

- (11) Patent numeris: **6742** (51) Int. Cl. (2020.01): **C12Q 1/00**  
**C12N 15/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2018 542**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2018-10-10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-04-27**
- (45) Patent paskelbimo data: **2020-07-10**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:  
**Laurynas KARPUS, LT**  
**Ignas MAŽELIS, LT**  
**Irmantas ROKAITIS, LT**  
**Vykintas JAUNIŠKIS, LT**  
**Rolandas MEŠKYS, LT**
- (73) Patent savininkas:  
**Vilnius University, Universiteto g. 3, 01513 Vilnius, LT**  
**UAB "Biomatter Designs", Žirmūnų g. 139A, 09120 Vilnius, LT**
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras "Dvyniai",**  
**LT-03163 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:  
**Katalizinio biomolekulinio aktyvumo įrašymas į DNR seką**

- (57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su katalizinių biomolekulių charakterizacija ir mikroskysčiais. Išradimas gali būti panaudojamas nukleorūgščių, koduojančių aktyvias katalizines molekules, identifikavimui ir informacijos surinkimui apie kiekvienos katalizinės biomolekulės katalizinį aktyvumą. Išradimas taip pat gali būti naudojamas tirti įvairias genetinių reguliacinių sekų savybes, kurios gali moduluoti katalizinių biomolekulių biosintezę, įrašant tų savybių informaciją į atitinkamų biomolekulių DNR sekas, pasitelkiant mikroskysčių technologijas.

### Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su katalizinių biomolekulių charakterizavimu ir mikroskysčių technologijomis.

### Išradimo technikos lygis

Optimali vertingų cheminių medžiagų gamyba yra vienas iš svarbiausių taikomosios chemijos tikslų. Sintetinė biologija ir metabolinė inžinerija rodo didžiulį potencialą, įgalindama kompleksinių molekulių daugelio žingsnių sintezę, kuri nereikalauja tarpinių produktų gryninimo (Keasling 2012). Taip pat, tokiuose metaboliniuose keliuose naudojami biokatalizatoriai gali padidinti cheminės reakcijos greitį net 17 eilių, tuo pačiu metu išlaikydami puikų stereo-, chemo- ir regio-selektyvumą skystoje aplinkoje, švelniomis temperatūros ir slėgio sąlygomis (Shoda et al. 2016). Sintetiniai metaboliniai keliai remiasi dviem pagrindiniais faktoriais – tiksliai inžinerijos pagalba sukurtais fermentais kurie gali katalizuoti kiekvieną cheminės transformacijos žingsnį (Illanes et al. 2012) bei gerai charakterizuotomis genetinėmis reguliacinėmis sekomis, kurios gali valdyti tų fermentų sintezę taip sukuriant optimalų metabolinį kelią (Wessely et al. 2011).

Viena didžiausių dabartinių sintetinės biologijos ir metabolinės inžinerijos problemų yra ta, jog daugeliui svarbių cheminių reakcijų, optimalūs fermentai dar nėra atrasti ar sukurti. Aminorūgščių sekos su reikiama nauja ar patobulinta funkcija identifikavimas yra sudėtinga užduotis dėl itin didelės baltymų sekų erdvės. Baltymas sudarytas iš daugiau nei 300 aminorūgščių turi daugiau nei  $10^{390}$  skirtingų sekų variantų (Currin et al. 2015). Taip pat, funkcionuojančių sekų dalis šioje erdvėje gali būti itin maža ( $10^{-77}$ ). Mašininio mokymosi algoritmai teikia galimybę išspręsti šias sudėtingas sekos-funkcijos problemas, tačiau reikalauja itin didelio kiekio, geros kokybės, eksperimentiškai patikrintos, seką su funkcija susiejančios informacijos. Šiuo metu prieinami patikros ir selekcijos metodai gali dideliu našumu patikrinti didelį kiekį katalizinių biomolekulių (Xiao, Bao, ir Zhao 2015). Tačiau, specifinis biomolekulės aktyvumas gali būti priskirtas tai molekulės DNR sekai tik labai mažai patikrintų biomolekulių bibliotekos daliai.

Du geriausiai šiuo metu naudojamų metodų pavyzdžiai yra lašelių mikroskysčių (Autour ir Ryckelynck 2017) ir mikrogardelių (Böttcher et al. 2017) technologijos. Nors abi šios technologijos suteikia galimybę patikrinti biomolekulių

aktyvumą dideliu našumu (iki  $10^7$  individualių pamatavimų lašelių mikroskysčiuose ir  $10^{5-6}$  pamatavimų mikrogardelėmis vieno eksperimento metu), abi šios technologijos negali dideliu našumu priskirti aktyvumo signalo prie biomolekulės, iš kurios gautas signalas, sekos. Lašelių mikroskysčių technologijos yra paremtos biomolekulių inkapsuliacija į pikolitrus lašelius, kurie tuomet veikia, kaip mikrореакторiai. Šie lašeliai gali būti išrūšiuoti pagal jų signalą, kai jis pasiekia tam tikrą nustatytą ribą (Baret et al. 2009). Pagrindinis šio metodo minusas yra tas, jog informacija apie lašelių populiaciją turinčią biomolekules, kurios nesukūrė tam tikro signalo, yra prarandama. Taip pat, biomolekulės lašeliuose, kurios pateikė reikiamą signalą, yra surenkamos ir kartu nuskaitymos. Po tokios analizės yra neįmanoma dideliu našumu priskirti specifinių biomolekulių aktyvumų prie originalių biomolekulių sekų. Galiausiai, lašelių mikroskysčių technologijos yra dažniausiai apribotos naudoti fluorogeninius substratus. Tuo tarpu mikrogardelių metodai yra paprastai naudojami pasitelkiant robotines sistemas, kurios gali tikrinti individualius mikrošulinėlius, kuriuose yra patalpinamos biomolekulės, taip registruojant jų aktyvumą. Šios sistemos leidžia surinkti informaciją iš kiekvieno mikrošulinėlio ir kartu to aktyvumo lokaciją mikrogardelėje. Tačiau, šiuo metu yra itin brangu išskirti informaciją iš kiekvieno atskiro šulinėlio po pradinio aktyvumo skenavimo, siekiant susieti funkcinę ir sekos informaciją. Dėl šios priežasties yra didelis poreikis naujoms didelio našumo technologijoms, gebančioms greitai ir tiksliai surinkti informaciją apie biomolekulių sekos ir aktyvumo ryšį, siekiant pagreitinti baltymų ir metabolinių kelių inžineriją su mašininio mokymosi algoritmų pagalba.

#### Išradimo esmė

Šis išradimas yra susijęs su mikroskysčiais, modifikuotais nukleotidais ir biomolekulių aktyvumo ir sąveikos įrašymu. Pavyzdžiui, kai kurie išradimo aspektai yra susiję su sistemomis ir metodais skirtais katalizinių biomolekulių aktyvumo nustatymui, įrašant šią informaciją į tų pačių biomolekulių seką.

Viename išradimo pavyzdyje, genetinės informacijos nešikliai gali būti inkapsuliuoti į mikroskysčių lašelius. Inkapsuliacija yra atliekama siekiant atlikti skirtingas reakcijas atskirtuose kompartmentuose. Šie genetinės informacijos nešikliai gali būti pateikti DNR, RNR arba nukleorūgščių ląstelės viduje formoje ir gali savyje nešti informaciją, kurios pakanka pagaminti katalizinę biomolekulę.

Kitame išradimo pavyzdyje, genetinės informacijos nešikliai gali koduoti

genetines reguliacines sekas, kurios gali būti reikalingos katalizinės biomolekulės sintezei. Tam tikrais atvejais, skirtingos genetinės reguliacinės sekos gali daryti įtaką katalizinių biomolekulių koncentracijai arba aktyvumui lašelyje.

Kitame išradimo pavyzdyje, katalizinė biomolekulė gali būti peptidas, fermentinis baltymas arba RNR ribozimas galintis vykdyti biokatalizę.

Viename išradimo pavyzdyje, kartu su genetinės informacijos nešikliais, natūralūs arba chemiškai modifikuoti nukleotidai (substratiniai nukleotidai) gali būti inkapsuliuojami į mikroskysčių lašelius. Tam tikrais atvejais, šie substratiniai nukleotidai gali tarnauti, kaip substratai katalizinėms biomolekulėms. Pavyzdžiui, kai katalizinės biomolekulės yra gaminamos ar įdedamos į mikroskysčių lašelį kartu su substratiniais nukleotidais, katalizinės biomolekulės gali atpažinti šiuos substratinius nukleotidus ir katalizuoja cheminę nukleotidų konversiją.

Dar viename išradimo pavyzdyje, po to kai katalizinė biomolekulė atlieka cheminę konversiją bent keliems substratiniams nukleotidams kompartimente, nukleorūgščių sintezė arba padauginimas gali būti inicijuoti bent keliuose lašeliuose pasitelkiant polimerazę, nukleotidus, pradmenis ir buferinius tirpalus. Taip pat, papildomai gali būti naudojami atskaitiniai nukleotidai, kurie neveikia, kaip taikinyš katalizinėms biomolekulėms, tačiau padeda nustatyti chemiškai konvertuotų substratinių nukleotidų (modifikuotų substratinių nukleotidų) kiekį.

Svarbus šio išradimo aspektas yra, jog po cheminės substratinių nukleotidų konversijos, substratiniai ir/ar modifikuoti substratiniai ir/ar atskaitiniai nukleotidai gali būti inkorporuojami į naujai sintetinamą nukleorūgščių grandinę gaminamą polimerazės fermento. Tokiu būdu, nukleorūgščių sintezės ar amplifikacijos metu po katalizės reakcijos, tam tikras substratinių ir/ar modifikuotų substratinių ir/ar atskaitinių nukleotidų kiekis yra inkorporuojamas į naujai sintetinamas nukleorūgščių grandines ir tas kiekis gali atspindėti katalizinės biomolekulės aktyvumą lašelyje. Tam tikrais atvejais, amplifikacijos matrica ar nukleorūgščių sintezė gali būti ta pati DNR matrica, kuri buvo panaudota katalizinės biomolekulės gamybai lašelyje. Tam tikruose išradimo pavyzdžiuose, matrica amplifikacijai ar nukleorūgščių sintezei gali būti ta pati molekulė koduojanti katalizinę ribozimo biomolekulę, tame pačiame lašelyje.

Viename išradimo pavyzdyje, padauginti nukleorūgščių fragmentai

mikroskysčių lašelyje gali turėti specifinį substratinių ir/ar modifikuotų substratinių ir/ar atskaitinių nukleotidų santykį atspindintį tame lašelyje susintetintos katalizinės biomolekulės aktyvumą. Šie nukleorūgščių fragmentai gali būti nuskaitymi naudojantis pavienių molekulių sekoskaitos metodais ir tokiu būdu gaunama informacija apie specifinių katalizinių biomolekulių ir jas supančių genetinių reguliatorių sekas. Taip pat, substratiniai ir/ar modifikuoti substratiniai ir/ar referentiniai nukleotidai gali taip pat būti identifikuojami atlikus nukleorūgščių fragmentų sekoskaitą pasitelkiant pavienių molekulių sekoskaitos metodus. Kiekinė skirtingų nukleotidų tipų informacija gaunama iš sekoskaitos gali būti susieta su specifiniu katalizinės biomolekulės aktyvumu tam tikrame lašelyje. Tokiu būdu, katalizinis aktyvumas gali būti įrašytas milijardus atitinkamų skirtingų katalizinių biomolekulių DNR sekų. Šią informaciją galima koreliuoti su santykiniu kataliziniu aktyvumu kiekvienai katalizinei biomolekulei tiriamoje biomolekulių bibliotekoje. Toks metodas gali būti greitai ir efektyviai išplėstas charakterizuoti milijardus katalizinių biomolekulių iš esmės nepakeičiant aprašyto metodo eksperimento trukmės.

#### Brėžinių/paveikslų aprašymas

Neribojantys išradimo pavyzdžiai bus apibūdinami su nuorodomis į susijusius paveikslus, kurie yra schematiški ir neatitinka realių išmatavimų ar mastelių. Paveiksluose, kiekvienas identiškas ar beveik identiškas iliustruotas komponentas yra reprezentuojamas vieno skaičiaus. Dėl aiškumo, ne kiekvienas komponentas yra pažymėtas kiekviename paveiksle ar kiekvienas išradimo komponentas vaizduojamas kiekvienam pavyzdžiui.

1 Pav. iliustruoja struktūrinę schemą vienam išradimo pavyzdžiui;

2 Pav. iliustruoja struktūrinę schemą dar vienam išradimo pavyzdžiui;

3 Pav. iliustruoja struktūrinę schemą skirtą katalizinių biomolekulių mutantų bibliotekos paruošimui naudojamą tam tikruose išradimo pavyzdžiuose;

4 Pav. iliustruoja struktūrinę schemą skirtą genetinių reguliacinių sekų bibliotekos paruošimui naudojamą tam tikruose išradimo pavyzdžiuose.

5 Pav. iliustruoja diagramą su vieno išradimo pavyzdžio rezultatais.

### Detalus išradimo aprašymas

Šiame skyriuje bus pateikiamos detalios nuorodos į išradimo pavyzdžius. Nors išradimas bus apibūdinamas naudojant pasirinktus pavyzdžius, šie pavyzdžiai nėra skirti apriboti išradimo šių pavyzdžių rėmuose. Šis išradimas padengia ir alternatyvas, modifikacijas ar ekvivalentus, kurie gali būti įtraukti į išradimo apimtį.

Šiame išradimo atskleidime, įvairūs išradimo aspektai gali būti pristatomi plačia forma. Reikėtų suprasti, jog plačios formos apibrėžimas buvo taikytas dėl patogumo ir neturėtų būti laikomas, kaip ribojantis faktorius išradimui.

### Apibrėžimai

Tam, kad geriau būtų suprantamas išradimas, keletas terminų yra apibrėžti žemiau.

Visi naudojami techniniai ir moksliniai terminai turi tokią pačią reikšmę kokia juos naudoja žmogus su atitinkama technine patirtimi, nebent nurodyta kitaip. Nors bet kokie metodai ir medžiagos panašūs ar ekvivalentūs į aprašytus gali būti naudojami praktikoje, čia aprašyti pavyzdiniai metodai ir medžiagos.

