 227, 228, 230, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 240, 243, 244, 247, 249, 255, 256, 257, 258, 261, 263, 264, 265, 266, 269; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 14, 28, 47, 53, 77, 107, 175, 198, 217, 239 ir 248.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER1582 kamieną.

#### **3. MluI-HF atranka**

MluI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant lambda DNR kaip substratą. Buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra padidinto

tikslumo indikatorius. Buvo rastas vienintelis mutantas, atitinkantis mūsų kriterijus buvo E112A/R132A; MluI(E112A/R132A) pavadintas MluI-HF.

#### 4. MluI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK1582(pUC19-MluI(E112A/R132A), pACYC184- MluIM)) buvo auginamos LB terpėje su su 100 µg/ml Amp and 30 µg/ml Cam prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspın® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą MluI-HF buvo pridamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

#### 5. MluI-HF ir MluI-WT palyginimas

MluI-HF ir MluI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 15, ir rezultatai išdėstyti lentelėje 29 (žemiau).

Lentelė 29: MluI-HF ir MluI-WT palyginimas

| Buferis | MluI-HF   |          | MluI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|----------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI       | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 25 %      | ≥256000  | 50 %      | 32 | ≥8000                |
| NEB2    | 25 %      | ≥256000  | 100 %     | 16 | ≥16000               |
| NEB3    | 0,2 %     | ≥2000    | 6,3 %     | 32 | ≥64                  |
| NEB4    | 100 %     | ≥1000000 | 100 %     | 16 | ≥62500               |

MluI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥32000; MluI-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 2000. Bendras pagerinimo faktorius FI yra  $\geq 32000/2000 \Rightarrow 16$ .

## Pavyzdys 29: HF BanI konstravimas

### **1. BanI raiška**

BanI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pUC19-BanIR ir pACYC184-BanIM, kiekviena iš kurių turi BanI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

### **2. BanI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 47, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 61, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 75, 76, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 100, 103, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 121, 122, 123, 124, 126, 130, 131, 133, 135, 136, 138, 139, 140, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 151, 152, 154, 156, 157, 160, 161, 169, 171, 174, 175, 176, 178, 179, 182, 183, 185, 187, 188, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 201, 202, 203, 208, 209, 211, 212, 213, 215, 217, 218, 220, 221, 224, 225, 226, 229, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 275, 277, 279, 281, 282, 283, 284, 285, 287, 288, 289, 291, 292, 294, 296, 298, 301, 302, 303, 304, 305, 312, 313, 315, 316, 318, 319, 320, 321, 324, 325, 328, 329, 330, 331, 333, 337, 338, 339, 340, 342, 346; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 104, 125, 127, 156, 159, 204, 239, 297, 306 ir 336.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2683 kamieną.

### **3. BanI-HF atranka**

BanI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą vandenyje ir NEB4 prieš glicerolį ir NEB ExoI buferį, naudojant lambda DNR kaip substratą. Buvo atrinkti mutantai su tokiu aktyvumu arba didesniu kaip WT NEB4 buferyje, jeigu jie taip pat rodė žvaigždinio aktyvumo pasikeitimą, jeigu buvo tiriama esant glicerolio sąlygoms. Kitas indikatorius, naudojamas šių mutantų atrinkimui, buvo faktas, kad žvaigždinio aktyvumo pašalinimas sukuria palaipsnišką gretimo skaldymo saitą. Buvo surasti skaitlingi mutantai, turintys žvaigždinio aktyvumo pakitimus ir gaunamą palaipsnišką saitą: N016A, S33A, P36A, H76A, P87A, N89A, R90A, T138A, K141A, K143A, Q221A, Q224A, N253A, Q292A, R296A, T152I, G326A ir T324A. BanI(Q292A) yra pavadintas kaip BanI-HF.

#### 4. BanI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER2683*(pUC19-BanI(P154A), pACYC184-BanIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BanI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

#### 5. BanI-HF ir BanI-WT palyginimas

BanI-HF ir BanI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 30 (žemiau).

Lentelė 30: BanI-HF ir BanI-WT palyginimas

| Buferis | BanI-HF   |       | BanI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 50 %      | ≥1000 | 25 %      | 4  | ≥250                 |
| NEB2    | 12,5 %    | ≥250  | 25 %      | 4  | ≥63                  |
| NEB3    | 0,4 %     | ≥8    | 6,3 %     | 2  | ≥4                   |
| NEB4    | 100 %     | ≥2000 | 100 %     | 16 | ≥125                 |

BanI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥2000; BanI-WT taip pat aktyviausias buvo NEB4, kur FI buvo 16. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 2000/16 = \geq 125$ .

#### Pavyzdys 30: HF KasI konstravimas

### 1. KasI raiška

KasI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose placZZ-KasIR ir pACY-SfoIM, kiekviena iš kurių turi KasI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

### 2. KasI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 11, 13, 14, 17, 18, 21, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39, 42, 43, 44, 47, 48, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 73, 76, 77, 78, 79, 83, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 108, 110, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 134, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 149, 150, 152, 153, 154, 156, 158, 161, 162, 163, 164, 165, 167, 168, 173, 177, 178, 180, 181, 182, 184, 185, 188, 189, 190, 191, 192, 195, 197, 198, 200, 202, 203, 204, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 225, 226, 228, 229, 231, 234, 237, 238, 241, 243, 244, 245, 246, 248, 251, 253, 255, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 269, 270, 271, 274, 275, 276, 277 ir 278; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 19, 41, 74, 80, 95, 207 ir 256.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2683 kamieną.

### 3. KasI-HF atranka

KasI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, kaip substratą naudojant pBR322 DNR. Buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu, negu WT NEB4, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra pagerinto tikslumo indikatorius. Buvo surasti sekantys mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: K024A, P214A, E146A, N251A ir Y095F. KasI(N251A) yra pavadintas kaip KasI-HF.

### 4. KasI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių ER2683(pLacZZ-KasI(M251A), pACYC-SfoIM)) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp and 33 µg/ml Cam prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis

gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą KasI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. KasI-HF ir KasI-WT palyginimas

KasI-HF ir KasI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBR322 DNR keturiuose NEB buferiuose su B skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 31 (žemiau).

Lentelė 31: KasI-HF ir KasI-WT palyginimas

| Buferis | KasI-HF   |        | KasI-WT   |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|--------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI     | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 50 %      | ≥8000  | 100 %     | 1  | ≥8000                |
| NEB2    | 100 %     | ≥16000 | 100 %     | 8  | ≥2000                |
| NEB3    | 12,5 %    | ≥2000  | 100 %     | 8  | ≥250                 |
| NEB4    | 100 %     | ≥16000 | 100 %     | 4  | ≥4000                |

KasI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB2 ir NEB4 buferyje, kur FI yra ≥16000; KasI-WT taip pat aktyviausias buvo tuose pačiuose buferiuose, kur geriausias FI yra 8. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 16000/8 = \geq 2000$ .

### Pavyzdys 31: HF NruI konstravimas

#### 1. NruI raiška

NruI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pUC19-NruIR ir pACYC-Sbo13IM, kiekviena iš kurių turi NruI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

#### 2. NruI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 34, 36, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 99, 101, 103, 104, 106, 107,

112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 124, 125, 127, 132, 134, 137, 138, 139, 141, 146, 147, 148, 149, 152, 154, 155, 157, 158, 159, 162, 163, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 174, 175, 177, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 189, 190, 191, 193, 196, 197, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211 ir 213; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 11, 31, 52, 69, 98, 64 ir 187.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2683 kamieną.

### 3. NruI-HF atranka

NruI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant *dam*<sup>-</sup> lambda DNR kaip substratą. Mutantai su disesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje buvo atrinkti, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra padidinto tikslumo indikatorius. Buvo rasti sekantys mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: G075A, Q099A, G155A ir P022A/R90A. P154A NruI(P022A/R90A) yra pavadintas kaip NruI-HF.

### 4. NruI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2683(pUC19-NruI(P022AR90A), pACYC184-Sbol3IM) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą NruI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. NruI-HF ir NruI-WT palyginimas

NruI-HF ir NruI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant *dam*<sup>-</sup> lambda DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Rezultatai išdėstyti lentelėje 32 (žemiau).

Lentelė 32: NruI-HF ir NruI-WT palyginimas

| Buferis | NruI-HF   |              | NruI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|--------------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI           | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 0,4 %     | $\geq 64$    | 12,5 %    | 64  | $\geq 1$             |
| NEB2    | 6,3 %     | $\geq 1000$  | 50 %      | 250 | $\geq 4$             |
| NEB3    | 6,3 %     | $\geq 1000$  | 100 %     | 500 | $\geq 2$             |
| NEB4    | 100 %     | $\geq 16000$ | 12,5 %    | 32  | $\geq 32$            |

NruI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo  $\geq 16000$ ; NruI-WT aktyviausias buvo NEB3, kur FI buvo 500. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 16000/500 = \geq 32$ .

### Pavyzdys 32: HF NspI konstravimas

#### **1. NspI raiška**

NspI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pUC19-NspIR ir pACYC-FatIM, kiekviena iš kurių turi NspI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

#### **2. NspI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 26, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 96, 97, 99, 100, 102, 104, 107, 108, 111, 114, 116, 117, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 136, 138, 139, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 159, 161, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 191, 193, 195, 199, 200, 201, 202, 203, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 220, 222, 225, 227, 230, 231, 234, 235, 236, ir 238; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 48, 75, 113, 115, 198 ir 224.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2566 kamieną.

### 3. NspI-HF atranka

NspI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, kaip substratą naudojant pBR322 DNR. Buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu, negu WT NEB4, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra pagerinto tikslumo indikatorius. Buvo surasti sekantys mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: S097A ir E125A. NspI(S097A) yra pavadintas kaip NspI-HF.

### 4. NspI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2566(pUC19-NspI(S097A), pACYC-FatIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą NspI-HF buvo pridėdamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

### 5. NspI-HF ir NspI-WT palyginimas

NspI-HF ir NspI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pUC19 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu ir su BSA. Palyginimas yra parodytas figūroje 16, ir rezultatai išdėstyti lentelėje 33 (žemiau).