Terminai „nukleorūgštis“ ir „oligonukleotidas“ reiškia polideoksiribonukleotidus (turinčius 2'-deoksi-D-ribozę), poliribonukleotidus (turinčius D-ribozę) ir bet kokį kitą polinukleotidų tipą, kuris yra purino ar pirimidino bazių N glikozidas. Nėra jokios nusakytos ilgio atskirties tarp terminų „nukleorūgštis“, „oligonukleotidas“ ir „polinukleotidas“ ir šie terminai bus naudojami, kaip pakaitas vienas kitam. Šie terminai kalba tik apie pirminę molekulės struktūrą. Į šiuos terminus įeina dvigrandė, viengrandė DNR ir dvigrandė, viengrandė RNR. Terminas „oligonukleotidas“ taip pat apima nukleotidų analogus, kuriuose bazė, cukrus ar fosfatas yra modifikuoti, taip pat ne purinų ir ne pirimidinų analogai.

Toliau naudojamas terminas „promotorius“ yra cis-veikianti DNR seka, kuri nukreipia RNR polimerazę ir kitus trans-veikiančius transkripcijos faktorius į RNR transkripcijos iniciaciją nuo DNR matricos, kuri turi tą cis-veikiančią DNR seką.

Toliau naudojamas terminas „genetinės informacijos nešiklis“ yra biomolekulė savyje turinti informaciją reikalingą katalizinės biomolekulės sintezei. Ši biomolekulė gali egzistuoti izoliuotoje formoje *in vitro* arba ląstelėje, jei naudojama mutagenizuota ląstelių biblioteka.

Toliau naudojamas terminas „slopinantis baltymas“ arba „slopiklis“ yra baltymas, kuris gali prisijungti prie DNR ar RNR operatoriaus ir slopinti transkripciją ar transliaciją, atitinkamai.

Toliau naudojamas terminas „operatorius“ yra DNR lokacija, prie kurios gali prisijungti slopinantis baltymas, šalia esančio promotoriaus transkripcijos iniciacijos slopinimui.

Toliau naudojamas terminas „transkripcijos terminatoriaus seka“ arba „terminatorius“ yra signalas DNR sekoje, kurio funkcija yra RNR sintezės sustabdymas tam tikrame DNR matricos taške. Transkripcijos terminatorius gali būti priklausomas arba nepriklausomas nuo Rho faktoriaus. Vienas iš terminatoriaus sekos pavyzdžių yra T7 terminatorius. Transkripcijos terminatoriai yra gerai žinomi ir gali būti išskirti iš komerciškai prieinamų vektorių pasitelkiant rekombinantinius metodus.

Toliau naudojamas terminas „aktyvacija“ yra transkripcijos ar translacijos sustiprinimas aktyvacijos baltymui prisijungiant prie specifinės DNR arba informacinės RNR srities. Aktyvacija turėtų pasižymėti bent 1,5 kartiniu transkripcijos ar translacijos lygio padidėjimu.

Toliau naudojamas terminas „klaidas daranti PGR“ yra PGR reakcija su reakcijos sąlygomis, kurios yra palankios klaidingų nukleotidų inkorporavimui, pavyzdžiui tais atvejais, kada siekiama gauti atsitiktinius mutantus.

Toliau naudojamas terminas „ribozimas“ yra RNR molekulė su kataliziniu aktyvumu.

Toliau naudojamas terminas „ribojungiklis“ yra cis-reguliacinis RNR elementas reguliuojantis genų ekspresiją, kaip atsakas į specifinę ligando molekulę.

Toliau naudojamas terminas „katalizinė biomolekulė“ yra bet kokia biomolekulė, kuri katalizuoja specifinę cheminę arba biocheminę reakciją. Katalizinė biomolekulė gali būti fermentas, ribozimas arba deoksiribozimas. Išradimo apimtyje katalizinė biomolekulė katalizuoja substratinio nukleotido cheminę konversiją.

Toliau naudojamas terminas „nukleorūgštis koduojanti katalizinė biomolekulė“ yra bet koks nukleorūgšties biopolimeras koduojantis informaciją reikalingą katalizinės biomolekulės sintezei ar gamybai.

Toliau naudojamas terminas „ribosomos prisijungimo sritis“ yra nukleotidų seka prie informacinės RNR molekulės 5' galo reikalinga mažajam ribosominiam subvienetui prisijungti prie iRNR.

Toliau naudojamas terminas „nukleorūgšties sintezės reakcija“ yra bet kokia cheminė reakcija, taip pat ir fermentinė reakcija, kurios rezultatas yra nukleorūgšties matricos kopijų skaičiaus padidėjimas arba matricinės nukleorūgšties transkripcija. Į nukleorūgščių sintezės reakcijas įeina padauginimo reakcijos, tokios kaip atvirkštinė transkripcija, polimerazės grandininė reakcija (PGR), realaus laiko PGR. Dviejų žingsnių PGR ciklai turi aukštos temperatūros denatūracijos žingsnį, kurį seka hibridizacijos/ilginimo (arba ligavimo) žingsnis. Trijų žingsnių ciklai turi denatūracijos žingsnį, kurį seka hibridizacijos žingsnis, kurį taip pat seka ilginimo žingsnis. Taip pat egzistuoja vieno žingsnio padauginimo reakcijos, kurios atliekamos pastovioje temperatūroje.

Toliau naudojamas terminas „polimerazė“ yra fermentas katalizuojantis nukleotidų polimerizaciją. „DNR polimerazė“ katalizuoja deoksiribonukleotidų polimerizaciją. Žinomoms polimerazėms priklauso *Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNR polimerazė, *E. coli* DNR polimerazė I, T7 DNR polimerazė ir *Thermus aquaticus* (Taq) DNR polimerazėm *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNR polimerazės didysis fragmentas, *Bacillus subtilis* (Bsu) DNR polimerazės didysis fragmentas, bakteriofago Φ29 (phi29) DNR polimerazė ir kitos. „RNR polimerazė“ katalizuoja ribonukleotidų polimerizaciją. Iki šiol išvardinti DNR polimerazių pavyzdžiai yra taip pat nuo DNR priklausomos DNR polimerazės. Nuo RNR priklausomos DNR polimerazės taip pat priklauso nuo DNR priklausomom DNR polimerazėms, pavyzdžiui atvirkštinės transkriptazės. Žinomi RNR polimerazių pavyzdžiai yra T3 RNR polimerazė, T7 RNR polimerazė, SP6 RNR polimerazė, *E. coli* RNR polimerazė ir kitos. Jos taip pat vadinamos nuo DNR priklausomomis RNR polimerazėmis.

Toliau naudojamas terminas „reakcijos mišinys“ yra tirpalas turintis reagentus reikalingus vykdyti tam tikrai cheminei reakcijai. „Nukleorūgščių sintezės reakcijos mišinys“ yra tirpalas turintis reagentus reikalingus vykdyti nukleorūgščių sintezės reakcijai, paprastai turintis oligonukleotidinius pradmenis ir DNR polimerazę tinkame buferiniame tirpale. Reakcijos mišinys vadinamas pilnu jei jis turi visus reikalingus reagentus vykdyti reakciją, ir nepilnas jei turi tik tam tikrus reakcijos komponentus.

Toliau naudojamas terminas „lašelių praturtinimas“ yra papildomų cheminių



reagentų pridėjimas į jau suformuotus mikroskysčių lašelius.

Toliau naudojamas terminas „substratinis nukleotidas“ yra deoksiribonukleotido trifosfatas arba ribonukleotido trifosfatas, kuris gali būti panaudotas katalizinės biomolekulės, kaip substratas. Substratinis nukleotidas gali turėti arba neturėti papildomas chemines modifikacijas. Pavyzdžiui, tokios modifikacijos gali būti pridėtos prie nukleotidų per įvairias jungiamąsias grupes.

Toliau naudojamas terminas „modifikuotas substratinis nukleotidas“ yra katalizinės biomolekulės chemiškai konvertuotas substratinis nukleotidas.

Toliau naudojamas terminas „atskaitinis nukleotidas“ yra deoksiribonukleotido trifosfatas arba ribonukleotido trifosfatas, kuris nėra tinkamas, kaip substratas, katalizinei biomolekulei ir yra skirtingas nuo substratinio ir modifikuoto substratinio nukleotidų.

Kai kuriuose išradimo pavyzdžiuose, kompartmentai gali būti lašeliai, tokie kaip mikroskysčių lašeliai. Pavyzdžiai, kaip gali būti įgyvendinama dalelių inkapsuliacija į mikroskysčių lašelius, gali būti randami JAV patentuose 7,708,949; 8,337,778; 8,765,485 arba tarptautiniuose patentuose WO 2004/091763 ir WO 2006/096571. Kai kuriais atvejais, dalelės gali būti inkapsuliuojamos tankiu mažesniu nei 1 dalelė per lašelį tam kad dauguma lašelių turėtų tik nulį arba vieną dalelę. Lašelio tūris ir/ar vidutinis lašelių tūris emulsijoje gali, pavyzdžiui, būti mažesnis nei vienas mikrolitras (arba nuo vieno mikrolitro iki vieno nanolitro arba vieno mikrolitro ir vieno pikolitro), mažesnis nei vienas nanolitras (arba tarp vieno nanolitro ir vieno pikolitro), arba mažesnis nei vienas pikolitras (arba tarp vieno pikolitro ir vieno femtolitro) ir kita. Lašelis gali būti sferinis arba nesferinis. Lašelis gali būti paprastas lašelis arba sudėtinis lašelis. Terminas „emulsija“ yra nesimaišančių skysčių mišinys (kaip alyva ir vanduo). Alyvos fazės ir/arba vandens-alyvoje emulsijos įgalina reakcijos mišinio kompartmentalizaciją vandens lašeliuose. Emulsijos gali susidaryti iš vandens lašelių alyvos fazėje. Emulsijos taip pat gali būti alyvos vandenyje emulsija, kur lašeliai yra alyvos lašeliai vandens fazėje.

#### *Katalizinių biomolekulių aktyvumo įrašymas*

Šis išradimas yra susijęs su mikroskysčiais, modifikuotais nukleotidais ir biomolekulių aktyvumų ir sąveikų įrašymu.

Tam tikri išradimo aspektai yra susiję su sistemomis ir metodais skirtais

katalizinės biomolekulės aktyvumo nustatymui, įrašant tą informaciją į DNR seką koduojančią tą katalizinę biomolekulę pasitelkiant mikroskysčių technologijas. Viena išradimo pavyzdys, genetiniai informacijos nešikliai gali būti inkapsuliuojami į mikroskysčių lašelius ar kitus kompartmentus, pavyzdžiui, mikrošulinėlius mikroplokštelėje, individualius taškus ant stikliuko ar kito paviršiaus, ar kita. Šie genetinės informacijos nešikliai gali būti pateikti DNR, RNR ar ląstelių forma ir gali turėti pakankamai informacijos katalizinės biomolekulės gamybai. Nukleorūgštys gali kilti iš sulizuotų ląstelių ar kitos medžiagos lašelių viduje.

Pavyzdžiui, jeigu DNR formos genetinės informacijos nešikliai yra inkapsuliuojami į mikroskysčių lašelius, beląstelinės baltymų sintezės reagentai gali būti pridedami į tą lašelį katalizinės biomolekulės sintezei. Kitame pavyzdyje, jeigu ląstelės yra genetinės informacijos nešikliai ir yra inkapsuliuojamos į mikroskysčių lašelius, gali būti pridedami lizės reagentai siekiant sulizuoti ląsteles. Ląstelės sulizotos lašeliuose gali išlaisvinti katalizinės biomolekulės DNR matricą ir/ar susintetintą katalizinę biomolekulę.

Viena išradimo pavyzdys, katalizinė biomolekulė koduojama genetinės informacijos nešiklių gali būti DNR, RNR ar baltymo molekulės. Tais atvejais, kada katalizinė biomolekulė yra katalizinė DNR, baltymų ekspresija gali būti nereikalinga, nes tuo atveju DNR pati yra katalizinė biomolekulė. Kai kuriais atvejais, RNR katalizinė biomolekulė arba ribozimas gali būti gaminama pasitelkiant *in vitro* transkripcijos reagentus.

Kitame išradimo pavyzdyje, genetinės informacijos nešikliai gali taip pat koduoti reguliatorines sekas reikalingas katalizinės biomolekulės sintezei naudojant tą genetinės informacijos nešiklį. Tam tikrais atvejais, skirtingus genetinės reguliatorinės sekos gali daryti įtaką pagamintos katalizinės biomolekulės koncentracijai arba aktyvumui lašelyje. Šios reguliacinės sekos gali būti ribosomos prisijungimo sritis, promotoriaus seka, ribozimas, ribojungiklis, transkripcijos stipriklis, operatorius, slopiklio prisijungimo vieta, DNR prisijungimo vieta, terminatorius, slopiklį koduojantis genas, aktyvatorių koduojantis genas.

Viena išradimo pavyzdys, kartu su genetinės informacijos nešikliais į lašelius gali būti inkapsuliuojami nukleotidai. Pavyzdžiui, šie nukleotidai gali būti deoksiribonukleozidų arba ribonukleozidų trifosfatai. Kitame pavyzdyje, šie nukleotidai gali būti natūraliai aptinkami nukleotidai arba chemiškai modifikuoti

nukleotidai.

Viename išradimo pavyzdyje, nukleotidai naudojami tokioje sistemoje gali susidaryti iš vieno purino (pvz., adenino, guanino, hipoksantino ar kitų variacijų) ar pirimidino (pvz., citozino, timino, uracilo ar kitų variacijų) nukleobazių ir trifosfato. Modifikuoti nukleotidai gali turėti papildomas chemines grupes, kurių nėra natūraliuose nukleotiduose (pvz., adenozone, guanozone, citidine, timidine, uridine). Pavyzdžiui, viena ar daugiau cheminių grupių nukleotide gali būti prijungtos prie bazės, cukraus ar fosfato. Kita vertus, viena ar daugiau cheminių grupių gali būti pakeistos kita ar daugiau grupėmis nukleotide. Taip pat, nukleotide vienas ar daugiau atomų gali būti pakeisti vienu ar daugiau kitais atomais. Modifikuotas nukleotidas taip pat gali būti molekulė primenanti natūralų nukleotidą. Bet kuri ant cukraus esanti hidroksilo grupė nukleotide gali būti pakeista fosfato grupe arba apsaugančiomis grupėmis, ar pakeista amino grupėmis ar kitomis funkcinėmis organinėmis grupėmis. Nukleotidai gali taip pat turėti analogines ribozės arba deoksiribozės cukrų formas, pavyzdžiui 2'(3')-O-metil-, 2'(3')-O-alil-, 2'(3')-O-etil-, 2'(3')-O-propil-, 2'(3')-metoksietil-, 2'(3')-fluoro- pentozės,  $\alpha$ -anomeriniai cukrūs, kitos aldopentozės (i.e., arabinozės, ksilozės, liksozės), piranozės, acikliniai analogai. Taip pat, cukrūs ribozė arba deoksiribozė gali turėti nuimamą, kovalentiškai prijungtą 3'-OH blokuojančią grupę, taip kad 3' anglies atomas turi prijungtą grupę su struktūra –O-R-, kur R yra bet koks alkilas, arilalkilas, alkenilas, alkinilas, arilas, heteroarilas, acilas ir acil, ciano, alkoksi, ariloksi, heteroariloksi ar amido grupės. Tam tikruose pavyzdžiuose, nukleotidas gali susidėti bent iš vienos bazės pasirinktos iš 5-metilcitozino, 5-aza-citozino, N4-acetilcitozino, N4-benzoilcitozino, 5-formilcitozino, N4-metilcitozino, 5-hidroksimetilcitozino, 2-tio-citozino, 2-tio-5-metil-citozino, 5-metoksiuracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, N6-metiladenino, N6-izopenteniladenino, N6-(cis-hidroksiizopentenil)adenino, N6-glicinilkarbamoiladenino, N6-treonilkarbamoiladenino, N2-metilguanino. Kai kuriais atvejais, nukleotidas gali turėti citozino bazę, prie kurios kovalentiškai prijungta grupė, taip kad N4 atomas turi prijungtą grupės –N-R struktūrą, kur R gali būti acil, pakeista acil, alkil, pakeista alkil, arilalkil, alkenil, alkinil, aril, heteroaril, heterociklinės acil, ciano, alkoksi, ariloksi, heteroariloksi, ar amido grupės. Kai kuriais atvejais, nukleotidas gali turėti citozino bazę, prie kurios kovalentiškai prijungta grupė, taip kad C5 atomas turi prijungtą grupės –C-R struktūrą, kur R gali būti acil, pakeista acil, alkil, pakeista alkil, arilalkil,

alkenil, alkinil, aril, heteroaril, heterociklinės acil, ciano, alkoksi, ariloksi, heteroariloksi, ar amido grupės. Kai kuriais atvejais, nukleotidas gali turėti uracilo bazę prie kurios kovalentiškai prijungta grupė, taip kad C5 atomas turi prijungtą grupės –C-R struktūrą, kur R gali būti acil, pakeista acil, alkil, pakeista alkil, arilalkil, alkenil, alkinil, aril, heteroaril, heterociklinės acil, ciano, alkoksi, ariloksi, heteroariloksi, ar amido grupės.

Viename išradimo pavyzdyje, substratiniai nukleotidai gali veikti, kaip substratai, katalizinėms biomolekulėms. Jie gali būti modifikuoti ir/ar nemodifikuoti. Pavyzdžiui, pagaminus ar įvedus katalizines biomolekules į mikroskysčių lašelį, jei lašelyje taip pat yra nukleotidai su specifine chemine modifikacija, katalizinė molekulė gali atpažinti šį junginį, kaip substratą ir katalizuoti cheminę konversiją. Kitame pavyzdyje, tokia katalizuojama cheminė konversija gali būti transformacija iš nemodifikuotų nukleotidų į modifikuotus nukleotidus, transformacija iš modifikuotų nukleotidų į nemodifikuotus nukleotidus, cheminė konversija, kuri modifikuoja jau modifikuotus nukleotidus ar kita. Kitame pavyzdyje, tokia cheminė konversija gali būti oksidoredukcija, cheminės grupės perkėlimas, hidrolizė, ryšio suardymas ne hidrolizės ar oksidacijos būdais, pakeitimai vienoje molekulėje, dviejų molekulių sujungimas kartu su ATP molekulės fosfodiesterinio ryšio hidrolize.

Dar viename išradimo pavyzdyje, kai katalizinė biomolekulė atlieka substratinio nukleotido cheminę konversiją, nukleorūgščių sintezė gali būti inicijuota bent kai kuriuose lašeliuose. Tam tikrais atvejais, ši sintezė gali būti naudojama konvertuotų ir/ar nekonvertuotų nukleotidų kiekio nustatymui inkorporuojant šiuos nukleotidus į DNR molekulę vykstant nukleotūgštės sintezei. Kai kuriais atvejais nukleorūgštės sintezės reagentai gali būti inkapsuliuojami į lašelius kartu su genetinės informacijos nešikliais. Kitais atvejais, nukleorūgščių sintezės reagentai gali būti pridėti į lašelius vėlesniuose žingsniuose. Pavyzdžiui, toks pridėjimas gali būti pasiektas lašelių suliejimo technikomis, kur lašeliai su nukleorūgščių sintezės reagentais yra sujungiami su lašeliais, kurie gali turėti genetinės informacijos nešiklius, nukleotidus ir kita. Kai kuriais atvejais, nukleorūgščių sintezės matrica gali būti ta pati DNR matrica kuri buvo naudota katalizinės biomolekulės sintezei lašelyje.

Viename išradimo pavyzdyje, padaugintos DNR fragmentai lašelyje gali turėti specifinius atskaitinių ir modifikuotų substratinių nukleotidų kiekius. Tam tikrais atvejais gali būti atlikta šių fragmentų sekoskaita ir atgaunama informacija apie

katalizinių biomolekulių ir jas supančių genetinių reguliatorių sekas. Taip pat, kai kuriais atvejais, sekoskaitos metu taip pat gali būti fiksuojami substratiniai, modifikuoti substratiniai ir referentiniai nukleotidai. Pavyzdžiui, tai gali būti pasiekta naudojant nanoporos sekoskaitą, bisulfitinę sekoskaitą, PacBio sekoskaitą ar kitą. Kai kuriais atvejais, informacija apie chemiškai konvertuotus nukleotidus gali būti koreliuojama su specifiniais biomolekulių aktyvumais. Pavyzdžiui, viename lašelyje esantis specifinės katalizinės biomolekulės mutantas gali katalizuoti visų substratinių nukleotidų cheminę konversiją, o kitame lašelyje, kitoks katalizinės biomolekulės mutantas gali katalizuoti tik kelių substratinių nukleotidų cheminę konversiją. Ankstesniame pavyzdyje, pirmoji katalizinė biomolekulė galėtų turėti stipresnį katalizinį aktyvumą nei antroji. Tokiu būdu, milijardai skirtingų katalizinių biomolekulių aktyvumų gali būti įrašyti į atitinkamų katalizinių biomolekulių DNR sekas. Atgaunant šią informaciją, kiekvienai biomolekulės sekai galima priskirti jos santykinį aktyvumą eksperimente.

Dar viename išradimo pavyzdyje, substratinis nukleotidas gali būti inkorporuojamas į DNR vykstant nukleorūgščių sintezei. Tam tikrais atvejais, jei substratinis nukleotidas yra chemiškai konvertuojamas į modifikuotą substratinį nukleotidą, jis taip pat gali būti inkorporuojamas į DNR vykstant nukleorūgščių sintezei. Tais atvejais, katalizinės biomolekulės aktyvumas ir/ar kiekis gali būti nustatyti palyginant substratinio ir atskaitinio nukleotidų kiekis padaugintame DNR fragmente.

Dar viename išradimo pavyzdyje, substratinis nukleotidas gali būti inkorporuojamas į DNR vykstant nukleorūgščių sintezei. Tam tikrais atvejais, jei substratinis nukleotidas yra paverčiamas į modifikuotą substratinį nukleotidą, jis negali būti įjungtas į DNR vykstant sintezei. Tokiais atvejais, biomolekulės aktyvumas ir/ar kiekis gali būti nustatytas palyginant substratinio ir atskaitinio nukleotidų kiekius padaugintame DNR fragmente.

1 paveiksle yra pateiktas vieno išradimo aspekto pavyzdys. Tačiau, turėtų būti suprasta, jog tai yra tik pavyzdys. Nelimituojančiame 1 paveikslo pavyzdyje, DNR formos genetinių informacijos nešiklių populiacija (10), koduoja skirtingus analizuojamos katalizinės biomolekulės mutantus (11,12,13...). Pavyzdžiui, tokia užkoduota katalizinė biomolekulė gali būti baltymas, DNR, RNR ar kitos molekulės. Nors šiame pavyzdyje naudojamos grynintos DNR matricos, kaip nukleorūgščių

šaltinis, kituose pavyzdžiuose nukleorūgštys gali būti pateikiamos į lašelius naudojant kitus šaltinius ar naudojant kitas technikas. Pavyzdžiui, genetinės informacijos nešikliai gali būti inkapsuliuojami RNR arba ląstelių forma.

DNR matricos gali būti inkapsuliuojamos į seriją mikroskysčių lašelių (30). Tam tikrais atvejais, DNR molekulės (ar genetinės informacijos nešikliai bendrai) gali būti inkapsuliuojami tankiu ne didesniu nei 1 molekulė per lašelį, tam kad užtikrinti, jog dauguma ar visi lašeliai savyje turi nulį ar tik vieną molekulę. Taigi, kaip parodyta 1 paveiksle, kiekvienas lašelis (31, 32, 33, 34...) savyje turi arba nė vienos arba vieną molekulę.

Kartu su genetinės informacijos nešikliais į lašelius gali būti inkapsuliuojami reagentai beląstelinei baltymo sintezei, substratiniai nukleotidai (20). Tam tikrais atvejais, beląsteliniai baltymų ekspresijos reagentai gali būti nereikalingi. Pavyzdžiui, naudojant ląsteles, kaip genetinės informacijos nešiklius – tokiais atvejais taip pat inkapsuliuojami ir ląstelių lizės reagentai kartu su ląstelėmis, kurios jau turi specifinę katalizinę biomolekulę savo viduje. Substratiniai nukleotidai (20) gali būti, pavyzdžiui, modifikuoti deoksiribonukleotidų trifosfatai – dATP ir/ar dCTP ir/ar dGTP ir/ar dTTP. Substratiniai nukleotidai gali būti inkapsuliuojami kartu su DNR matricą vienu metu, ar vieni po kitų, bet kokia tinkama tvarka. Viena iš išradimo pavyzdžių, dNTP modifikacijos gali būti parenkamos pagal norimą katalizinės biomolekulės reakcijos aktyvumą ir jos substratą, kuris ir gali būti minėta modifikacija.

Tam tikrais atvejais, gali būti naudojami keturi skirtingi substratiniai nukleotidai. Tokiais atvejais keturi skirtingi substratiniai nukleotidai gali būti dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Taip pat, tuomet gali būti naudojami ir keturi skirtingi atskaitiniai nukleotidai. Priklausomai nuo skirtingų situacijų, gali būti naudojamos įvairios unikalių substratinių ir atskaitinių nukleotidų kombinacijos ir kiekiai.

Lašeliai tuomet gali būti inkubuojami, tam kad būtų gaminamos katalizinės biomolekulės su prieš tai kartu inkapsuliuotais beląsteliniais baltymo ekspresijos reagentais. Susintetintos biomolekulės gali turėti (40, 41) arba neturėti (42) katalizinį aktyvumą reikalingą katalizuoti substratinių nukleotidų cheminę konversiją. Šiame pavyzdyje, cheminė konversija gali būti cheminės modifikacijos pašalinimas nuo substratinių nukleotidų. Tam tikrais atvejais, skirtingi katalizinių biomolekulių variantai gali turėti skirtingus aktyvumus substratiniais nukleotidams (20).

1 paveiksle, specifinis katalizinės biomolekulės mutantas (40) gali pašalinti modifikacijas nuo didelio kiekio substratinių nukleotidų (21), kitas mutantas (41) gali pašalinti mažesnius kiekius modifikacijų nuo substratinių nukleotidų (22), o paskutinis mutantas (42) gali nepašalinti modifikacijų nuo substratinių nukleotidų. Tam tikrais atvejais, substratinių nukleotidų kiekis, nuo kurių buvo nuimta modifikacija gali būti biomolekulės aktyvumo nustatymo pagrindas. Pavyzdžiui, lašelis, kuriame buvo pagaminta katalizinė biomolekulė (40), modifikacija buvo nuimta nuo didelio kiekio substratinių nukleotidų, biomolekulė gali turėti aukštesnį aktyvumą, lyginant su kitu lašeliu su skirtinga biomolekule (41), kuri pašalina mažą kiekį modifikacijų nuo substratinių nukleotidų.

Tam tikrais atvejais, lašeliai gali būti praturtinami papildomas reagentais – DNR amplifikacijos mišiniu ir atskaitiniais nukleotidais (50), kurie gali turėti cheminę modifikaciją. Atskaitiniai nukleotidai gali būti naudojami nustatyti modifikuotų substratinių nukleotidų ir/ar substratinių nukleotidų kiekius. Lašelių praturtinimas gali būti pasiektas, pavyzdžiui, pasitelkiant lašelių suliejimo technikas. Tam tikrais atvejais atskaitiniai nukleotidai (60) gali būti specifiškai pasirenkami taip, kad DNR polimerazės galėtų juos inkorporuoti vykstant nukleorūgščių sintezės reakcijai. Tam tikrais atvejais, po lašelių praturtinimo, katalizinės biomolekulės DNR matricos (10, 11, 12...) gali būti padauginamos naudojant polimerazės mišinį (40).

Viename išradimo pavyzdyje, vykstant nukleorūgščių matricų amplifikacijai, atskaitiniai nukleotidai (50) ir modifikuoti substratiniai nukleotidai (21) yra inkorporuojami į sintetinamus DNR fragmentus (70, 71, 72). Šiame pavyzdyje, DNR polimerazė negali inkorporuoti substratinių nukleotidų į sintetinamą DNR grandinę. Kitais atvejais, DNR polimerazė gali inkorporuoti substratinius nukleotidus į sintetinamą DNR grandinę.