Lentelė 31: NspI-HF ir NspI-WT palyginimas

| Buferis | NspI-HF   |       | NspI-WT   |     | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|-------|-----------|-----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI    | Aktyvumas | FI  |                      |
| NEB1    | 100 %     | ≥4000 | 100 %     | 250 | ≥16                  |
| NEB2    | 100 %     | ≥500  | 100 %     | 16  | ≥32                  |

|      |        |            |      |     |           |
|------|--------|------------|------|-----|-----------|
| NEB3 | 12,5 % | $\geq 250$ | 25 % | 120 | $\geq 50$ |
| NEB4 | 100 %  | 500        | 50 % | 32  | $\geq 16$ |

NspI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB1 ir NEB4 buferyje, kur geriausias FI buvo  $\geq 4000$ ; NspI-WT aktyviausias buvo NEB1 ir NEB2 buferiuose, kur geriausiasb FI buvo 250. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 4000/250 \Rightarrow 16$ .

### Pavyzdys 33: HF BsrFI konstravimas

#### **1. BsrFI raiška**

BsrFI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pBAD-BsrFIR ir pSYX33-HpaIIM, kiekviena iš kurių turi BsrFI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kan su arabinozės indukcija.

#### **2. BsrFI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 56, 59, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 86, 87, 89, 91, 93, 94, 95, 97, 98, 103, 105, 106, 108, 109, 111, 113, 114, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 128, 129, 130, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 154, 157, 158, 159, 161, 162, 163, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 177, 180, 181, 183, 184, 185, 187, 189, 190, 194, 196, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 211, 212, 213, 214, 217, 218, 222, 224, 226, 229, 230, 231, 233, 235, 238, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 248, 249, 250, 253, 254, 257, 258, 259, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 273, 276, 278, 279, 281, 282, 284 ir 285; Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 14, 34, 53, 90, 96, 99, 125, 160, 227, 236, 237.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER2566 kamieną.

#### **3. BsrFI-HF atranka**

BsrFI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant pBR322 DNR kaip substratą. Mutantai su disesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje buvo atrinkti, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra padidinto

tikslumo indikatorius. Buvo rasti sekantys mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: K021A/I031R ir T120A. BsrFI(K021A/I031R) yra pavadintas kaip BsrFI-HF.

#### 4. BsrFI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *EK2566*(pBAD-BsrFI(K021A/I031R), pSYX33-HpallM) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kan prie 37 °C per naktį su 0,2 % arabinozės indukcija po 8 valandų. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po 30 minučių centrifugavimo prie 15000 rpm, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsrFI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

#### 5. BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas

BsrFI-HF ir BsrFI-WT FI buvo nustatyti atskirai ant pBR322 DNR keturiuose NEB buferiuose su A skiedikliu. Palyginimas parodytas figūroje 17 ir rezultatai išdėstyti lentelėje 35 (žemiau).

Lentelė 35: BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas

| Buferis | BsrFI-HF  |      | BsrFI-WT  |    | Pagerinimo faktorius |
|---------|-----------|------|-----------|----|----------------------|
|         | Aktyvumas | FI   | Aktyvumas | FI |                      |
| NEB1    | 100 %     | ≥500 | 25 %      | 16 | ≥32                  |
| NEB2    | 12,5 %    | ≥64  | 100 %     | 4  | ≥500                 |
| NEB3    | NC        | NC   | 3,1 %     | 8  | ≥-8                  |
| NEB4    | 100 %     | ≥500 | 50 %      | 16 | ≥32                  |

BsrFI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo  $\geq 16000$ ; BsrFI-WT aktyviausias buvo NEB2, kur FI buvo 4. Bendras pagerinimo faktorius yra  $\geq 500/4 = \geq 120$ .

#### Pavyzdys 34: HF BspEI konstravimas

##### **1. BspEI raiška (SEQ ID Nr. 34)**

BspEI raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pLazz1-BspEIR ir pACYC184-BspEIM, kiekviena iš kurių turi BspEI endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje LB terpėje per naktį su Amp ir Cam.

##### **2. BspEI-HF mutagenezė**

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 81, 82, 84, 85, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 101, 102, 103, 106, 107, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 117, 121, 122, 124, 126, 127, 128, 129, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 140, 141, 148, 149, 151, 153, 155, 156, 157, 160, 162, 164, 166, 167, 168, 169, 172, 174, 175, 176, 177, 178, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 189, 192, 193, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 208, 209, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 228, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 242, 244, 245, 246, 250, 251, 253, 254, 255, 256, 258, 260, 261, 263, 264, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 275, 276, 277, 281, 282, 283, 285, 286, 288, 289, 293, 294.

Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo po to transformuotas į *E. coli* ER3081 kamieną.

##### **3. BspEI-HF atranka**

BspEI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant nemetilintą ( $\lambda$ ) DNR kaip substratą. WT BspEI turėjo didesnę aktyvumą NEB3, buvo atrinkatas vienintelis su didesniu aktyvumu NEB4. Rasti 6 mutantai, turintys didesnę aktyvumą NEB4: K7A, T10A, N11A, N14A, Q232A and T199A. T199A turėjo didžiausią aktyvumą NEB4 buferyje, lyginant su WT. BspEI(T199A) yra pavadintas kaip BspEI-HF.

#### Pavyzdys 35: Didelio tikslumo BamHI konstravimas (papildomi mutantai)

BamHI (SEQ ID Nr. 35) atpažįsta ir skaldo G/GATCC kaip aprašyta Tarptautinės publikacijos Nr. WO 2009/009797 1-ame pavyzdyje. BamHI(E163A/E167T) mutantas buvo atrinktas kaip BamHI didelio tikslumo versija.

Buvo atlikta pilna BamHI mutacija. Be liekanų, apie kurias pranešta ankstesniuose patentuose ir paraiškose, likusios liekanos taip pat buvo mutuotos į Ala padėtyse 3, 7, 8, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 47, 48, 49, 53, 54, 55, 56, 57; 58, 59, 60, 63, 64, 67, 68, 73, 74, 79, 80, 82, 83, 85, 90, 91, 92, 93, 95, 99, 100, 102, 105, 108, 109, 110, 112, 115, 116, 117, 124, 125, 127, 128, 129, 130, 131, 134, 136, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 147, 148, 151, 152, 156, 158, 159, 162, 164, 166, 168, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 194, 197, 198, 203, 206, 210 ir 212.

Tarp šių mutantų P92A, P144A, G197A ir M198A turėjo aukštesnį aktyvumą negu laukinio tipo BamHI. P92A gali būti alternatyvus didelio tikslumo BamHI.

SEQ ID Nr. 1

<120> Didelio tikslumo restrikcijos endonukleazės

<130> NEB-331-PCT

<150> 61/301,666

<151> 2010-02-05

<150> 61/387,800

<151> 2010-09-29

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> Proteus vulgaris

<400> 1

Met Lys Lys Asn Arg Tyr Glu Ser Ile Ile Glu Gly Ile Phe Leu Asp  
1 5 10 15

Lys Tyr Val Asp Gly Asn Asp Ile Val Glu Phe Asn Arg Thr Asp Ile  
20 25 30

Ile Ser Lys Ser Ala Glu Leu Asp Ile Asn Leu Pro Lys Asn Ile Gly  
35 40 45

Asp Val Ile Tyr Ser Phe Lys Tyr Arg Ala Ser Leu Pro Val Ser Ile  
50 55 60

Thr Gln Lys Ala Gln Asn Gly Lys Glu Trp Val Ile Lys Asn Ile Gly  
65 70 75 80

Arg Ser Leu Tyr Cys Phe Gln Gln Val Asn Tyr Ser Arg Ile Leu Pro  
85 90 95

Asp Met Met Leu Ser Thr Ile Lys Ile Pro Asp Ser Thr Pro Thr Ile  
100 105 110

Val Ala Glu His Ala Phe Asn Asp Glu Gln Ala Leu Leu Thr Arg Val  
115 120 125

Arg Tyr Asn Arg Leu Ile Asp Ile Phe Thr Gly Ala Val Cys Tyr Ser  
130 135 140

Leu Gln Asn His Leu Arg Thr Thr Val Pro Ser Val Gly Gln Ile Glu  
145 150 155 160