Tam tikrais atvejais, amplifikacijos reakcija gali būti izoterminė daugybinio nustūmimo amplifikacijos reakcija, kuri pagamina ilgas molekules turinčias tos pačios matricos pasikartojimus. Tam tikrais atvejais tokia amplifikacija gali būti atliekama naudojant polimerazės grandininę reakciją. Gautu padauginti fragmentai (70, 71, 72...) turi inkorporuotus atskaitinius nukleotidus (60) ir modifikuotus substratinius nukleotidus (21, 22), kurie yra pažymėti (kaip pavyzdys) DNR sekose 80, 81, 82 atitinkamai, tam kad pavaizduotų pavyzdines nukleotidų pozicijas. Reikėtų suprasti, jog nukleotidų skaičius, pozicija ir modifikacijos gali skirtis skirtingose

panaudojimuose ir pavyzdžiuose.

Taip pat turėtų būti suprata, jog nors 1 paveikslas apibūdina substratinius nukleotidus (20), kurie yra inkapsuliuojami į lašelius (30), kituose išradimo atvejuose šie nukleotidai nebūtinai turi būti inkapsuliuojami į šiuos lašelius. Pavyzdžiui, substratiniai nukleotidai (20) gali būti pridedami vykstant lašelių praturtinimui.

Lašeliai (31, 32, 33, 34...) tuomet gali būti suardomi tam kad išleistų savo turinį, ir tam tikrais atvejais nukleorūgštys buvusios kiekviename atskirame lašelyje gali būti surinktos į vieną vietą, kaip pavaizduota 1-ame paveiksle. Kiekvienas skirtinga katalizinės biomolekulės mutanto padauginta DNR gali turėti skirtingus atskaitinių ir/ar modifikuotų substratinių ir/ar substratinių nukleotidų kiekius, kurie gali teikti informaciją apie tos molekulės katalizinį aktyvumą. Tuomet gali būti atliekamos papildomos analizės (pvz. sekoskaita) surinktų padaugintų nukleorūgščių ir taip atgauta informacija apie substratinių, modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekius kiekvienai molekulei. Pavyzdžiui, informacija apie katalizinės biomolekulės seką ir jos aktyvumą tuomet gali būti atgaunama naudojantis nanoporos sekoskaita ir/ar bisulfitine sekoskaita, ir/ar PacBio sekoskaita, nes šie metodai leidžia aptikti DNR modifikacijas.

Apibūdintas pavyzdys nurodo vieną iš substratinių nukleotidų panaudojimo, kaip katalizinių biomolekulių substratų būdų ir pateikia žingsnius, kuriuos reikia atlikti norint įrašyti jų katalizinius aktyvumus. Padauginta ir atkurta DNR tuomet gali suteikti informaciją susijusią su visom specifinėm mutantų sekomis ir atitinkamai jų koduojamų molekulių aktyvumus, kitaip tariant – eksperimento metu sujungiamo ir įrašoma funkcinė ir sekos informacija. Šio metodo taikymas gali paprastai būti išplėstas charakterizuojant milijardus skirtingų biokatalizatorių to pačio eksperimento metu, paruošiant didesnę katalizinių biomolekulių mutantų biblioteką. Tokios bibliotekos gali būti paruoštos naudojantis klaidas darančią PGR, oligonukleotidų-lemiamą mutagenę, surinkimo PGR, *in vivo* mutagenę, kasetinę mutagenę, sričiai-specifinę mutagenę ar kitas technikas.

Kitame išradimo pavyzdyje visi lašeliai gali turėti genetinės informacijos nešikius koduojančius tą patį katalizinės biomolekulės variantą, tačiau turėti skirtingas genetines reguliacines sekas. Pavyzdžiui, tokios reguliacinės sekos gali būti ribosomos prisijungimo sritys, kurios kaip žinoma gali turėti skirtingus giminingumus ribosomoms priklausomai nuo jų sekų. Kitais atvejais, šios reguliacinės



sekos gali būti promotoriaus sekos ir/ar ribozimai ir/ar ribojungikliai ir/ar transkripcijos stiprikliai ir/ar operatoriai ir/ar slopiklio prisijungimo vieta ir/ar aktyvatoriaus prisijungimo vieta ir/ar DNR prisijungimo vieta ir/ar terminatorius ir/ar slopiklio geno aktyvatorius ir/ar aktyvatoriaus geno aktyvatorius. Tokiu atveju, modifikuotų substratinių nukleotidų kiekis nepriklausytų nuo katalizinės biomolekulės sekos, nes šiame pavyzdyje jos visos yra vienodos, tačiau priklausytų nuo genetinių reguliacinių sekų, kurios gali daryti įtaką pagamintų katalizinių biomolekulių kiekiui. Pavyzdžiui, jei vienas genetinės informacijos nešiklis koduoja ribosomų prisijungimo sritį, kuri gali jungtis prie ribosomų su dideliu giminingumu, katalizinių biomolekulių gali būti pagaminama daug daugiau ir, dėl to, modifikuotų substratinių nukleotidų kiekis būtų didesnis. Tam tikrais atvejais, naudojant išradimą, yra įmanoma nustatyti šias ribosomų prisijungimo sričių sekas ir priskirti šioms sekoms aktyvumą, kuris koreliuotų su ribosomos prisijungimo giminingumu prie tų RBS sekų.

2 paveikslas yra dar vieno išradimo aspekto pavyzdys, kuris apibūdina modifikuotų substratinių nukleotidų kiekio reguliaciją reguliacinėmis DNR sekomis ir, kaip informacija apie skirtingas reguliacines sekas, ir atitinkamus aktyvumus gali būti įrašoma ir atgaunama. Neribojančiame 2-o paveikslo pavyzdyje, vaizduojama DNR matricų populiacija (10), kur kiekvienas populiacijos narys (11, 12, 13...) koduoja tą pačią biomolekulę (15) tačiau turi skirtingas reguliacines sekas (16, 17, 18). Šios reguliacinės sekos gali daryti įtaką katalizinių biomolekulių kiekiui kiekviename lašelyje. Pavyzdžiui, tokia reguliatorinė seka gali būti ribosomų prisijungimo sritis ir priklausomai nuo šios srities sekos, ribosomos gali prie srities jungtis aukštesniu ar žemesniu dažniu. Šis prisijungimas gali būti asocijuotas su katalizinės biomolekulės kiekiu pagamintu lašelyje. Pavyzdžiui, žemas ribosomų prisijungimo dažnis gali koreliuoti su mažu pagaminto baltymo kiekiu. Nors šiame pavyzdyje yra naudojama gryninta DNR matrica, kaip nukleorūgščių šaltinis, kituose išradimo panaudojimo variantuose gali būti naudojami kiti šaltiniai ar kitos technikos. Pavyzdžiui, genetinės informacijos nešiklis gali būti inkapsuliuojamas RNR arba ląstelių forma.

DNR matricos iš pradžių inkapsuliuojamos į seriją mikroskysčių lašelių (30). Tam tikrais atvejais, DNR molekulės (arba genetinės informacijos nešikliai bendrai) gali būti inkapsuliuojamos tankiu mažesniu nei 1 molekulė per lašelį tam, kad užtikrinti, jog dauguma ar visi lašeliai turi nulį arba tik vieną molekulę. Taigi, kaip pavaizduota 2 paveiksle, kiekvienas lašelis (31, 32, 33, 34...) turi arba nulį arba vieną

molekulę.

Kartu su genetinės informacijos nešikliais į lašelius gali būti inkapsuliuojami reagentai beląstelinei baltymo sintezei, substratiniai nukleotidai (20). Tam tikrais atvejais, beląsteliniai baltymų sintezės reagentai gali būti nereikalingi. Pavyzdžiui, naudojant ląsteles, kaip genetinės informacijos nešiklius – tokiais atvejais taip pat inkapsuliuojami ir ląstelių lizės reagentai kartu su ląstelėmis, kurios jau turi specifinę katalizinę biomolekulę savo viduje. Substratiniai nukleotidai (20) gali būti, pavyzdžiui, modifikuoti deoksiribonukleotidų trifosfatai – dATP ir/ar dCTP ir/ar dGTP ir/ar dTTP. Substratiniai nukleotidai gali būti inkapsuliuojami kartu su DNR matricą vienu metu, ar vieni po kitų, bet kokia tinkama tvarka.

Lašeliai tuomet gali būti inkubuojami tam kad vyktų katalizinės biomolekulės gamyba pasitelkiant prieš tai kartu inkapsuliuotus beląstelinės baltymų sintezės reagentus. Tam tikrais atvejais, DNR matricos molekulės turinčios vienodas koduojančias sekas sintetins skirtingus kiekius katalizinių biomolekulių dėl skirtingos reguliacinių sekų. Šiame pavyzdyje, šios reguliatorinės sekos yra skirtingos ribosomos prisijungimų sritys. Šioje iliustracijoje, pirma DNR matrica (11) leidžia gaminti didžiausią katalizinių biomolekulių kiekį (40), kita DNR matrica (12) mažesnį biomolekulių kiekį (41) ir paskutinė DNR matrica (13) gali nepagaminti nė vienos biomolekulės.

Pagamintos katalizinės biomolekulės kiekviename lašelyje tuomet gali pradėti katalizuoti substratinių nukleotidų cheminę konversiją. Kadangi visos DNR matricos koduoja identišką katalizinę biomolekulę, kiekvienos katalizinės biomolekulės aktyvumas yra vienodas ir cheminės konversijos kiekis priklauso tik nuo biomolekulės koncentracijos lašelyje. Šiame pavyzdyje, lašelis (32) turi daugiausia katalizinių biomolekulių (40) ir dėl to pagamina daugiau modifikuotų substratinių nukleotidų nei kitas lašelis (33) su mažesniu katalizinių biomolekulių kiekiu (41). Tam tikrais atvejais, skirtingos katalizinių biomolekulių koncentracijos tarp lašelių gali suteikti informaciją apie skirtingus reguliatorinių sekų aktyvumus – mažėjantis katalizinių biomolekulių kiekis nuo vieno lašelio (32) iki kito lašelio (33) gali parodyti, jog ribosomos gali turėti skirtingus giminingumus skirtingoms ribosomų prisijungimo sričių sekoms. Pavyzdžiui, matrica (11) gali turėti specifinę ribosomų prisijungimo srities seką, kuri stipriai padidina dažnį, kuriuo ribosoma jungiasi prie tos ribosomų prisijungimo srities inicijuojant baltymo sintezę, o tuo tarpu likusios matricos (12, 13)

gali turėti ribosomų prisijungimo sričių variantus, kurie turi menkesnius poveikius ribosomų prisijungimo dažniui.

Tam tikrais atvejais, lašeliai gali būti praturtinami papildomas reagentais – DNR padauginimo mišiniu (50) ir atskaitiniais nukleotidais (60), kurie gali turėti cheminę modifikaciją. Atskaitiniai nukleotidai gali būti naudojami nustatyti modifikuotų substratinių nukleotidų ir/ar substratinių nukleotidų kiekius. Lašelių praturtinimas gali būti pasiektas, pavyzdžiui, pasitelkiant lašelių suliejimo technikas. Tam tikrais atvejais atskaitiniai nukleotidai (60) gali būti specifiškai pasirenkami taip, kad DNR polimerazės galėtų juos inkorporuoti vykstant nukleorūgščių sintezės reakcijai. Tam tikrais atvejais, po lašelių praturtinimo, katalizinės biomolekulės DNR matricos (11, 12, 13...) gali būti padauginamos naudojant polimerazės mišinį (50).

Viename išradimo pavyzdyje, vykstant nukleorūgščių matricų padauginimui, atskaitiniai nukleotidai (60) ir modifikuoti substratiniai nukleotidai (21, 22) yra įterpiami į sintetinius DNR fragmentus (70, 71, 72). Šiame pavyzdyje, DNR polimerazė negali įterpti substratinių nukleotidų į sintetinę DNR grandinę. Kitais atvejais, DNR polimerazė gali įterpti substratinius nukleotidus į sintetinę DNR grandinę.

Tam tikrais atvejais, padauginimo reakcija gali būti izoterminė daugybinio nustūmimo padauginimo reakcija, kuri pagamina ilgas molekules turinčias tos pačios matricos pasikartojimus. Tam tikrais atvejais toks padauginimas gali būti atliekamas naudojant polimerazės grandininę reakciją. Gauti padauginti fragmentai (70, 71, 72...) turi įterptus atskaitinius nukleotidus (60) ir modifikuotus substratinius nukleotidus (21, 22), kurie yra pažymėti (kaip pavyzdys) DNR sekose 80, 81, 82 atitinkamai, tam kad pavaizduoti pavyzdines nukleotidų pozicijas. Reikėtų suprasti, jog nukleotidų skaičius, pozicija ir modifikacijos gali skirtis skirtingose panaudojimuose ir pavyzdžiuose.

Taip pat turėtų būti suprasta, jog nors 1 paveikslas apibūdina substratinius nukleotidus (20), kurie yra inkapsuliuojami į lašelius (30), kituose išradimo atvejuose šie nukleotidai nebūtinai turi būti inkapsuliuojami į šiuos lašelius. Pavyzdžiui, substratiniai nukleotidai (20) gali būti pridedami vykstant lašelių praturtinimui.

Lašeliai (31, 32, 33, 34...) tuomet gali būti suardomi dėl tų pačių priežasčių, kaip ir 1 paveiksle. Kiekviena skirtinga padauginta DNR seka tuomet gali turėti skirtingus atskaitinių nukleotidų ir/ar modifikuotų substratinių nukleotidų ir/ar

substratinių nukleotidų kiekius savo sekoje. Nukleotidų kiekiai gali teikti informaciją apie tos reguliacinės sekos aktyvumą, kuris šiame pavyzdyje yra skirtingi ribosomų giminingumai skirtingoms RBS sekoms. Tuomet gali būti atliekamos papildomos analizės (pvz., sekoskaita) surinktų padaugintų nukleorūgščių ir taip atgauta informacija apie substratinių, modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekius kiekvienai molekulei. Pavyzdžiui, informacija apie katalizinės biomolekulės seką ir jos aktyvumą tuomet gali būti atgaunama naudojantis nanoporos sekoskaita ir/ar bisulfitine sekoskaita, ir/ar PacBio sekoskaita, nes šie metodai leidžia aptikti DNR modifikacijas.

Apibūdintas pavyzdys vaizduoja substratinių nukleotidų naudojimo būdą, kaip taikinį katalizinėms biomolekulėms ir tuomet pateikia žingsnius, kaip katalizinis biomolekulės aktyvumas gali būti užrašomas. Šiame pavyzdyje, modifikuotų substratinių nukleotidų kiekis priklauso ne nuo skirtingų katalizinių biomolekulių aktyvumų, o nuo jų regulatorinių sekų, kurios keitė pagamintų katalizinių biomolekulių kiekį kiekviename lašelyje. Padauginta DNR tuomet gali būti atkurta sekoskaitos pagalba ir suteikti informaciją apie kiekvieną reguliacinę seką ir jos santykinį aktyvumą. Kitaip tariant, eksperimento metu yra įrašomas skirtingų reguliacinių sekų funkcijos ir sekos ryšys.

Šio metodo pritaikymas gali paprastai būti išplėstas charakterizuojant milijardus skirtingų biokatalizatorių to pačio eksperimento metu, pvz., paruošiant didesnę reguliacinių sekų mutantų biblioteką. Tokios bibliotekos gali būti paruoštos naudojantis klaidas darančią PGR, oligonukleotidų-lemiamą mutagenezę, surinkimo PGR, *in vivo* mutagenezę, kasetinę mutagenezę, sričiai-specifinę mutagenezę ar kitas technikas.

### *Sekoskaita*

Kai kuriais aspektais, toliau atkleisti metodai apima molekulių bibliotekos sekos nustatymo būdus. Genetinės informacijos nešiklio ar kito produkto sekos nustatymas gali būti atliktas sekoskaitos metodais tokiais, kaip Helioscope™ pavienių molekulių sekoskaita, Bisulfitine sekoskaita, Nanoporos sekoskaita, MPSS sekoskaita, 454 pirosekoskaita, pavienių molekulių realaus laiko sekoskaita, Illumina sekoskaita, SOLiD sekoskaita, Ion Torrent sekoskaita, jonų puslaidininkių sekoskaita, Polony sekoskaita, DNA nanoball sekoskaita. Taip pat, DNR sekoskaita gali būti atlikta su Genomų Analizatoriumi Iix, HiSeq, MiSeq, PacBio, Solexa, HeliScope

technologijomis.

Tam tikrais atvejais nukleorūgšties seka gali būti nustatoma naudojant abiejų galų sekoskaitą, daugybinių pradmenų sekoskaitą, didelio našumo sekoskaitą, šaudyklinę (shotgun) sekoskaitą, dažo terminacijos sekoskaitą, Maximo Gilberto sekoskaitą, pirosekoskaitą.

Sekoskaitos reakcija, tam tikrais atvejais, gali būti atlikta ir kieto arba pusiau kieto paviršiaus gelyje, emulsijoje, ant paviršiaus, ant rutuliuko, lašelyje, pastovioje tėkmėje, skiedime arba viename ar dviejuose fiziškai atskiruose tūriuose.

Sekoskaitos metu gali būti nuskaitymi 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ar daugiau nukleotidų arba žymėtos molekulės bazių porų. Sekoskaitos metu taip pat gali būti nuskaitymi 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, ar daugiau nukleotidų arba žymėtos molekulės bazių porų. Sekoskaitos metu taip pat gali būti nuskaitymi 1500; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; 10000 ar daugiau nukleotidų arba žymėtos molekulės bazių porų.

Sekoskaitos metu fragmentai gali būti nuskaitymi 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ar daugiau kartų vienos sekoskaitos metu. Sekoskaitos metu fragmentai taip pat gali būti nuskaitymi 1500; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; 10000 ar daugiau kartų vienos sekoskaitos metu.

Tolimesni pavyzdžiai yra pateikti taip, jog asmenys su įprastu šios srities technikos žinių lygiu šį pavyzdį galėtų įgyvendinti ir šis išradimo įgyvendinimo apibūdinimas nėra skirtas riboti šio išradimo apimtį. Buvo įdėtos pastangos viską aprašyti taip tiksliai, kaip įmanoma skaitine prasme, tačiau tam tikros eksperimentinės klaidos ir variacijos yra galimos. Nebent nurodyta kitaip, dalys yra dalys svoriu, molekulinis svoris yra vidutinis molekulinis svoris, temperatūra yra Celsijaus laipsniais ir slėgis yra artimas atmosferiniam.

#### Pavyzdžiai

Toliau išradimas yra apibūdinamas itin detalai su pavyzdžiais, nors techninė šio išradimo apimtis nėra ribojama toliau aprašytų pavyzdžių.

#### Pavyzdys 1

Šis pavyzdys iliustruoja, kaip skirtingų katalizinių biomolekulių aktyvumai gali būti matuojami ir įrašomi į atitinkamos biomolekulės DNR matricas padauginimo dėka

ir vėliau informacija atgaunama sekoskaitos metodais.

Šiuo atveju esterazės mutantų biblioteka buvo paruošta naudojant klaidas darančią PGR, kuri gali turėti savybę katalizuoti cheminę substratinių nukleotidų (N4-benzoil-2'-deoksicitidinas) konversiją į modifikuotus substratinius nukleotidus (2'-deoksicitidino trifosfatas). Taip pat, šiame pavyzdyje esterazės mutantai buvo sintetinami pasitelkiant *in vitro* transkripcijos ir transliacijos sistemą.

Kaip iliustruojama 3 paveiksle, DNR biblioteka yra paruošiama susintetinant skirtingus esterazės mutantus pasitelkiant gerai žinomas mutagenizacijos technikas (klaidas daranti PGR) ir tuomet pridėdant reguliatorines DNR sekas, kurios yra reikalingos *in vitro* katalizinių biomolekulių ekspresijai – promotorius, ribosomos prisijungimo sritis ir terminatorius. Linijiniai DNR fragmentai buvo cirkulizuojami, nes šiame pavyzdyje yra naudojama daugybinio nustūmimo reakcija, kuriai yra reikalinga žiedinė DNR matrica.

Pirmiausia, ant dviejų 1 ml švirkštų yra uždedamos 0,351 mm diametro adatos ir 0,3 mm diametro politetrafluoroetileno žarnelės. Pirmasis švirkštas yra tuomet pripildomas 200 µl 1,5 % EA surfaktanto HFE7500 fluorintoje alyvoje (v/v). Antrasis švirkštas yra pripildomas 300 µl HFE7500 fluorinta alyva.

Toliau, *in vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijos mišinys (IVTT) (PURExpress® In Vitro Baltymų sintezės rinkinys) yra paruošiamas pagal 1 lentelę.

1 lentelė. *In vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijos mišinys.

|                                  | Pradinė koncentracija | Galutinė koncentracija | Tūris   |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| Esterazių mutantų biblioteka     | ~20000 molekulės/µl   | ~10000 molekulės /µl   | 1,5 µl  |
| <i>PURexpress tirpalas A</i>     | 3X                    | 1X                     | 10 µl   |
| <i>PURexpress tirpalas B</i>     | 4X                    | 1X                     | 7,5 µl  |
| <i>Ribolock</i> RNAzių slopiklis | 40 U/µl               | 1,33 U/µl              | 1 µl    |
| Substratiniai nukleotidai        | 1 mM                  | 0,125 mM               | 3,75 µl |
| H <sub>2</sub> O                 |                       |                        | 6,25 µl |

Toliau, paruoštas IVTT reakcijos mišinys yra perkeliamas į antrą švirkštą iš anksto pripildytą HFE7500 ir tuomet laikomas vertikaliajoje pozicijoje iki eksperimento galo. Švirkštai švelniai spaudžiami taip, kad skysčiai pasiektų žarnelių galus naudojant tėkmės kontrolės pompas. Yra svarbu laikyti švirkštus arti 4°C temperatūros siekiant išvengti išankstinės reakcijos pradžios. Pavyzdžiui, švirkštą galima laikyti šaldomajame stovelyje siekiant jį išlaikyti šaltą.

Mikroskysčių lašelių generavimo prietaisas yra padedamas po mikroskopu. Pirmojo švirkšto žarnelė tuomet yra įdedama į nešiklinės alyvos įvestį prietaise. Tuomet, antrojo švirkšto žarnelė yra prijungiama į vandens fazės įvestį. Galiausiai, naudojant pompas abu švirkštai yra iš lėto spaudžiami kol abu skysčiai pasiekia generavimo prietaiso vidų.

Tuomet yra nustatomi švirkštų skysčių tėkmės greičiai - 300  $\mu\text{l/val.}$  nešiklinės alyvos švirkštui, 250  $\mu\text{l/val.}$  vandens tėkmės švirkštui siekiant gaminti 10  $\text{pl}\pm 1$  pl vandens lašelius. Kai lašelių gamyba stabilizuojasi, suformuota emulsija yra surenkama naudojant 0,56 mm žarnelę. Mėgintuvėlis su surinkta emulsija yra laikomas šaltai.

Besiformuojant lašeliams, paruošiamas trečias švirkštas ant jo užmaunant 0,58 mm adatą ir pripildant ją 500  $\mu\text{l}$  HFE7500 fluorintos alyvos. Švirkštas yra tuomet vertikaliai įvirtinamas į tėkmės kontrolės pompą. Kai vandeninė faze pasibaigia ir lašelių formavimas baigiasi, fluorintos alyvos tėkmė yra paliekama dar trim minutėms.

Tuomet, neturinti žarnelės trečioji adata yra spaudžiama 500  $\mu\text{l/val.}$  greičiu. Tuomet, emulsijos surinkimo žarnelė yra išimama iš lašelių generavimo prietaiso ir užmaunama ant trečiojo švirkšto. Kitas žarnelės galas yra užblokuojamas siekiant išvengti kontakto su oru.

Vykstant inkubacijai 37 °C esterazės mutantai yra produkuojami kiekviename lašelyje. Jiems besigaminant kai kurie mutantai gali pradėti katalizuoti substratinių nukleotidų cheminę konversiją. Kiekviename lašelyje nusistovi tam tikra modifikuotų substratinių nukleotidų koncentracija. Modifikuotų substratinių nukleotidų skaičius gali būti priklausomas nuo specifinio esterazės mutanto aktyvumo lašelyje.

Po inkubacijos eksperimentas tęsiamas paruošiant tris 1 ml švirkštus ant kurių yra užmaunama 0,58 mm diametro adatos su 0,56 mm diametro politetrafluoroetileno žarnelėmis. Pirmoji ir antroji adatos yra pripildomos 300  $\mu\text{l}$  1,5

EA surfaktanto HFE7500 fluorintoje alyvoje (v/v). Trečiasis švirkštas yra pripildomas 300 µl HFE7500 fluorintoje alyvoje.

Šiame eksperimente atskaitiniai nukleotidai buvo 2'-deoksi-5-metilcitidino 5'-trifosfatai. Phi29 polimerazė gali sėkmingai inkorporuoti juos į DNR grandinę vykstant nukleorūgščių sintezei.

Daugybinio nustūmimo reakcijos (MDA) mišinys yra paruošiamas pagal 2 lentelę.

2 lentelė. Daugybinio nustūmimo reakcijos mišinys.

|                                                              | Pradinė koncentracija | Galutinė koncentracija | Tūris   |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| 10X Phi29 reakcijos buferis                                  | 10X                   | 1,25X                  | 12,5 µl |
| Exo-atsparūs atsitiktiniai pradmenys                         | 500µM                 | 10 µM                  | 2 µl    |
| dATP, dGTP, dTTP ir 2'-deoksi-5-metilcitidino 5'-trifosfatas | 10 mM                 | 0,375 mM               | 3,75 µl |
| Pluronic F-127                                               | 10 %                  | 1,25 %                 | 12,5 µl |
| Pirofosfatazė                                                | 0,1 U/µl              | 0,00125 U/µl           | 1,25 µl |
| Phi29 polimerazė                                             | 10 U/µl               | 0,67 U/µl              | 6,7 µl  |
| DTT                                                          | 100 mM                | 2,5 mM                 | 2,5 µl  |
| H <sub>2</sub> O                                             |                       |                        | 53,3 µl |

Paruoštas MDA reakcijos mišinys yra tuomet perkeliamas į trečią švirkštą. Į pompas MDA reakcijos mišinio švirkštas yra įstatomas vertikaliai, visi kiti švirkštai įstatomi horizontaliai.

Prieš tai inkubuota IVTT reakcijos žarnelė yra išimama iš termostato. Emulsija žarnelėje yra stumiama kol pasiekia žarnelės galą.

30 µm suliejimo prietaisas su Bi-Sn lydinio elektrodais yra padedamas po



mikroskopu ir prie elektrodų yra prijungiami aukštos įtampos kabeliai. Paruoštų žarnelių galai yra prijungiami prie prietaiso. Elektrinis impulsų generatorius yra prijungiamas prie aukštos įtampos šaltinio.

Žarnelė su prieš tai inkubuota IVTT reakcija kartu su savo švirkštu yra įstatoma į tėkmės kontrolės pompą. Žarnelė su IVTT emulsija yra įdedama į emulsijos įvestį.

MDA reakcijos mišinio greičiai: 100  $\mu\text{l/val.}$  vandens fazei ir 270  $\mu\text{l/val.}$  nešiklinei alyvai, siekiant gauti 40 pl lašelius.

10 pl IVTT lašeliai yra leidžiami greičias: 30  $\mu\text{l/val.}$  lašeliams and 300  $\mu\text{l/val.}$  nešiklinei alyvai.

Tėkmės greičiau gali skirtis skirtinguose eksperimentuose priklausomai nuo pasirinktos įtampos, IVTT lašelių dydžių, naudojamo surfaktanto ir kitų parametrų.

Naujai suformuoti MDA ir suleisti IVTT lašeliai yra sujungiami pritaikant stačiakampinę bangą su 10 kHz dažniu ir 300 - 700 mVpp amplitude. Suliejimas yra tęsiamas iki tol, kol visi IVTT lašeliai yra suleidžiami ir sujungti. Surinkta emulsija yra penkias valandas laikoma 30 °C, o per jas lašeliuose vyksta MDA reakcija. Tuomet polimerazė yra inaktyvuojama 20 minučių palaikant emulsiją 65 °C.