Thr Asp Glu Ile Tyr Val Gly Val Asp Arg Leu Gly Arg Gln Phe Ile  
165 170 175

Phe Pro Val Gln Ala Lys Gly Gly Lys Asp Glu Leu Gly Ile Val Gln  
180 185 190

Ile Glu Gln Asp Phe Leu Leu Cys Arg His Lys Tyr Pro Asn Leu Ile

195

200

205

Cys Arg Pro Ile Ala Thr Gln Phe Ile Ser Asn Asp Lys Ile Ala Ile  
210 215 220

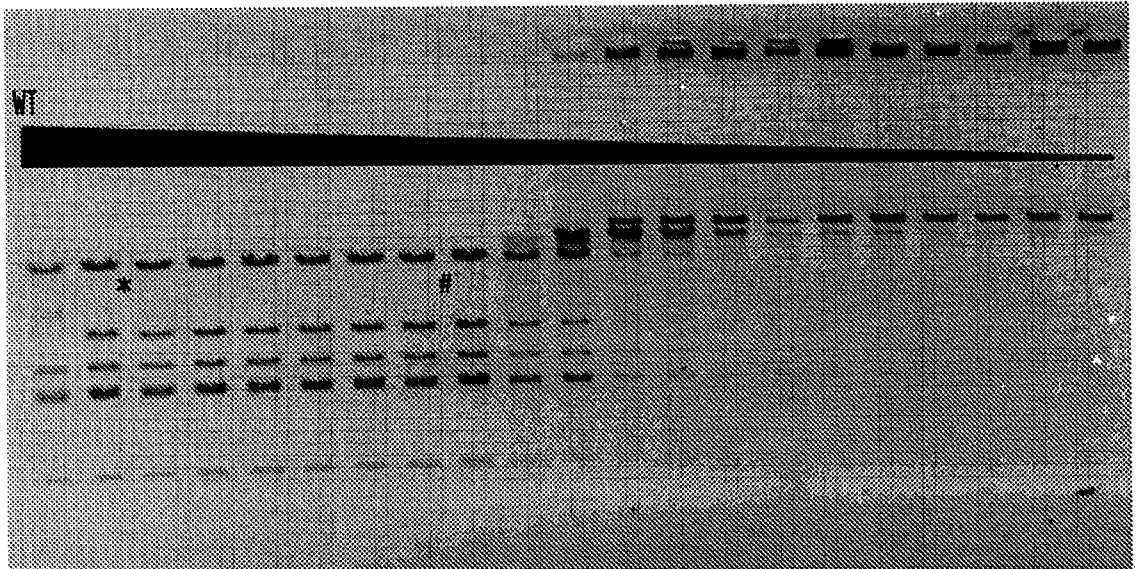
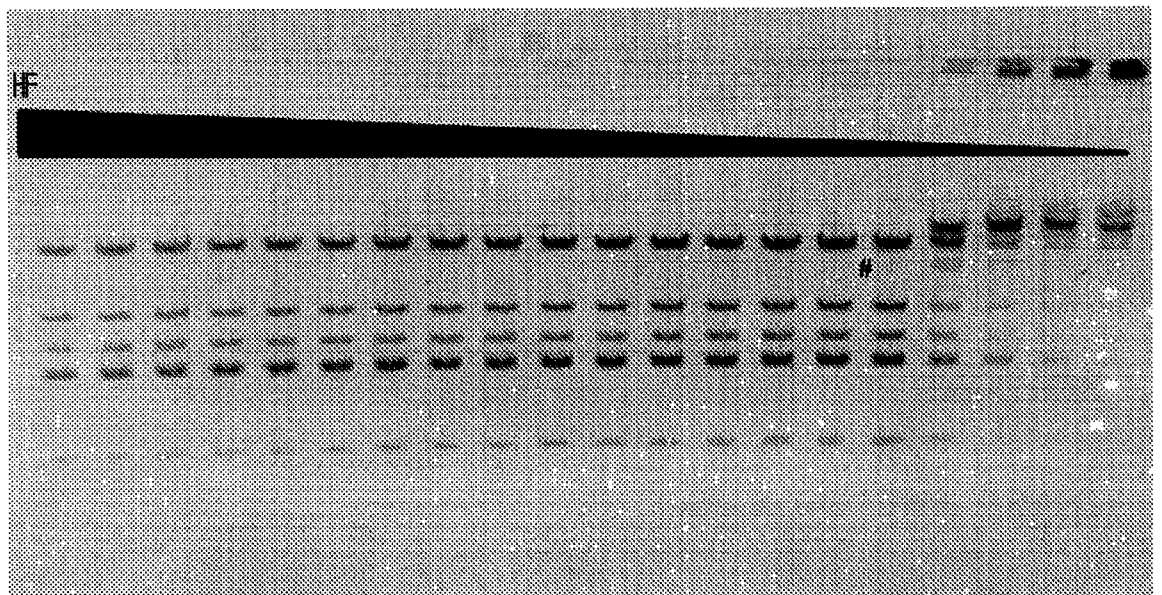
Phe Glu Phe Val Leu Glu Asn Asn Glu Val Lys Lys Leu Gln Glu Lys  
225 230 235 240

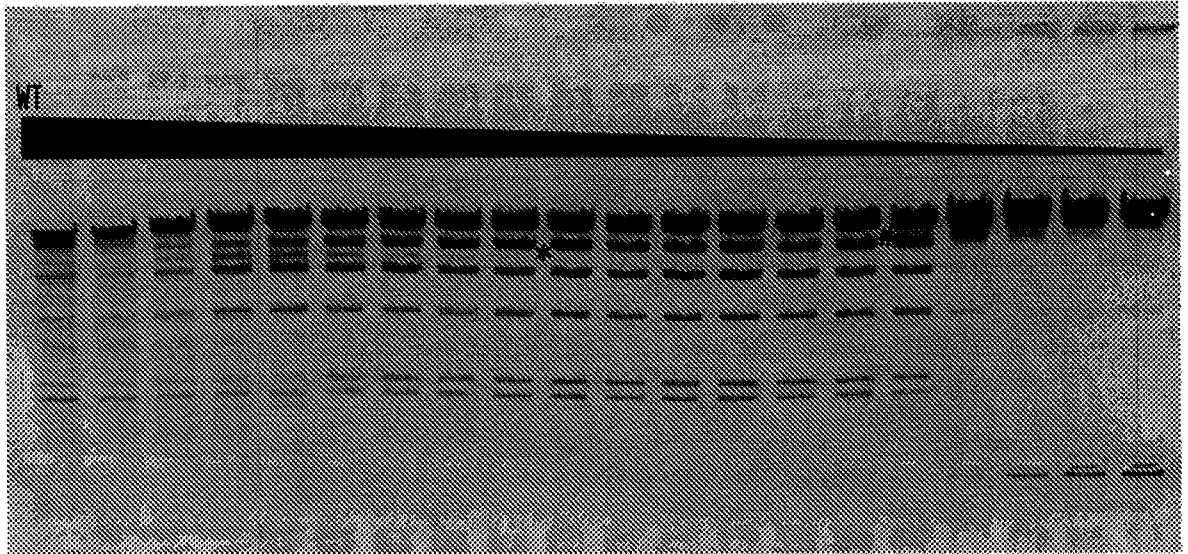
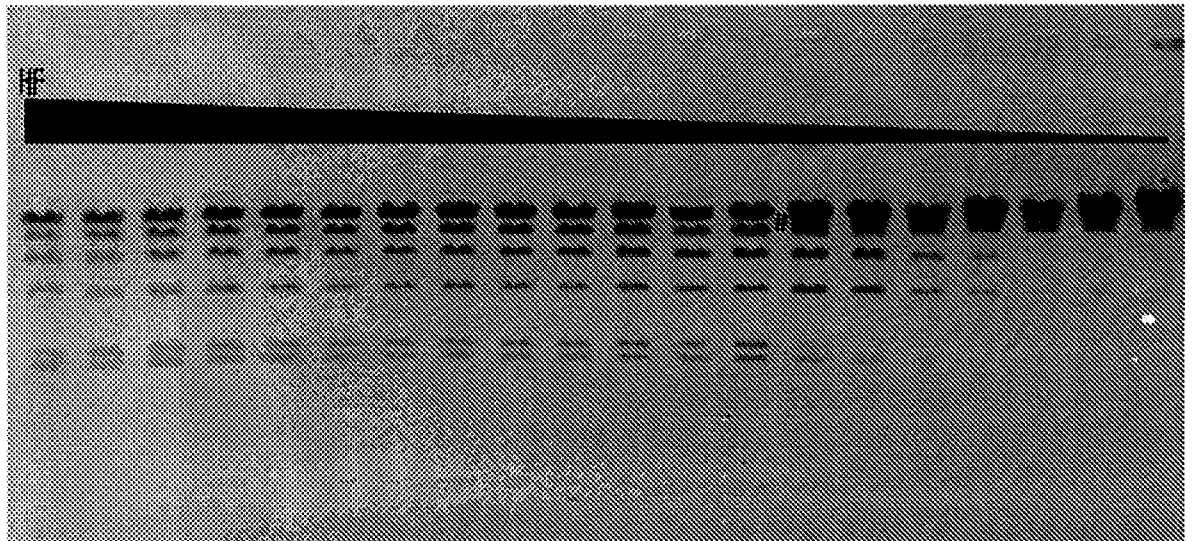
His Tyr Leu Leu Val Gly Lys Gly Gln Ile Ser Val Asp Glu Leu Ser  
245 250 255

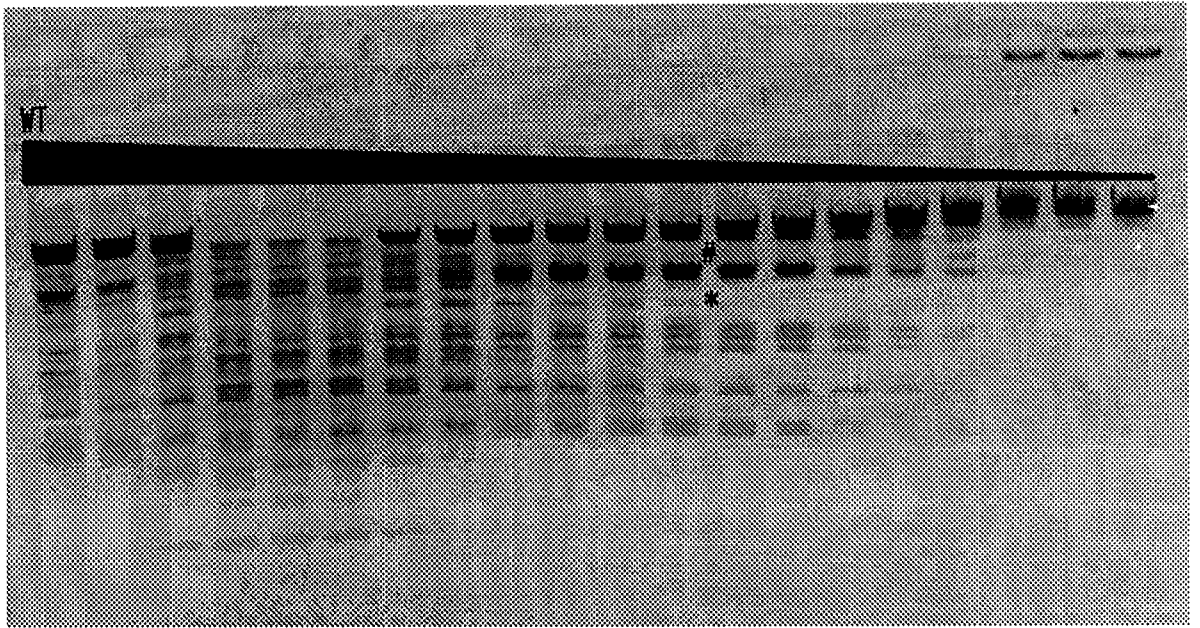
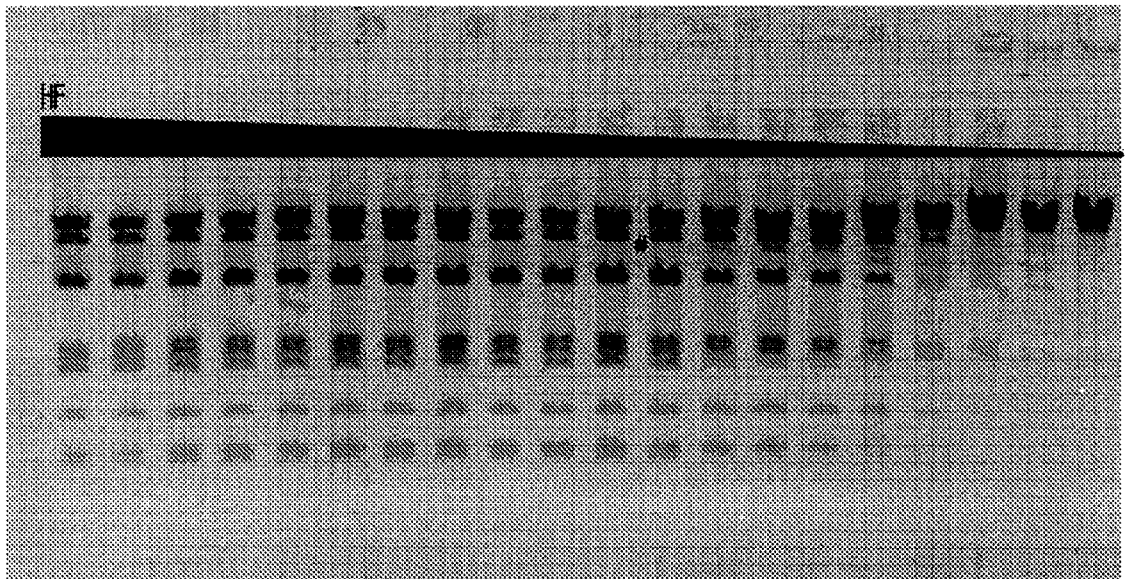
Asn Tyr Asn Phe  
260