Pasibaigus IVTT reakcijai lašeliai turėjo skirtingus kiekius modifikuotų substratinių nukleotidų. Modifikuotų substratinių nukleotidų kiekis priklauso nuo skirting esterazės mutnatų aktyvumų kiekviename lašelyje. Šie lašeliai buvo tuomet suliejami su kitais lašeliais turinčiais atskaitinius nukleotidus. Tuomet, sulieti lašeliai turi specifinį modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų santykį.

Prasidėjus daugybinio nustūmimo reakcijai specifinis modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekis yra inkorporuojamas į DNR amplikoną. Dėl to, kiekviename lašelyje DNR amplikonas gali turėti skirtingą modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekį. DNR matricos naudotos DNR padauginimui skirtinguose lašeliuose buvo tos pačios žiedinės DNR matricos, kurios buvo naudotos katalizinių biomolekulių gamybai.

Inaktyvavus MDA reakciją, emulsija gali būti suardoma pridedant vienodą tūrį 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanolio (Pfo). Vandens fazė tuomet yra išvaloma su Ampure XP naudojant tirpalo santykį 0,4 su vandens fazės tūriu. Po gryninimo

žingsnių DNR yra nuskaityama naudojant nanoporos technologiją sekant gamintojų protokolus. Šiuo atveju, nanoporos sekoskaita buvo pasirinkta dėl savo savybės skaityti ilgas DNR molekules, taip pat galimybės aptikti DNR modifikacijas.

Sekoskaitos informacija gali atskleisti kelis dalykus. Pirma, ji suteikia informaciją apie visas mutantų sekas pradinėje DNR bibliotekoje. Antra, sekos atgavimo metu taip pat yra surenkama informacija apie nukleotidų modifikacijas, kurios gali būti išskirtos iš įrašyto molekulės signalo. Kiekvienas padaugintas DNR fragmentas lašeliuose turi skirtingus kiekius modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų. Kadangi kai kurie nanoporos algoritmai leidžia aptikti nukleotidų modifikacijas, galime tiksliai suskaičiuoti šiuos nukleotidus kiekvienai molekulei. Kadangi modifikuotų substratinių nukleotidų koncentracija kiekviename lašelyje priklauso nuo specifinio esterazės mutantų aktyvumo lašeliuose, padidėjęs modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų santykis indikuoja padidėjusį fermentinį aktyvumą specifinio esterazės mutanto, ir atvirkščiai.

Kaip tokie rezultatai gali atrodyti yra pavaizduota 5 paveiksle, kur Y ašis yra unikalių mutantų skaičius ir X ašis apibūdina santykinio aktyvumo pasiskirstymą. Ši iliustracija vaizduoja tankio pasiskirstymą ir kiekviena mutanto seka turi specifinę žinomą seką. Pavyzdžiui, A ir B raidėmis yra pažymėti du skirtingi esterazių mutantai. Eksperimento pabaigoje yra sužinomos šių mutantų sekos, tiek jų aktyvumai. 3-ta lentelė vaizduoja santykinius įrašytus A ir B mutantų aktyvumus ir jų DNR sekas.

3 lentelė. Esterazių mutantų sekos ir jų įrašyti aktyvumai.

| Mutanto variantas | Santykinis aktyvumas | DNR seka                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A                 | 0,115                | ATGAGCTCACTTTTATTGGGCAAGTATTCGCGAAGACTCCGGAAGTACAAACCTCCGACTTGACAGGTAACACCACTGCTC<br>GAACCTGGTTGGAATGGTCATCCCGGCCGACGAGATCGGGCTTCTACATCAGGGGCTACAATCACATCAGCGACCCCTAAA<br>ATCGTTGAAGATGGGGCTATCAAAGACGCCGAATACTGTGAAGTGTGGGAGCGATTACCCCACTCGATCCAAAGCGCGCT<br>GACATCAACTTCAAGTGAACCTGCCAACAAATTGGAACAAAAAGTCTTACAGTTTGGCGGAGGATATTTCAATGGCACCGT<br>CCGCACAGGGCTTGGAAATCCTCCTCGCGCGACCGTAAGCTGGGTAAGAACACCCCTTGGCACAAAGGATGTGACCTT<br>CGGGTCAGACAGTSGTAATAGTACCGCTCCGTTGGATGTCATCTTTGGTATGAACGACGAGGCATTAAAAATTTCCGCGGA<br>GATCAGCTGAAAAAGACTAAGGATGATAGCTTTAGCCTTGGCTAACGTCCTGTTATAATGCCGTACCGGATCAAGTTTACTTCG<br>TGGAGGCTCCGAGGGCGGTGCTGAGGGGTTGTTTCATCGTCCAGAAATTTCCCGACGAGTACGATGGAGTCATTAGCGTATA<br>CCCCGTATTAACTGGATCCCCCGTCTCTGAAGGATAACCGCGATGCTCAAGCACTTTACAAGAATGACGAGAGGGATG<br>GATCTCCCGAGGAGAACGACCTTATCAACGAGACTGTATTCAAGGCATGCGATTTCATTGGATGGCGTAAAGGACGGTATT<br>ATTAGCAATACAAGTGAATGTGCCGAGAAAGACAAAAATTTGGATACGTTAAGCGAGTCCCTGTCCGAGAAACAGATCG<br>AGGTTATTAAGAGCTTTAACGGGCCAATGGAGTTTGATATCCAGCTTGCCAAACGATTTTACGACAATGCCCTGGTACTCACAG<br>CTTACGGGTGCCGATATTGGTCGTTGTTGGTACTCGCCCAATCCCTGGGGTGCCTCGTGAGTGAATCGGTCGGA<br>CACGTAATCGACGAGCAGGACGCTTTAATGGGCGTCTACAGTGATCAGGTGATCCGTTATAAGATCACGCGCAACCCAGACT<br>TCAATACCTTACCTTCGACCCCTAACGAGTACCGTGAAGAAATCTTAAAGGCTTCAAACCTGCTGGACGTCACAGACCCCTAAT<br>ATCAGTGAAATTCGTGACAAATGGGGGGAAGCTGATTTTGGTGCATGGCCACCGAGGATGAAATGTTGCCACCAAGGTACG<br>AGTGACTATTATAGTAACTGGTCAATGAGTTCCGGCCAAAGAACCTTGGACGAGTTTGCACAGTACTACTTAGTACCTGGCTT<br>CTCACACGGTGGTGAATTTACAATGCTGCAAAATTTGTTGGGGCTTGGACGCTGGGTGGTAAATGGGATGATACCT<br>TCCAACCTGGTGGCGGAAGATCAGAACTCGGGGACTTTCGGGCGTACTCGTCCGTTGTGTGAATACCCATCATATCCCGAGT<br>ACAATGGGAGTGGCGACGTAATTTCTCGGGCCAGTTTTACATGCTTAAAGCA |

|   |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B | 0,75 | ATGAGCTCACTTTTATTGGGCAAGTATTCGCGAAGACTCCGGAAGTACAAACCTCCGACTTGACAGGTAACACCACTGCTC<br>GAACTTGGTTGGAATGGTCATCCCGCGGACGAGATCGGGCTTCCTACATCAGGGGCTACAATCAGCAGCCGCTTAAA<br>ATCGTTGAAGATGGGGCTATCAAAGACGCCGAATACTGTGAAGTGTGGGAGCGATTACCCAGTCGATCCGAACGGCGCT<br>GACATCAACTTTCAAGTGAACCTGCCAACAATTTGGAACAAAAGTTCTTACAGTTTGGCGGAGGATAITTCGATGGCACCGT<br>CCGCACAGGGCTTGGAAATCCTCCTGCGCGGACCGTAAGCTGGGTAAGAACACCCCTTGGCACAAGGGTATGTGACCTT<br>CGGGTCAGACAGTGGTAATAGTACCGCTCCGTTGGATGCATCTTTGGTATGAACGACGAGGCATTAAAAATTCGCGGGA<br>GATCAGCTGAAAAAGACTAAGGATGTAGCTTTAGCCTTGGCTAACGTCCTGTTAATGCCGTACCCGATCAAGTTTACTTCGC<br>TGGAGGCTCCGAGGGCGGTGCGAGGGGTTGTTTCATCGTCCAGAAATTTCCCGACGAGTACGATGGAGTCATTAGCGTATA<br>CCCCGTATTAACCTGGATCCCAAGGCTCTGAAGGATAACCGGATGCTCAAGCATTACAAGAATGACGGAGAGGGATG<br>GATCTCCCGAGAGGAGAACGACCTTATCAACGAGACTGTATTCAAGGCATGCGATTCAATGGATGGCGTAAAGGACGGTATT<br>ATTAGCAATACAAGTGAATGTGCGAGAAAAGAACAAAATTTGGATACGTTAAGCGAGTCCCTGTCCGAGAAACAGATCG<br>AGGTTATTAAGAGCTTTAAGCGGCAATGGAGTTTGATATCCAGCTTGCCAAACGATTTTACGACAATGCGTGGTTACTCACAG<br>CTTCAGGGTGCCGATATTGGTCGTTTGTGGTACTCGCCCAATCCCTGGGGTGCCCGCCGTCGTGAGTGAATCGTTCGGA<br>CACGTAATCGACGAGCAGGACGCTTAAATGGGCGCTACAGTGATCAGGTGATCCGTTAAGATCACGCGCAACCCAGACT<br>TCAATACTCTTACCTTCGACCTAACGAGTACCGTGAAGAAATCTTAAAGGCTTCAAACTGCTGACGTCACAGACCCCTAAT<br>ATCAGTGAATTCGTGAGAAATGGGGGAAGCTGATTTTGGTGCATGGCACCAGGATGAATGGTTGCCACCACAAGGTACG<br>AGTGACTATTATAGTAACTGGTCAATGAGTTCGGCCAAAGATCCTTGGACGAGTTTGACACAGTACTACTAGTACCTGGCTT<br>CTCACACGGTGGTGAATTTACAATGTCGCAAAATTTGTTGGGGGCTTGGACGCTGGGTGTAATGGGGATGTACCT<br>TCCAACCTTGGTGGGGAAGATCAGAACTTCGGCGACTTTCGGCGTACTCGCTTGTGTAATACCTACATATCCCCAGT<br>ACAATGGGAGTGGCGACGTAATCTGCGGCCAGTTTACATGCTTAAAGCA |
|---|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tokiu būdu, naudojant šį išradimą, galima įrašyti ir atkurti nuo milijono iki milijardų (ar daugiau) unikalių mutantų sekų ir jų aktyvumų

## Pavyzdys 2

Šis pavyzdys naudoja substratinius nukleotidus (N4-benzoil-2'-deoksicitidino trifosfatus) ir esterazės fermentą galintį katalizuoti tų substratinių nukleotidų cheminę konversiją ir taip pagaminti modifikuotus substratinius nukleotidus (2'-deoksicitidino trifosfatus). Reikėtų pabrėžti, jog specifinis substratinis nukleotidas yra naudojamas tik kaip pavyzdys, ir kiti substratiniai nukleotidai gali būti naudojami tokiomis ar panašiomis eksperimentinėmis sąlygomis aprašytomis šiame pavyzdyje. Tai taip pat galioja ir katalizinės biomolekulės pasirinkimui. Taip pat, šiame pavyzdyje katalizinės biomolekulės buvo ekspresuojamos naudojant *in vitro* transkripcijos ir translacijos sistemą.

Šio pavyzdžio tikslas yra iliustruoti šio išradimo panaudojimą ne tik katalizinių biomolekulių aktyvumo nustatymui, tačiau ir genetinių reguliacinių sekų charakterizacijai, tokių kaip ribosomos prisijungimo sritys ir kitų. Žinoma, jog ribosomos prisijungimo prie ribosomos prisijungimo srities dažnis yra priklausomas nuo sekos. Kitaip tariant, čia pateikiamas nuoseklus pavyzdys, kaip šis išradimas gali būti pritaikomas reguliacinių dalių aktyvumo charakterizacijai.

Kaip iliustruojama 3 paveiksle, DNR biblioteka yra paruošiama susintetinant skirtingus esterazės mutantus pasitelkiant gerai žinomas mutagenezės technikas (klaidas daranti PGR) ir tuomet pridant reguliacines DNR sekas kurios yra reikalingos *in vitro* katalizinių biomolekulių ekspresijai – promotorius, ribosomos

prisijungimo sritis ir terminatorius. Linijiniai DNR fragmentai buvo cirkulizuojami, nes šiame pavyzdyje yra naudojama daugybinio nustūmimo reakcija, kuriai yra reikalinga žiedinė DNR matrica.

Pirmiausia, ant dviejų 1 ml švirkštų yra uždedamos 0,351 mm diametro adatos ir 0,3 mm diametro politetrafluoroetilenų žarnelės. Pirmasis švirkštas yra tuomet pripildomas 200 µl 1,5 % EA surfaktanto HFE7500 fluorintuoje alyvoje (v/v). Antrasis švirkštas yra pripildomas 300 µl HFE7500 fluorinta alyva.

Toliau, *in vitro* transkripcijos ir transliacijos reakcijos mišinys (IVTT) (PURExpress® In Vitro Baltymų sintezės rinkinys) yra paruošiamas pagal 1 lentelę, tik naudojama „Ribosomų prisijungimo sričių biblioteka su vienoda esteraze“ vietoj „Esterazės biomolekulių bibliotekos“.

Toliau, paruoštas IVTT reakcijos mišinys yra perkeliamas į antrą švirkštą iš anksto pripildytą HFE7500 ir tuomet laikomas vertikaliajoje pozicijoje iki eksperimento galo. Švirkštai švelniai spaudžiami taip, kad skysčiai pasiektų žarnelių galus naudojant tėkmės kontrolės pompas. Yra svarbu laikyti švirkštus arti 4 °C temperatūros siekiant išvengti išankstinės reakcijos pradžios. Pavyzdžiui, švirkštą galima laikyti šaldomajame stovelyje siekiant jį išlaikyti šaltą.

Mikroskysčių lašelių generavimo prietaisas yra padedamas po mikroskopu. Pirmojo švirkšto žarnelė tuomet yra įdedama į nešiklinės alyvos įvestį prietaise. Tuomet, antrojo švirkšto žarnelė yra prijungiama į vandens fazės įvestį. Galiausiai, naudojant pompas abu švirkštai yra iš lėto spaudžiami kol abu skysčiai pasiekia generavimo prietaiso vidų.

Tuomet yra nustatomi švirkštų skysčių tėkmės greičiai - 300 µl/val. nešiklinės alyvos švirkštui, 250 µl/val. vandens tėkmės švirkštui siekiant gaminti 10 pl±1 pl vandens lašelius. Kai lašelių gamyba stabilizuojasi, suformuota emulsija yra surenkama naudojant 0,56 mm žarnelę. Mėgintuvėlis su surinkta emulsija yra laikomas šaltai.

Besiformuojant lašeliams, paruošiamas trečias švirkštas ant jo užmaunant 0,58 mm adatą ir pripildant ją 500 µl HFE7500 fluorintos alyvos. Švirkštas yra tuomet vertikaliai įvirtinamas į tėkmės kontrolės pompą. Kai vandeninė faze pasibaigia ir lašelių formavimas baigiasi, fluorintos alyvos tėkmė yra paliekama dar trim minutėms.

Tuomet, neturinti žarnelės trečioji adata yra spaudžiama 500 µl/val. greičiu.

Tuomet, emulsijos surinkimo žarnelė yra išimama iš lašelių generavimo prietaiso ir užmaunama ant trečiojo švirkšto. Kitas žarnelės galas yra užblokuojamas siekiant išvengti kontakto su oru.

Vykstant inkubacijai 37°C esterazės mutantai yra produkuojami kiekviename lašelyje. Jiems besigaminant kai kurie mutantai gali pradėti katalizuoti substratinių nukleotidų cheminę konversiją. Kiekviename lašelyje nusistovi tam tikra modifikuotų substratinių nukleotidų koncentracija. Modifikuotų substratinių nukleotidų skaičius gali būti priklausomas nuo specifinio esterazės mutanto aktyvumo lašelyje.

Po inkubacijos eksperimentas tęsiamas paruošiant tris 1ml švirkštus ant kurių yra užmaunama 0,58 mm diametro adatos su 0,56mm diametro politetrafluoroetileno žarnelėmis. Pirmoji ir antroji adatos yra pripildomos 300 µl 1,5 EA surfaktanto HFE7500 fluorintoje alyvoje (v/v). Trečiasis švirkštas yra pripildomas 300 µl HFE7500 fluorintoje alyvoje.

Šiame eksperimente atskaitiniai nukleotidai buvo 2'-deoksi-5-metilцитидино 5'-trifosfatai. Phi29 polimerazė gali sėkmingai inkorporuoti juos į DNR grandinę vykstant nukleorūgščių sintezei.

Daugybinio nustūmimo reakcijos (MDA) mišinys yra paruošiamas pagal 2 lentelę.

Paruoštas MDA reakcijos mišinys yra tuomet perkeliamas į trečią švirkštą. Į pompas MDA reakcijos mišinio švirkštas yra įstatomas vertikaliai, visi kiti švirkštai įstatomi horizontaliai.

Prieš tai inkubuota IVTT reakcijos žarnelė yra išimama iš termostato. Emulsija žarnelėje yra stumiama kol pasiekia žarnelės galą.

30 µm suliejimo prietaisas su Bi-Sn lydinio elektrodais yra padedamas po mikroskopu ir prie elektrodų yra prijungiami aukštos įtampos kabeliai. Paruoštų žarnelių galai yra prijungiami prie prietaiso. Elektrinis impulsų generatorius yra prijungiamas prie aukštos įtampos šaltinio.

Žarnelė su prieš tai inkubuota IVTT reakcija kartu su savo švirkštu yra įstatoma į tėkmės kontrolės pompą. Žarnelė su IVTT emulsija yra įdedama į emulsijos įvestį.

MDA reakcijos mišinio greičiai: 100 µl/val. vandens fazei ir 270 µl/val.

nešiklinei alyvai, siekiant gauti 40 pl lašelius.

10 pl IVTT lašeliai yra leidžiami greičias: 30  $\mu\text{l/val.}$  lašeliams and 300  $\mu\text{l/val.}$  nešiklinei alyvai.

Tėkmės greičiau gali skirtis skirtinguose eksperimentuose priklausomai nuo pasirinktos įtampos, IVTT lašelių dydžių, naudojamo surfaktanto ir kitų parametrų.

Naujai suformuoti MDA ir suleisti IVTT lašeliai yra sujungiami pritaikant stačiakampinę bangą su 10 kHz dažniu ir 300 - 700 mVpp amplitude. Suliejimas yra tęsiamas iki tol, kol visi IVTT lašeliai yra suleidžiami ir sujungti. Surinkta emulsija yra penkias valandas laikoma 30 °C, o per jas lašeliuose vyksta MDA reakcija. Tuomet polimerazė yra inaktyvuojama 20 minučių palaikant emulsiją 65 °C.

Pasibaigus IVTT reakcijai lašeliai turėjo skirtingus kiekius modifikuotų substratinių nukleotidų. Modifikuotų substratinių nukleotidų kiekis priklauso nuo skirtingų esterazės mutantų aktyvumų kiekviename lašelyje. Šie lašeliai buvo tuomet suliejami su kitais lašeliais turinčiais atskaitinius nukleotidus. Tuomet, sulieti lašeliai turi specifinį modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų santykį.

Prasidėjus daugybinio nustūmimo reakcijai specifinis modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekis yra inkorporuojamas į DNR amplikoną. Dėl to, kiekviename lašelyje DNR amplikonas gali turėti skirtingą modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų kiekį. DNR matricos naudotos DNR padauginimui skirtinguose lašeliuose buvo tos pačios apskritos DNR matricos kurios buvo naudotos katalizinių biomolekulių gamybai.

Inaktyvavus MDA reakciją, emulsija gali būti suardoma pridedant vienodą tūrį 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanolio (Pfo). Vandens faze tuomet yra išvaloma su Ampure XP naudojant tirpalo santykį 0,4 su vandens fazės tūriu. Po gryninimo žingsnių DNR yra nuskaityta naudojant nanoporos technologiją sekant gamintojų protokolus. Šiuo atveju, nanoporos sekoskaita buvo pasirinkta dėl savo savybės skaityti ilgas DNR molekules, taip pat galimybės aptikti DNR modifikacijas.

Sekoskaitos informacija gali atskleisti kelis dalykus. Pirma, ji suteikia informaciją apie reguliacines sekas buvusias paruoštoje DNR bibliotekoje. Antra, sekos atgavimo metu taip pat yra surenkama informacija apie nukleotidų modifikacijas kurios gali būti išskirtos iš įrašyto molekulės signalo. Kiekvienas padaugintas DNR fragmentas lašeliuose turi skirtingus kiekius modifikuotų

substratinių ir atskaitinių nukleotidų. Kadangi kai kurie nanoporos algoritmai leidžia aptikti nukleotidų modifikacijas, galime tiksliai suskaičiuoti šiuos nukleotidus kiekvienai molekulei. Kadangi modifikuotų substratinių nukleotidų koncentracija kiekviename lašelyje priklauso nuo esterazės koncentracijos kiekviename lašelyje, padidėjęs modifikuotų substratinių ir atskaitinių nukleotidų santykis indikuoja aukštesnį reguliacinės sekos aktyvumą, ir atvirkščiai.

Tokiu būdu, naudojant šį išradimą, milijonai ar milijardai (ar daugiau) unikalių ribosominių prisijungimo sričių sekų gali būti atkurtos kartu su jų aktyvumais.

Šis pavyzdys iliustruoja būdą, kaip šis išradimas gali ne tik įrašyti informaciją apie katalizinių biomolekulių aktyvumus, tačiau ir fiksuoti skirtingų reguliacinių sekų savybes, kurios daro įtaką katalizinių biomolekulių ekspresijai.

## Literatūra

Autour, Alexis, and Michael Ryckelynck. 2017. 'Ultrahigh-Throughput Improvement and Discovery of Enzymes Using Droplet-Based Microfluidic Screening'. Edited by Andrew J deMello and Xavier Casadevall i Solvas. *Micromachines* 8 (4): 128. <https://doi.org/10.3390/mi8040128>.

Baret, Jean-Christophe, Oliver J. Miller, Valerie Taly, Michaël Ryckelynck, Abdeslam El-Harrak, Lucas Frenz, Christian Rick, et al. 2009. 'Fluorescence-Activated Droplet Sorting (FADS): Efficient Microfluidic Cell Sorting Based on Enzymatic Activity'. *Lab on a Chip* 9 (13): 1850–58. <https://doi.org/10.1039/B902504A>.

Böttcher, Dominique, Patrick Zägel, Marlen Schmidt, and Uwe T. Bornscheuer. 2017. 'A Microtiter Plate-Based Assay to Screen for Active and Stereoselective Hydrolytic Enzymes in Enzyme Libraries'. In *Metagenomics: Methods and Protocols*, edited by Wolfgang R. Streit and Rolf Daniel, 197–204. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2_11).

Currin, Andrew, Neil Swainston, Philip J Day, and Douglas B Kell. 2015. 'Synthetic Biology for the Directed Evolution of Protein Biocatalysts: Navigating Sequence Space Intelligently'. *Chemical Society Reviews* 44 (5): 1172–1239. <https://doi.org/10.1039/c4cs00351a>.

Illanes, Andrés, Ana Cauwerhff, Lorena Wilson, and Guillermo R. Castro. 2012. 'Recent Trends in Biocatalysis Engineering'. *Biocatalysis* 115 (July): 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.050>.

Keasling, Jay D. 2012. 'Synthetic Biology and the Development of Tools for Metabolic Engineering'. *Synthetic Biology: New Methodologies and Applications for Metabolic Engineering* 14 (3): 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.01.004>.

Shoda, Shin-ichiro, Hiroshi Uyama, Jun-ichi Kadokawa, Shunsaku Kimura, and Shiro Kobayashi. 2016. 'Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis'. *Chemical Reviews* 116 (4): 2307–2413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00472>.

Wessely, Frank, Martin Bartl, Reinhard Guthke, Pu Li, Stefan Schuster, and Christoph Kaleta. 2011. 'Optimal Regulatory Strategies for Metabolic Pathways in



Escherichia Coli Depending on Protein Costs'. *Molecular Systems Biology* 7 (July): 515–515. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.46>.

Xiao, Han, Zehua Bao, and Huimin Zhao. 2015. 'High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution'. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54 (16): 4011–20. <https://doi.org/10.1021/ie503060a>.

## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas, skirtas nukleorūgščių, koduojančių katalizines biomolekules, identifikavimui tarp daugybės kitų nukleorūgščių, apimantis:

daugybės kompartmentų sukūrimą, kur kiekviename kompartmente yra ne daugiau nei viena nukleorūgšties molekulė, koduojanti katalizinę biomolekulę,

kompartimento sąlygų, leidžiančių sintetinti katalizinę biomolekulę, sukūrimą, substratinio nukleotido pateikimą katalizinėms biomolekulėms,

kur substratinis nukleotidas negali būti polimerazės įterptas į sintetinamą nukleorūgštį,

kompartimento sąlygų, leidžiančių katalizinei biomolekulei atlikti katalizinę funkciją, sukūrimą,

kur minėto aktyvumo rezultatas yra substrato nukleotido modifikacija, kuri užtikrina jog nukleotidas tampa tinkamas polimerazės įterpimui į sintetinamą nukleorūgštį,

nukleorūgščių sintezės reakcijos mišinio, apimančio atskaitinius nukleotidus, gaminančius bent vieną nukleorūgšties kopiją kompartmente, pateikimą minėtiems kompartmentams,

kur modifikuotas substratinis nukleotidas ir atskaitinis nukleotidas yra vienu metu įterpiami į nukleorūgšties seką polimerazės pagalba,

santykio tarp atskaitinių ir modifikuotų substratinių nukleotidų nustatymą naujai pagamintoje nukleorūgšties molekulėje,

kur minėtas santykis yra katalizinės biomolekulės, koduojamos minėtos nukleorūgšties, katalizinio aktyvumo indikatorius.

2. Būdas pagal 1 punktą, kur daugybė nukleorūgščių yra gaunamos metodu, parinktu iš klaidas darančios PGR, tikslinės mutagenezės, surinkimo PGR, *in vivo* mutagenezės, kasetinės mutagenezės, rekursinės mutagenezės, eksponentinės mutagenezės, sričiai specifinės mutagenezės arba daugybės ląstelių lizavimo.

3. Būdas pagal 1 punktą, kur kompartmentas yra lašelis, mikrošulinėlis, mikrovamzdelis arba individuali dėmė ant stikliuko.

4. Būdas pagal 1 punktą, kur atskaitinis nukleotidas yra 5-metil-2'-

deoksicitidino trifosfatas.

5. Būdas pagal 1 punktą, kur substrato nukleotidas yra N4-benzoil-2'-deoksicitidino trifosfatas.

6. Būdas pagal 1 punktą, kur katalizinė biomolekulė yra fermentas, ribozimas arba deoksiribozimas.

7. Būdas pagal 6 punktą, kur katalizinė biomolekulė yra esterazės fermentas.

8. Būdas pagal 1 punktą, kur katalizinės biomolekulės katalizinis aktyvumas yra oksidoredukcija, cheminės grupės pernaša, hidrolizė, ryšio suardymas ne hidrolize ir oksidacija, pakeitimai pavienėje molekulėje, dviejų molekulių sujungimas tuo pat metu vykstant ATP fosfodiesterinio ryšio hidrolizei.

9. Būdas pagal 8 punktą, kur katalizinės biomolekulės aktyvumas yra esterinio ryšio suardymas.

10. Būdas pagal 1 punktą, kur bent vienos nukleorūgšties kopijos pagaminimas yra atliekamas su grandinės prailginimo reakcija, izoterminio padauginimo reakcija, polimerazės grandinine reakcija.

11. Būdas pagal 1 punktą, kur santykis tarp atskaitinių ir modifikuotų substratinių nukleotidų naujai susintetintoje nukleorūgštyje yra nustatomas naudojant pavienių nukleorūgščių molekulių analizės metodus.

12. Būdas pagal 11 punktą, kur į pavienių nukleorūgščių molekulių analizės metodus įeina Oxford Nanopore sekoskaita, bisulfitinė sekoskaita, prikabinto oligonukleotido sekoskaita, PacBio sekoskaita.

13. Būdas pagal 12 punktą, kur pavienių nukleorūgščių molekulių analizės metodas gali aptikti skirtingas nukleotidų modifikacijas.