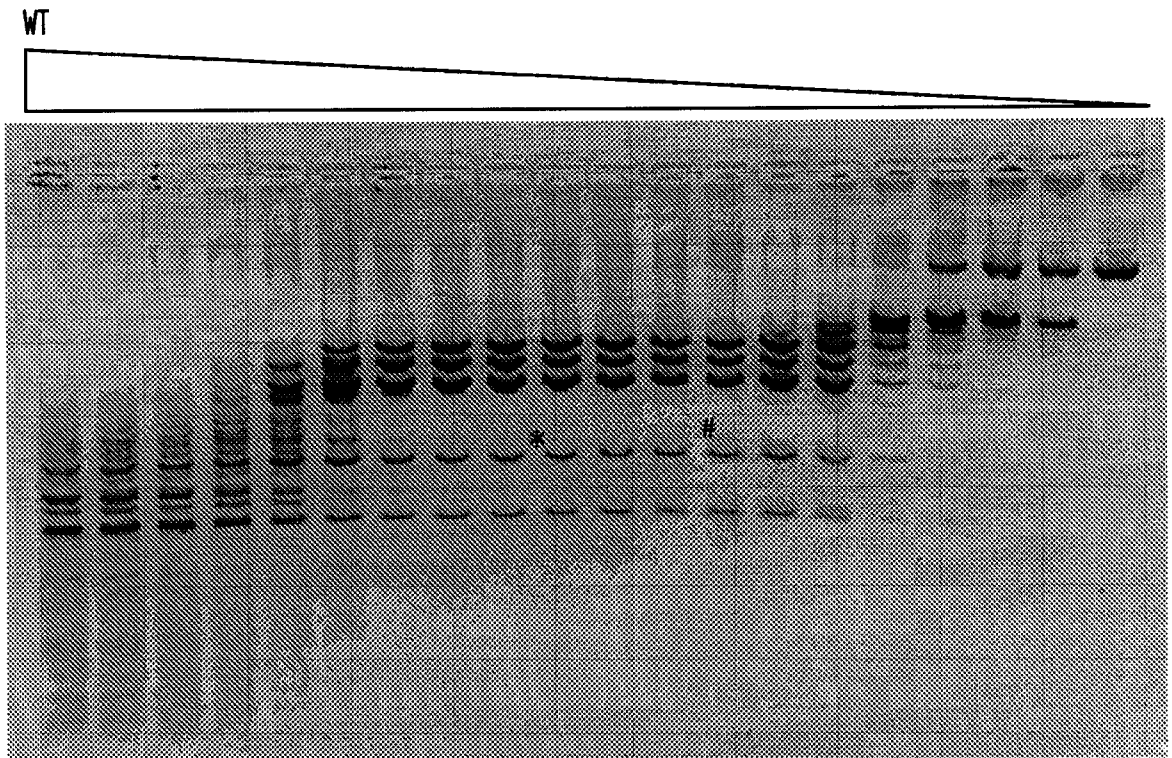
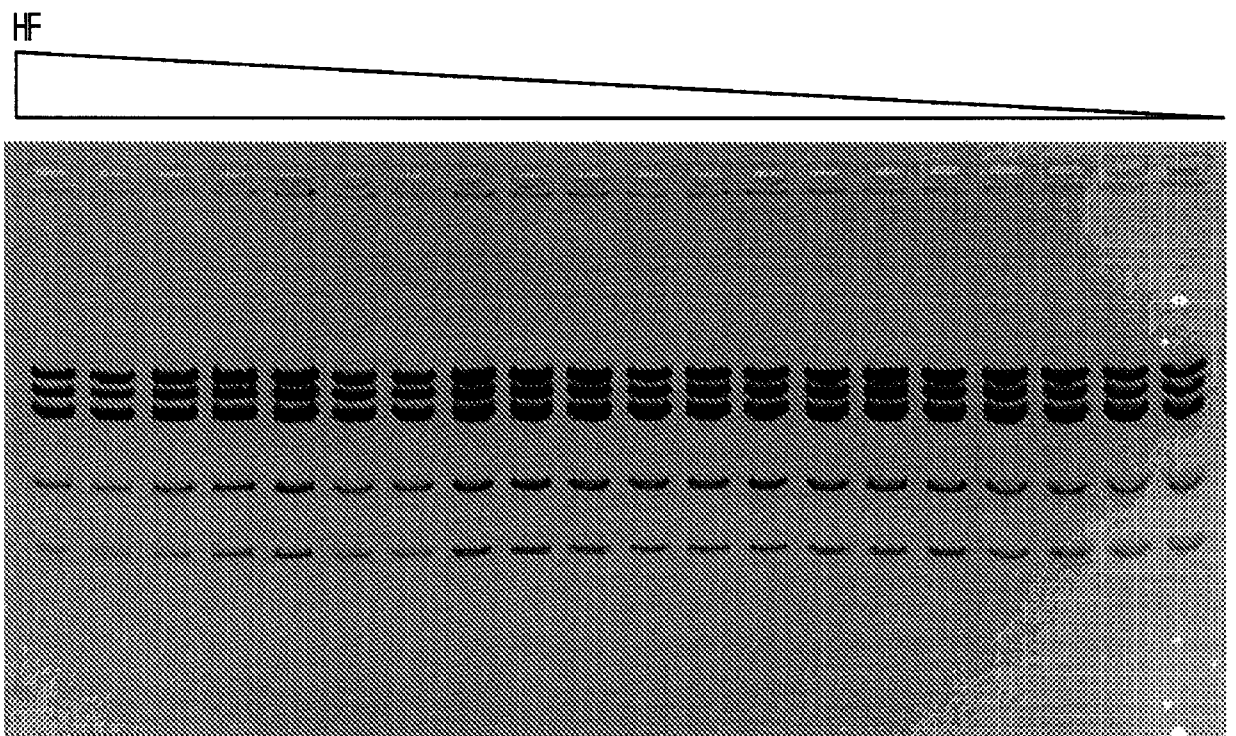
### Išradimo apibrėžtis

1. Kompozicija, apimanti: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 1, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S36, K77, P154, E163, Y165 ir K185.
2. Fermentas pagal 1 punktą, kur aminorūgšties mutacija yra parinkta iš grupės, susidedančios iš S36A, K77A, P154A, E163A, Y165F ir K185A.
3. Fermentas pagal 1 arba 2 punktą, kur mutacija yra P154A.
4. Nukleorūgšties seka, koduojanti fermentą, turintį aminorūgščių seką pagal bet kurį 1-3 punktą.
5. Vektorius, apimantis nukleorūgšties seką pagal 4 punktą.
6. Ląstelė šeimininkė, apimanti nukleorūgšties seką pagal 4 punktą arba vektorių pagal 5 punktą.

**FIG. 1A****FIG. 1B**

**FIG. 2A****FIG. 2B**

**FIG. 3A****FIG. 3B**

**FIG. 4A****FIG. 4B**

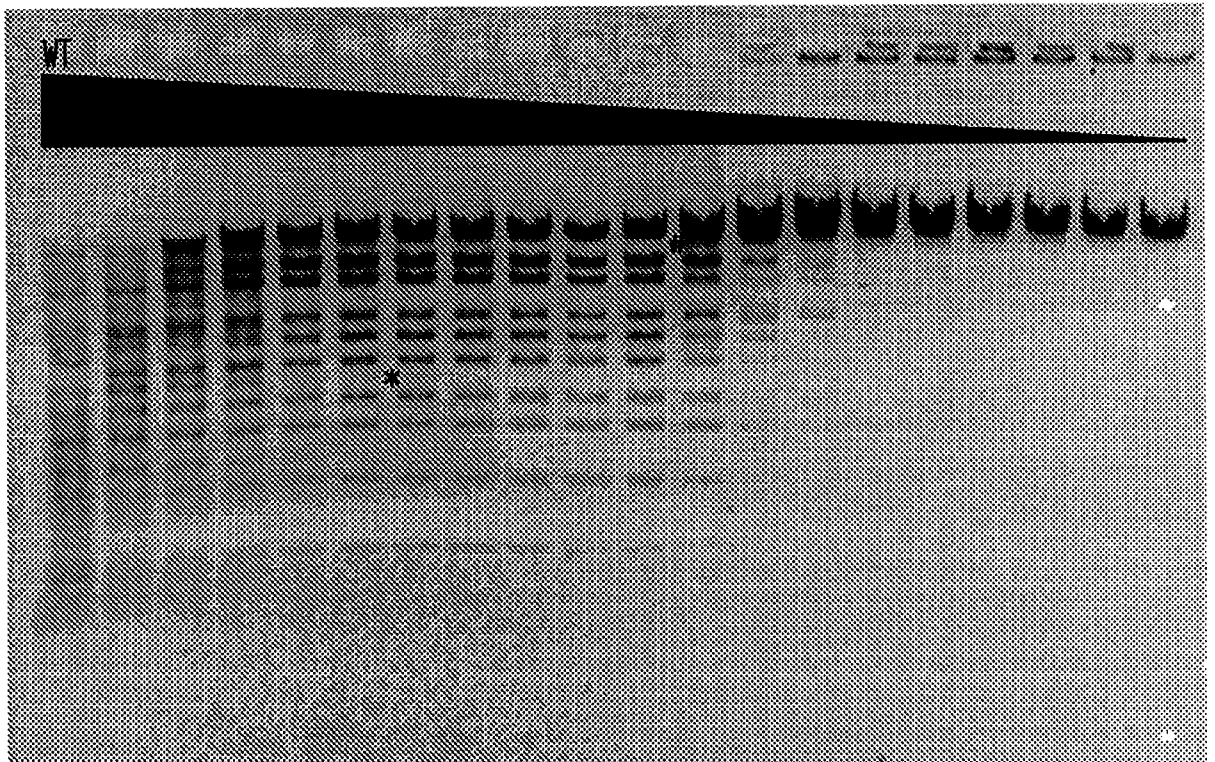
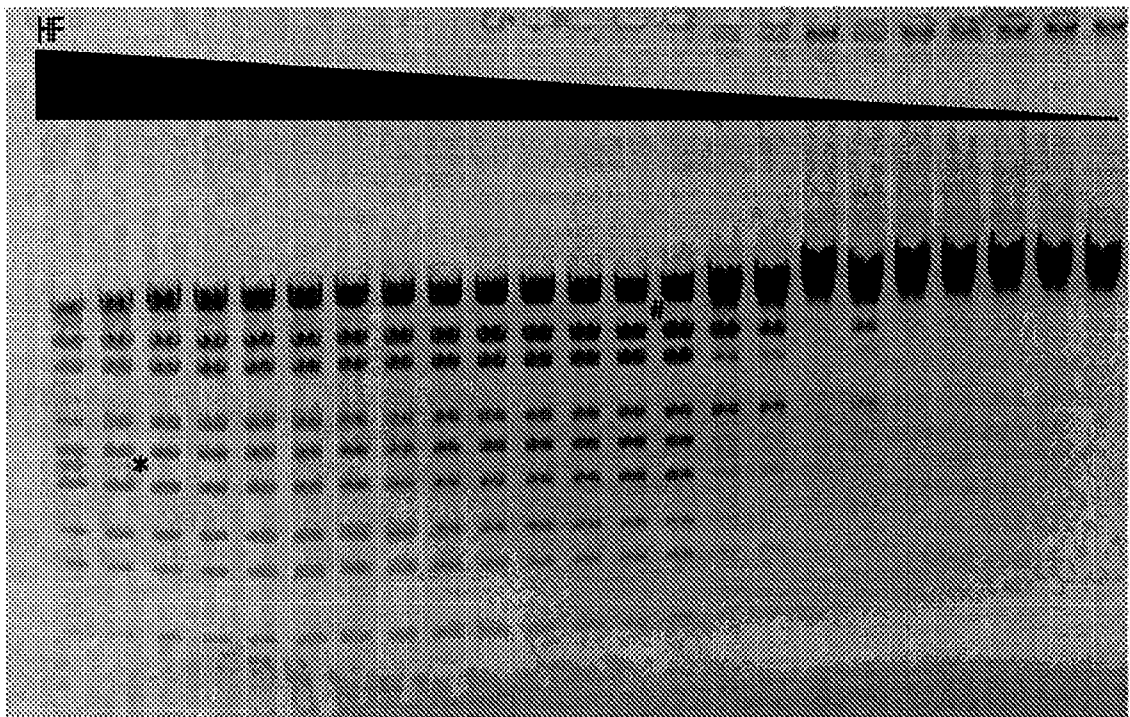
**FIG. 5A****FIG. 5B**

FIG. 6

WT

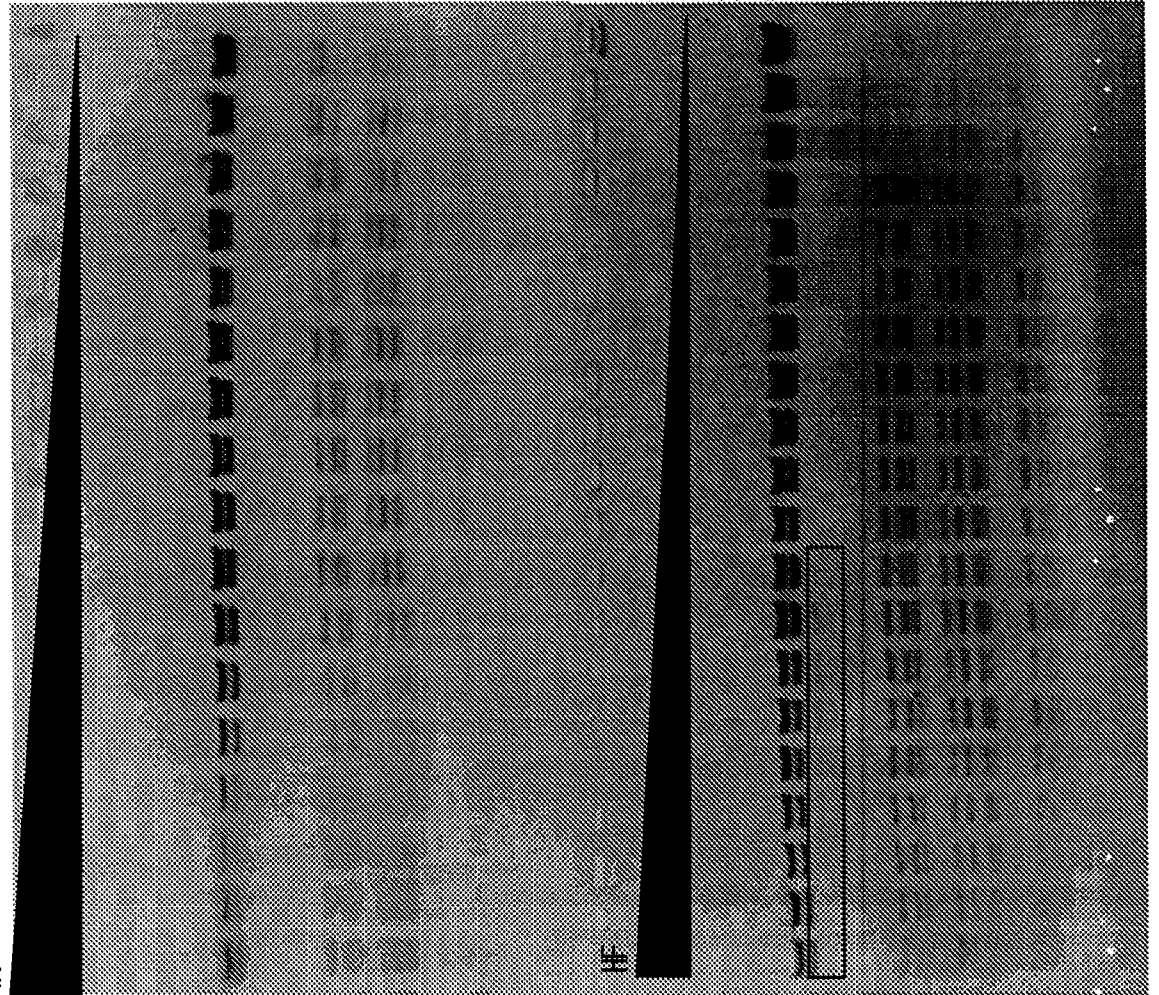




FIG. 8

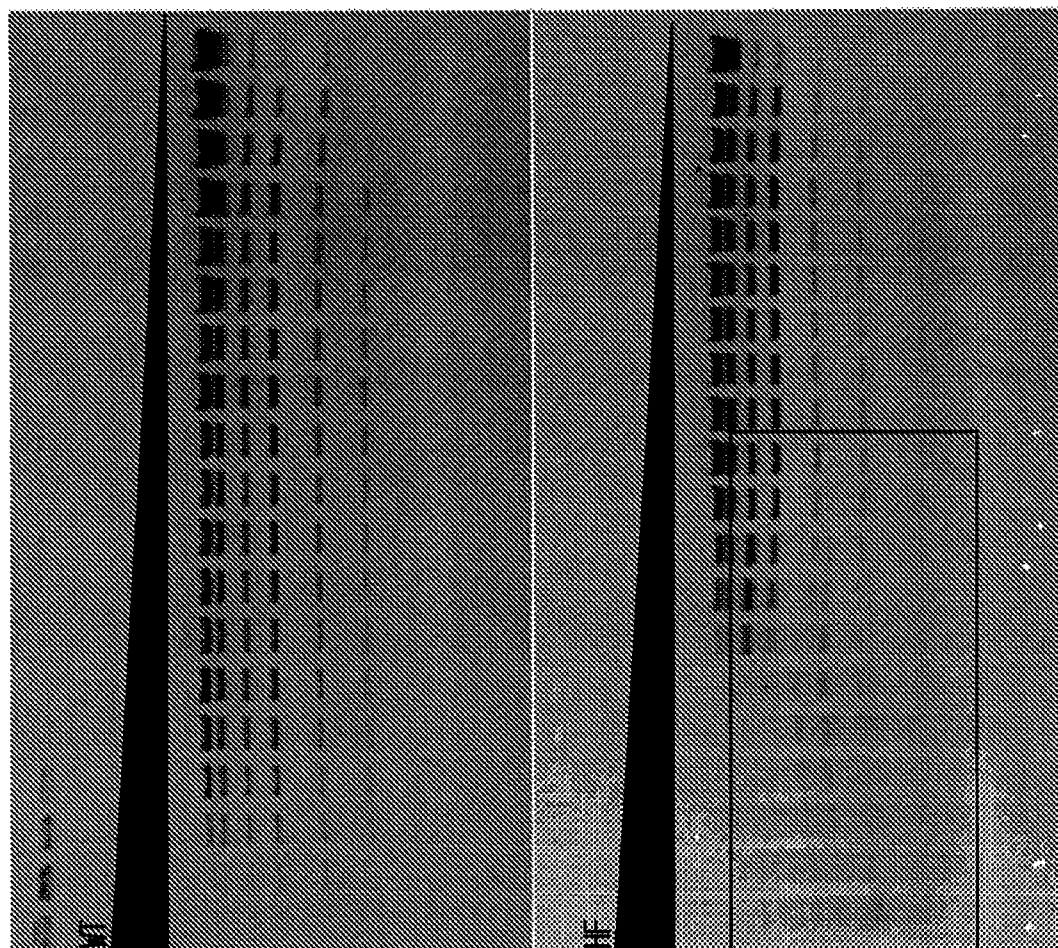


FIG. 9

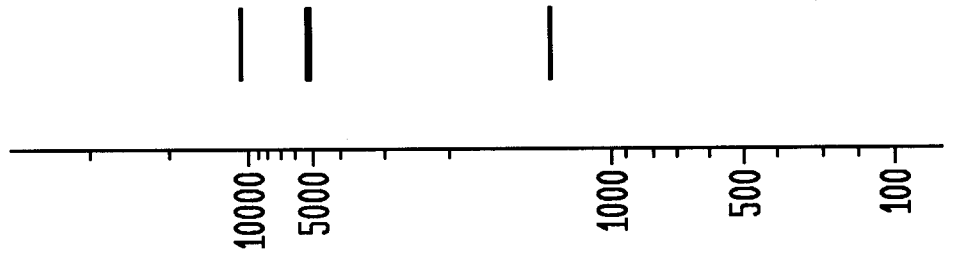
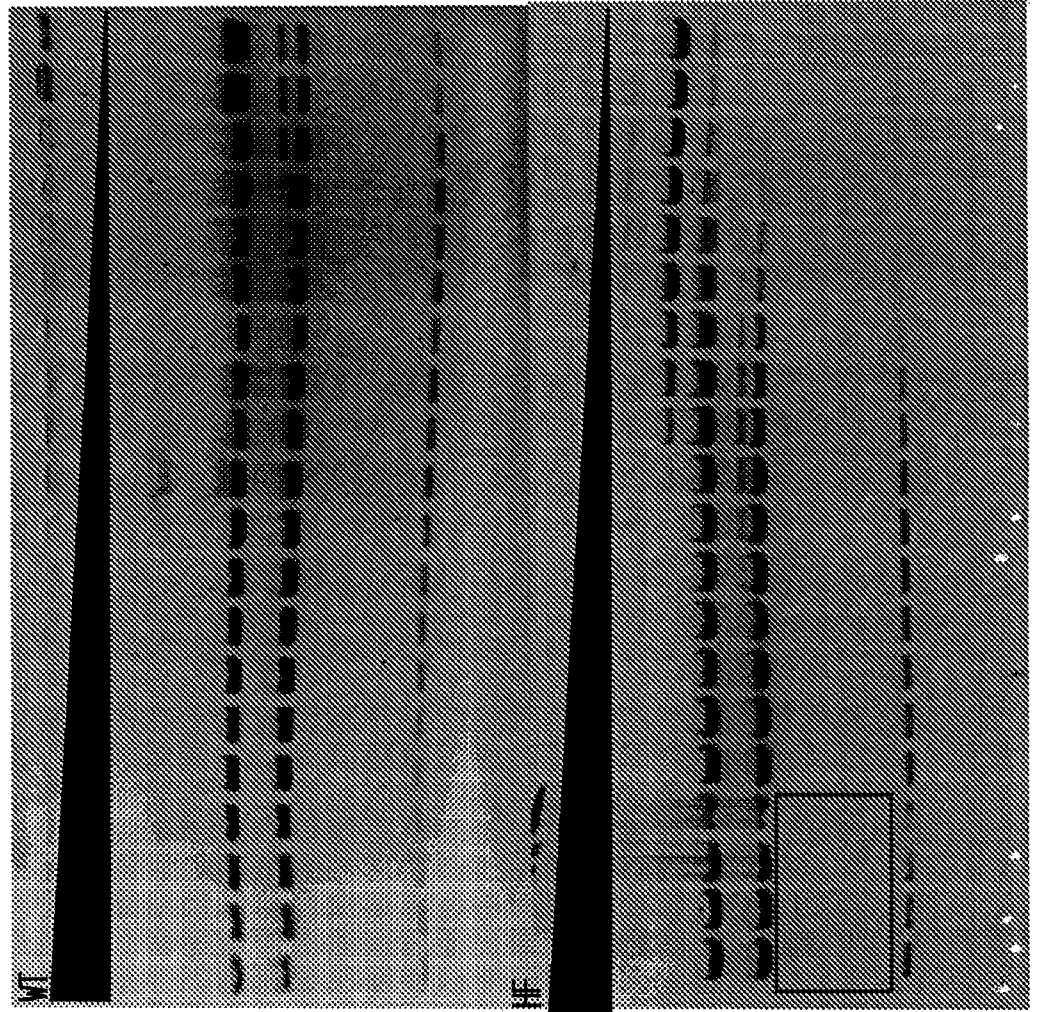


FIG. 10

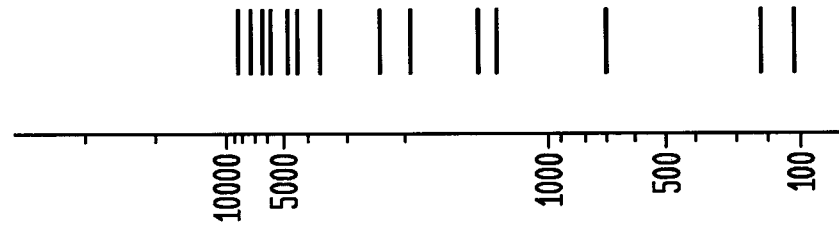
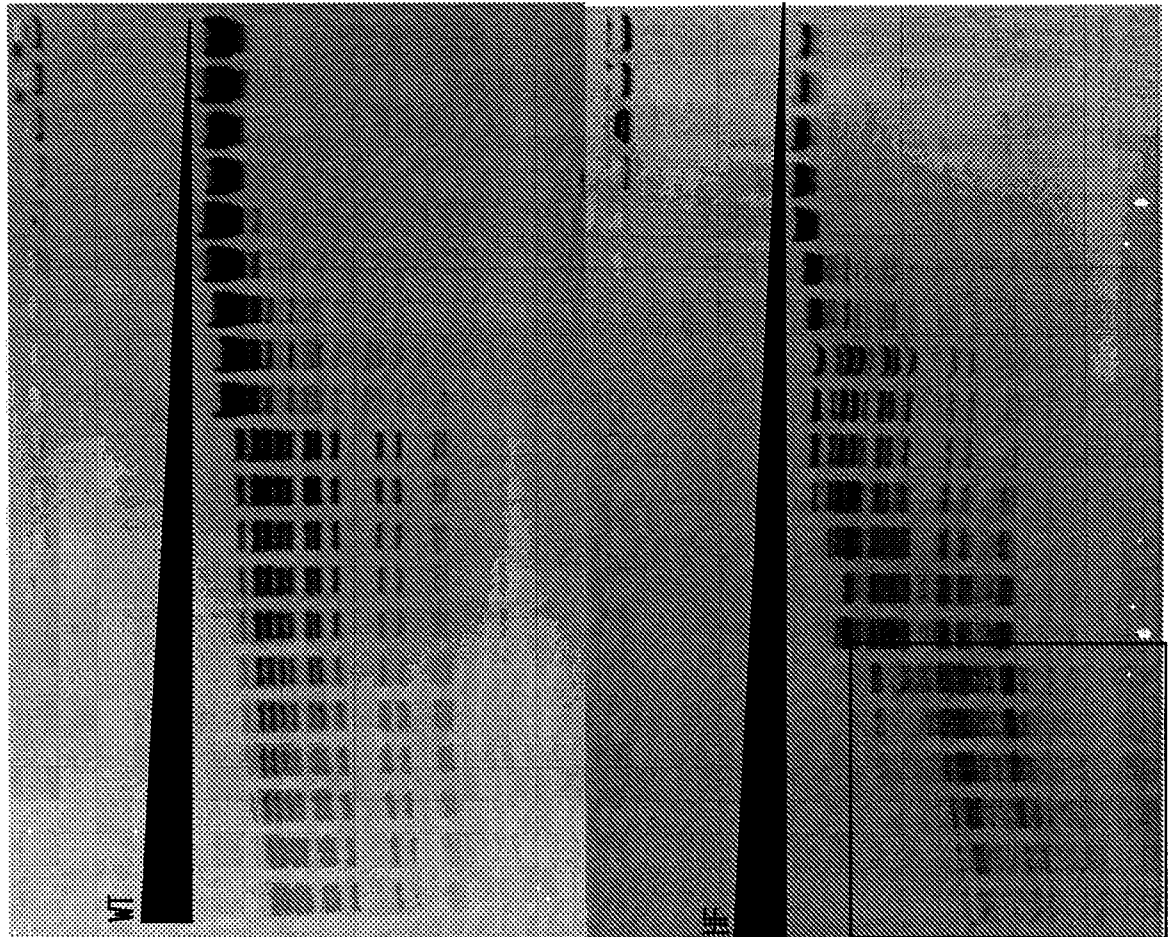
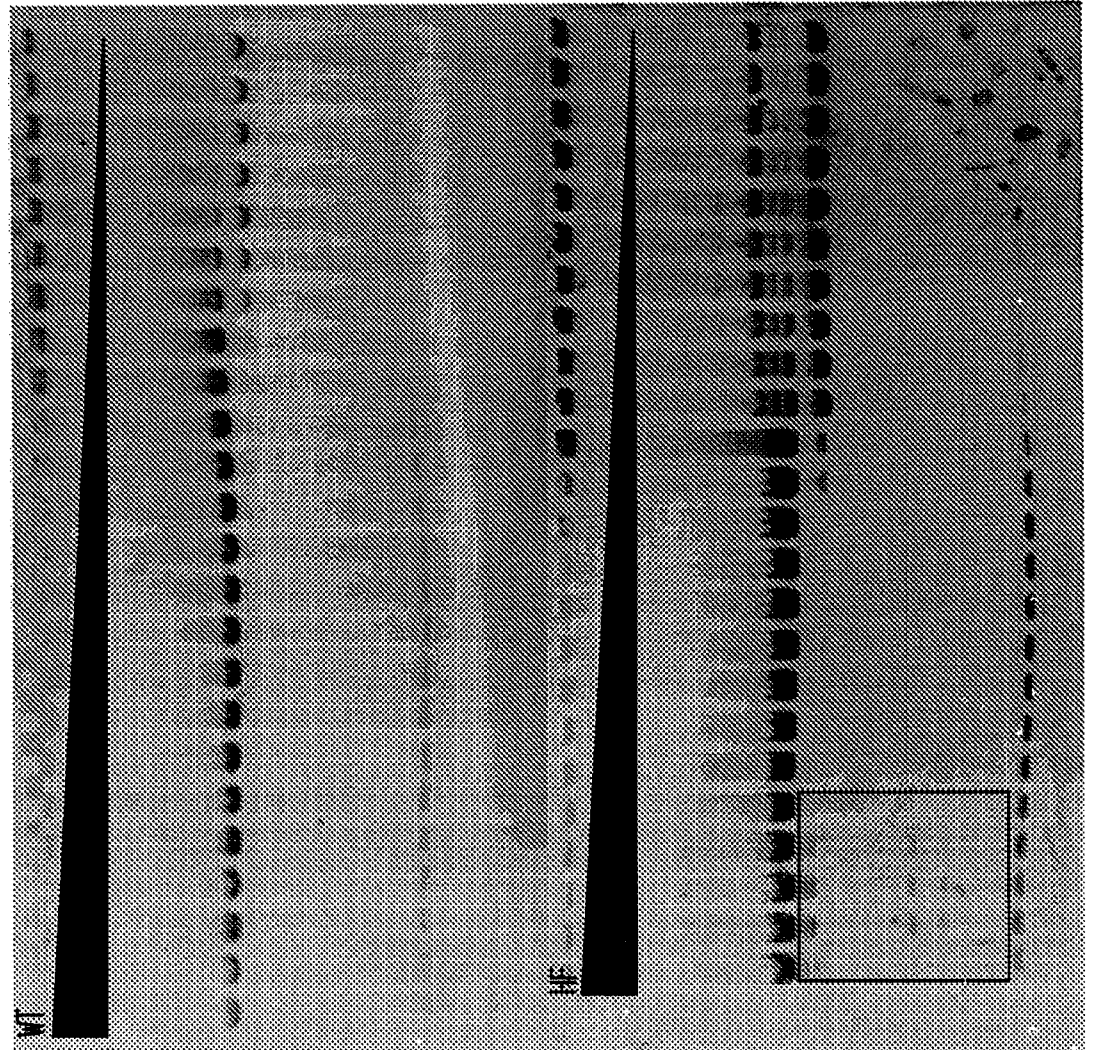


FIG. 11



**FIG. 12**

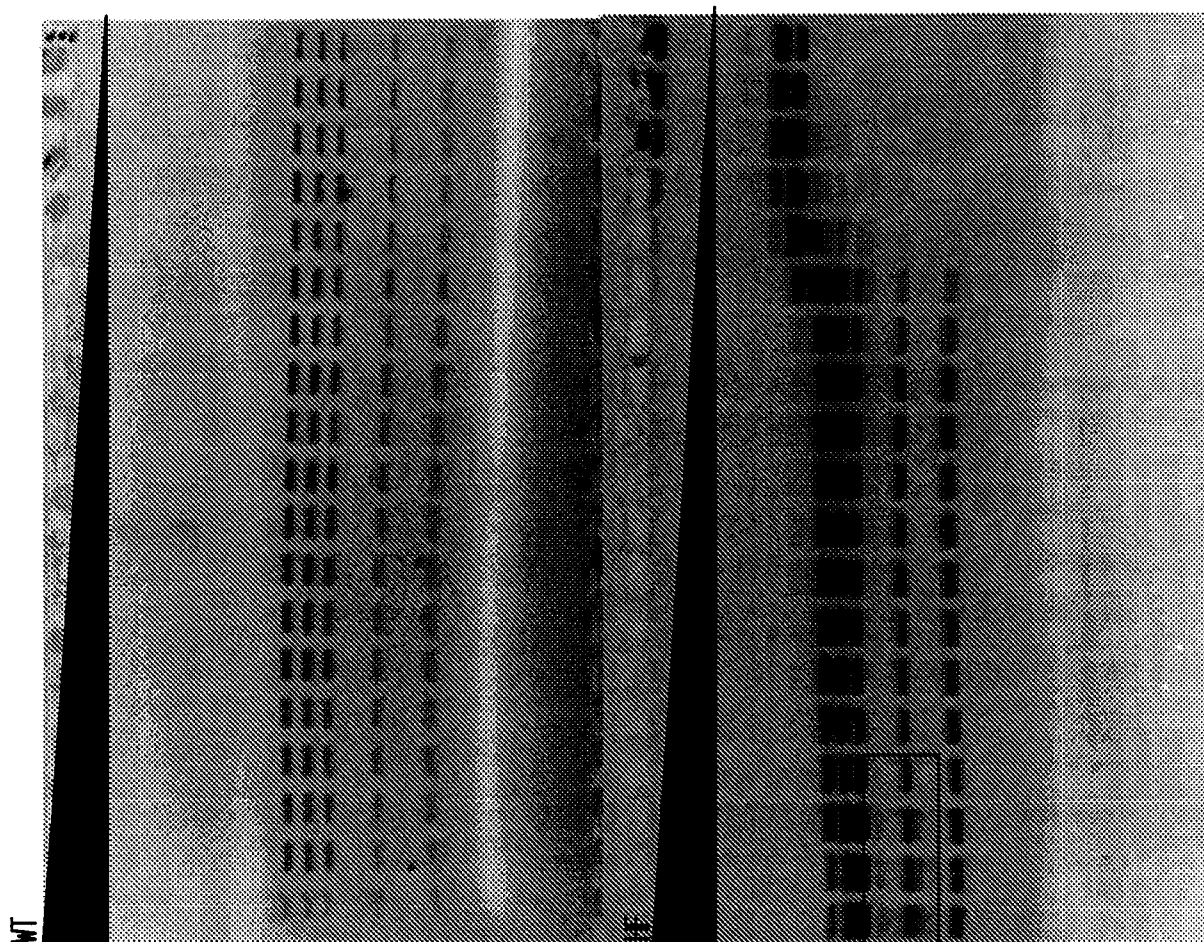


FIG. 13

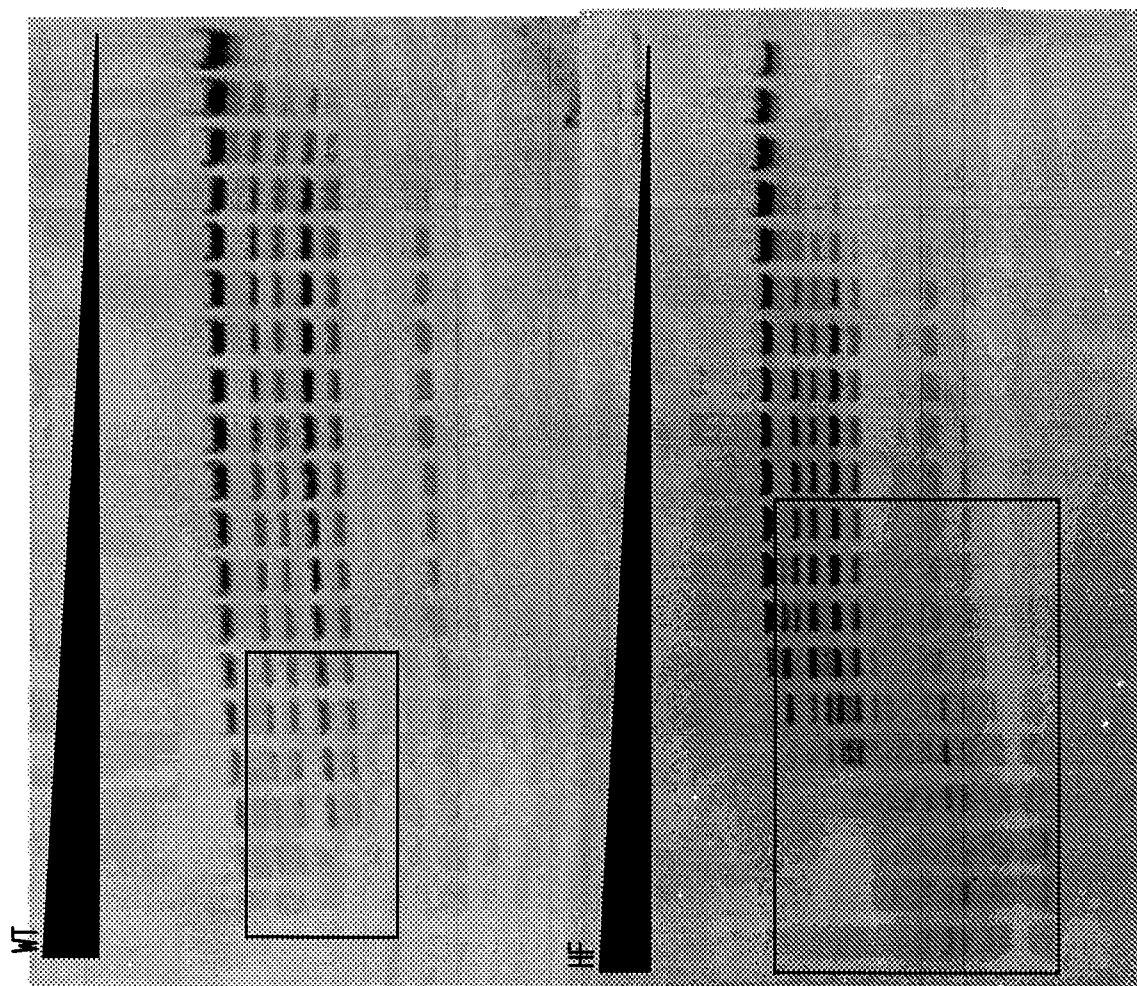


FIG. 14

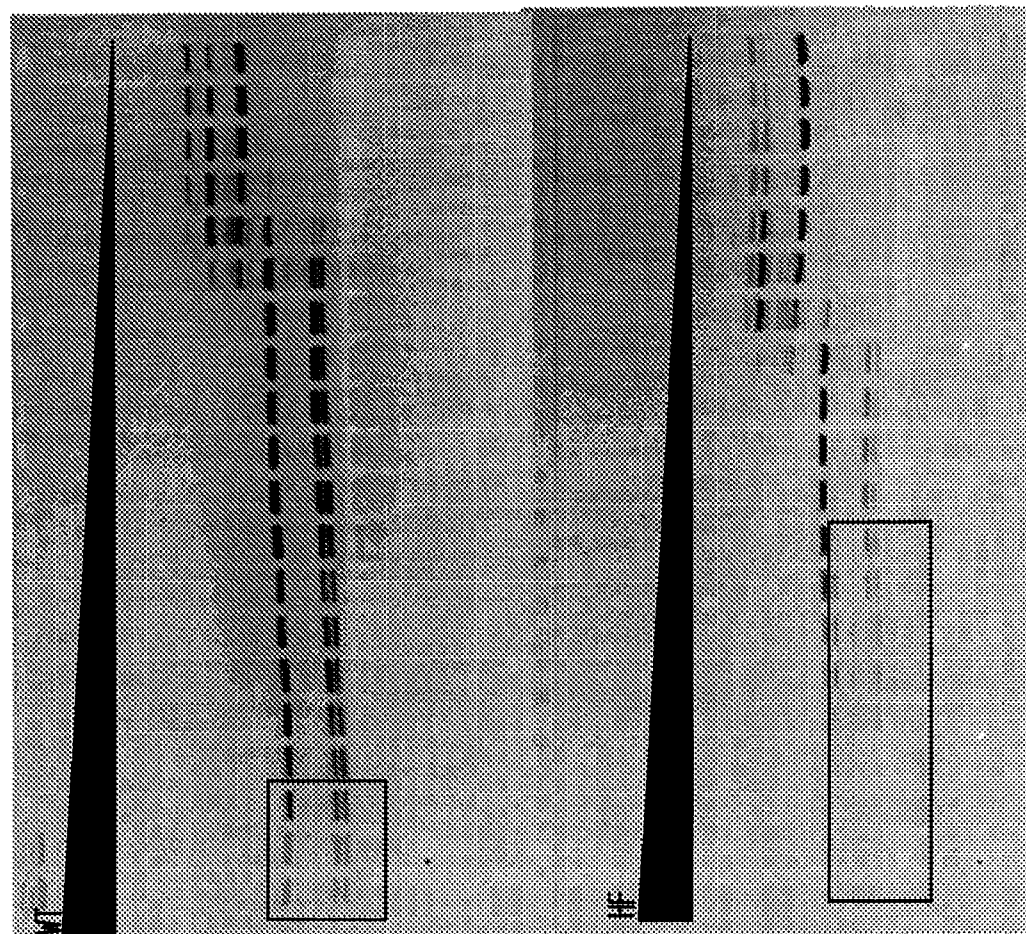


FIG. 15

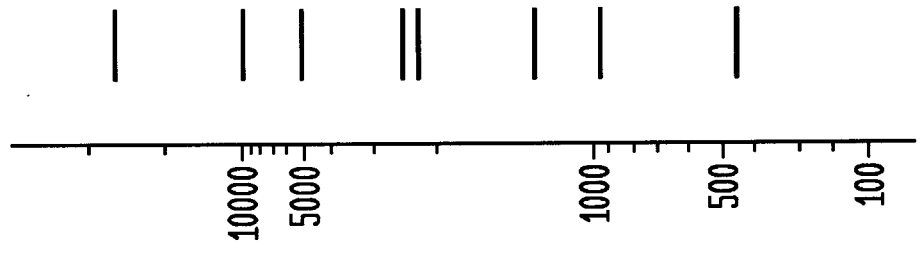
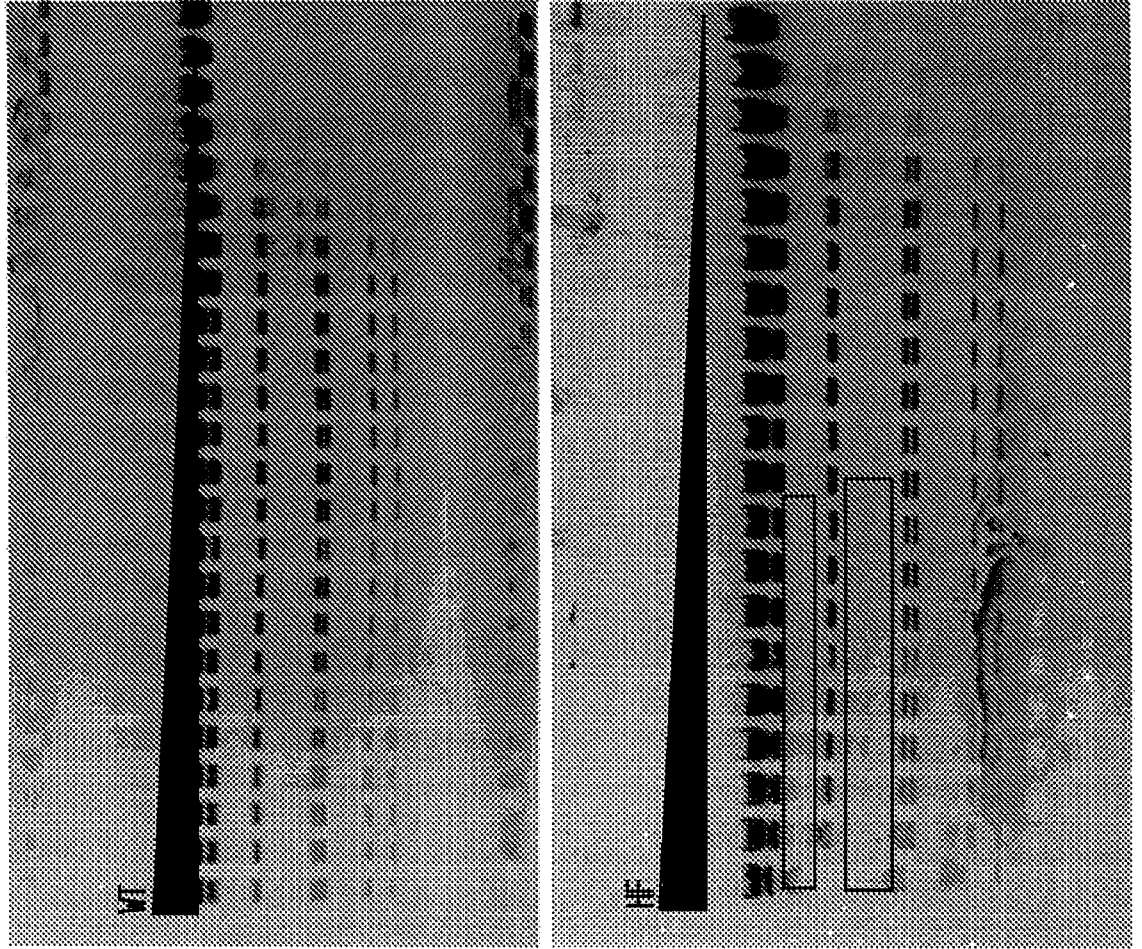


FIG. 16

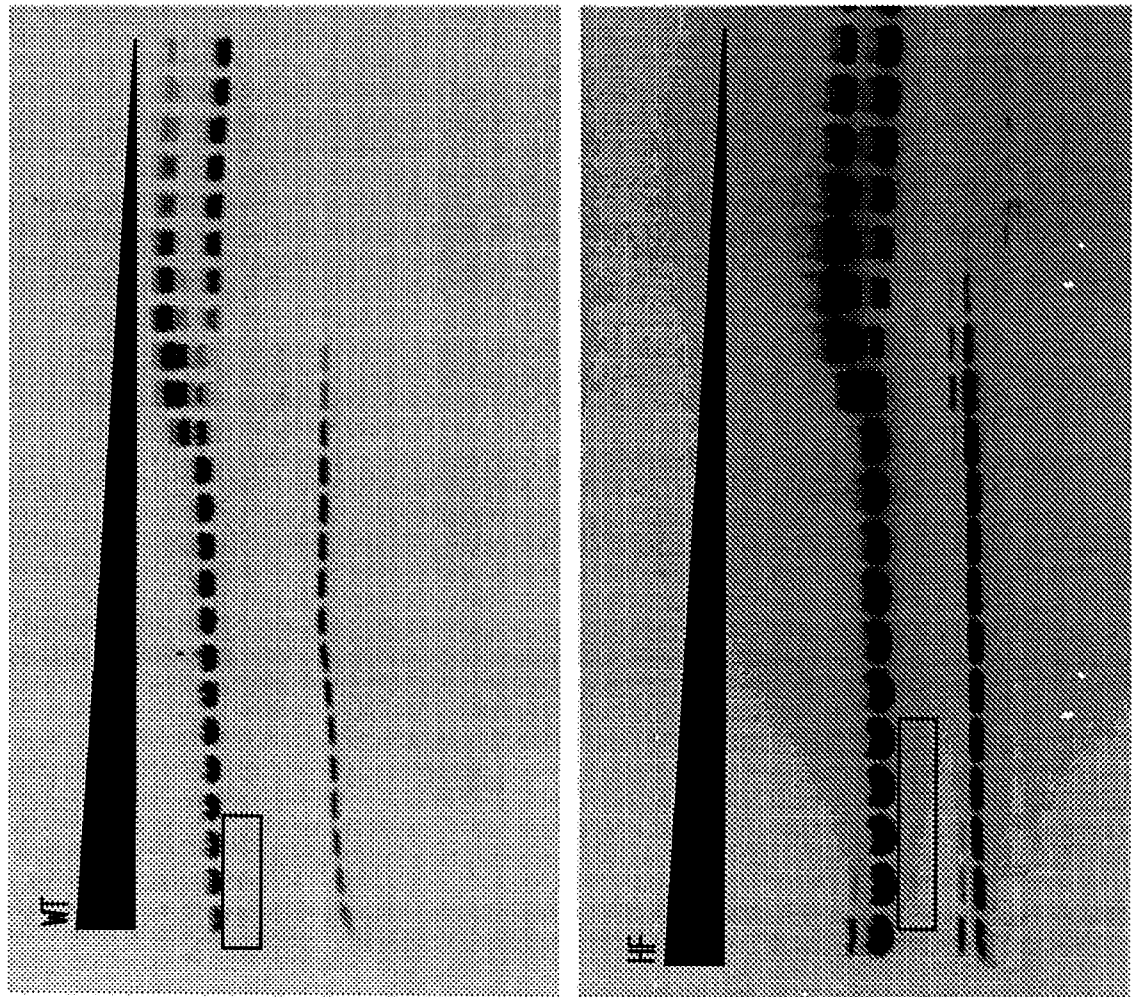


FIG. 17