14. Būdas pagal 1 punktą, kur katalizinės biomolekulės sintezė yra reguliuojama genetinių reguliacijos sekų.

15. Būdas pagal 14 punktą, kur sukurta reguliacinė seka yra ribosomos prisijungimo sritis, promotoriaus seka, ribozimas, ribojungiklis, transkripcijos stipriklis, operatorius, slopiklio prisijungimo sritis, aktyviklio prisijungimo sritis, DNR prisijungimo sritis, terminatorius, slopiklį koduojantis genas, aktyvatorių koduojantis genas.

16. Būdas, skirtas nukleorūgščių, koduojančių katalizines biomolekules, identifikavimui tarp kitų nukleorūgščių, apimantis:

daugybės kompartmentų sukūrimą, kur kiekviename kompartmente yra ne daugiau nei viena nukleorūgšties molekulė koduojanti katalizinę biomolekulę,

kompartimento pateikimą į sąlygas, leidžiančias sintetinti katalizinę biomolekulę,

substratinio nukleotido pateikimą katalizinėms biomolekulėms,

kur substratinis nukleotidas gali būti polimerazės įterptas į sintetinamą nukleorūgštį,

kompartimento sąlygų, leidžiančių katalizinei biomolekulei atlikti katalizinę funkciją, sukūrimas,

kur minėto aktyvumo rezultatas yra substrato nukleotido modifikacija, kuri užtikrina jog nukleotidas tampa netinkamas polimerazės inkorporacijai į sintetinamą nukleorūgštį,

nukleorūgščių sintezės reakcijos mišinio, apimančio atskaitinius nukleotidus, gaminančius bent vieną nukleorūgšties kopiją kompartmente, pateikimą minėtiems kompartmentams,

kur substratinis nukleotidas ir atskaitinis nukleotidas yra vienu metu įterpiami į nukleorūgšties seką polimerazės pagalba,

santykio tarp atskaitinių ir modifikuotų substratinių nukleotidų nustatymą naujai pagamintoje nukleorūgšties molekulėje,

kur minėtas santykis yra katalizinės biomolekulės, koduojamos minėtos nukleorūgšties, katalitinio aktyvumo indikatorius.

17. Būdas skirtas nukleorūgščių, koduojančių katalitines biomolekules, identifikavimui tarp kitų nukleorūgščių, apimantis:

daugybės kompartmentų sukūrimą, kur kiekviename kompartmente yra ne daugiau nei viena nukleorūgšties molekulė koduojanti katalizinę biomolekulę,

kompartimento pateikimą į sąlygas, leidžiančias sintetinti katalizinę biomolekulę,

substratinio nukleotido pateikimą katalizinėms biomolekulėms,

kompartmento pateikimą į sąlygas, leidžiančias katalizinei biomolekulei atlikti katalizinę funkciją,

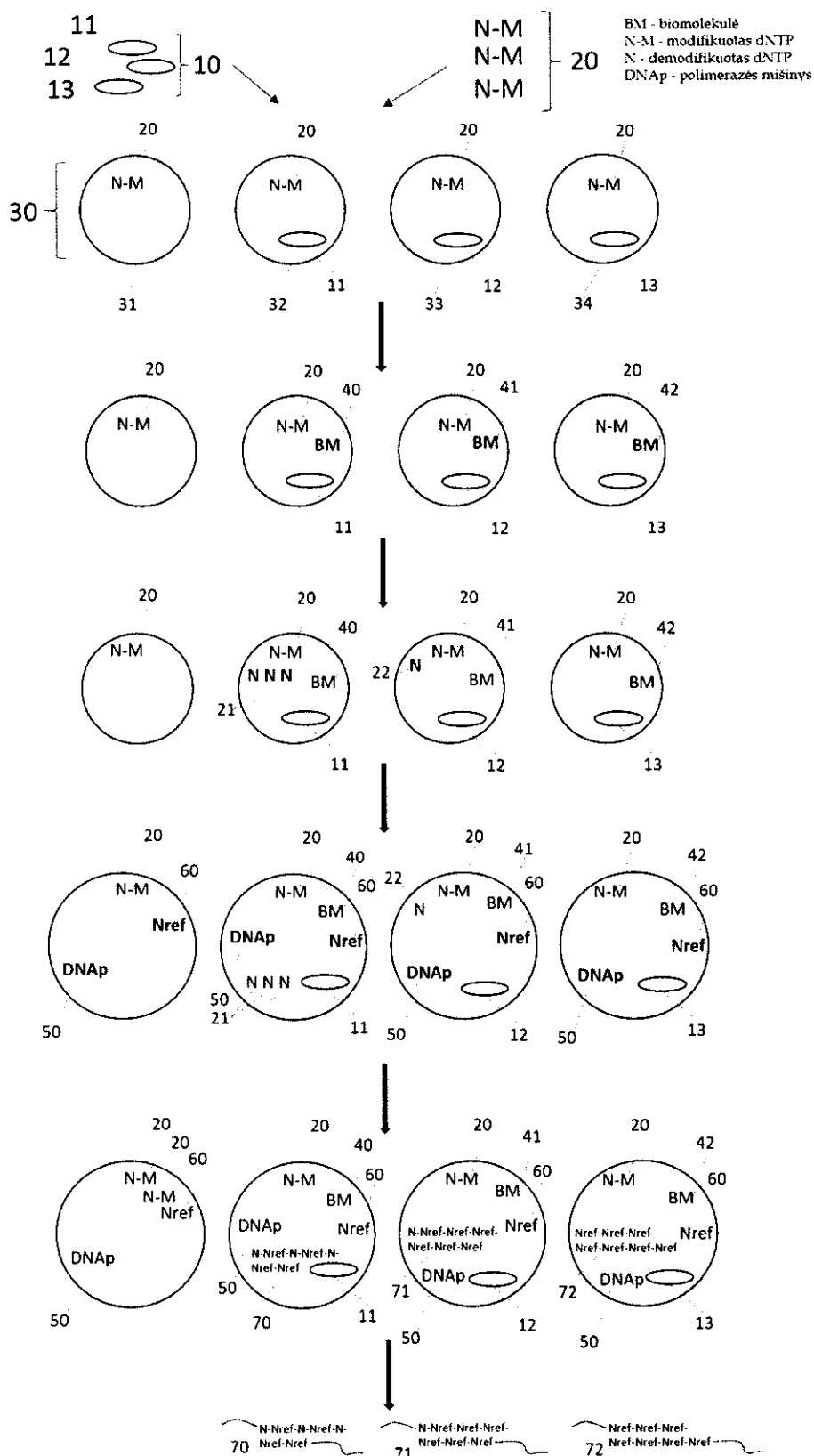
kur minėto aktyvumo rezultatas yra substrato nukleotido modifikacija,

nukleorūgščių sintezės reakcijos mišinio, apimančio atskaitinius nukleotidus, gaminančius bent vieną nukleorūgšties kopiją kompartmente, pateikimą minėtiems kompartmentams,

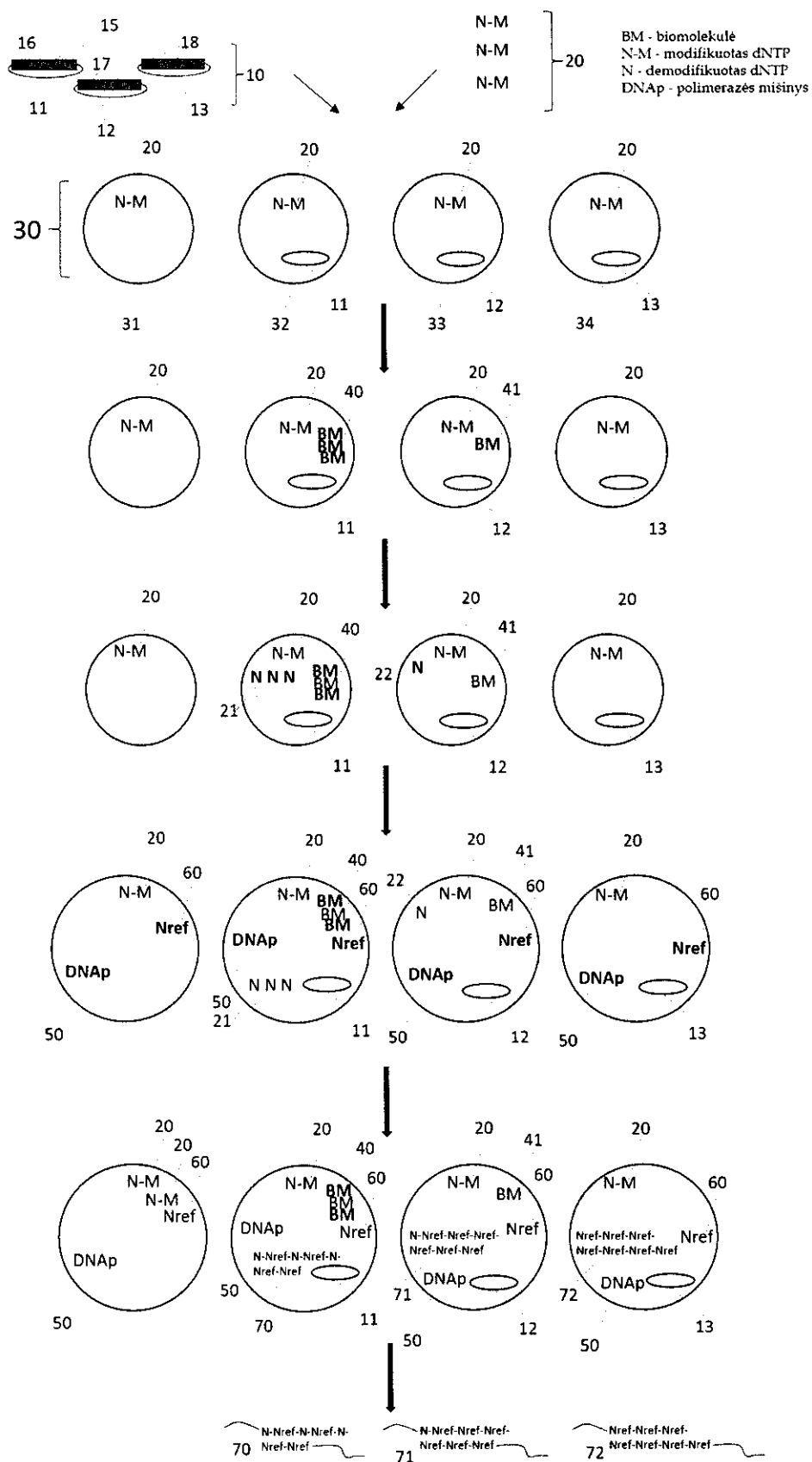
kur substratinis nukleotidas, modifikuotas substratinis nukleotidas ir atskaitinis nukleotidas yra vienu metu įterpiami į nukleorūgšties seką polimerazės pagalba,

santykio tarp atskaitinių, modifikuotų substratinių nukleotidų ir substratinių nukleotidų nustatymą naujai pagamintoje nukleorūgšties molekulėje,

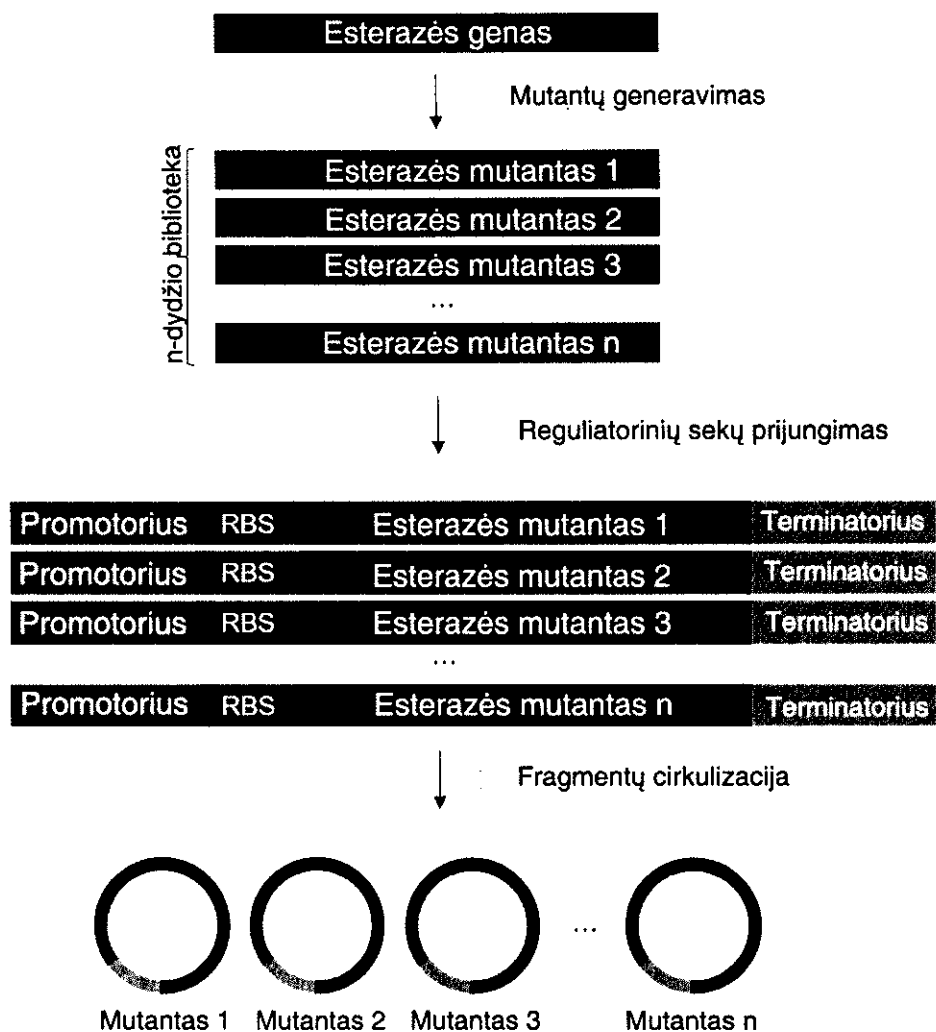
kur minėtas santykis yra katalizinės biomolekulės, koduojamos minėtos nukleorūgšties, katalizinio aktyvumo indikatorius.



1 Pav.

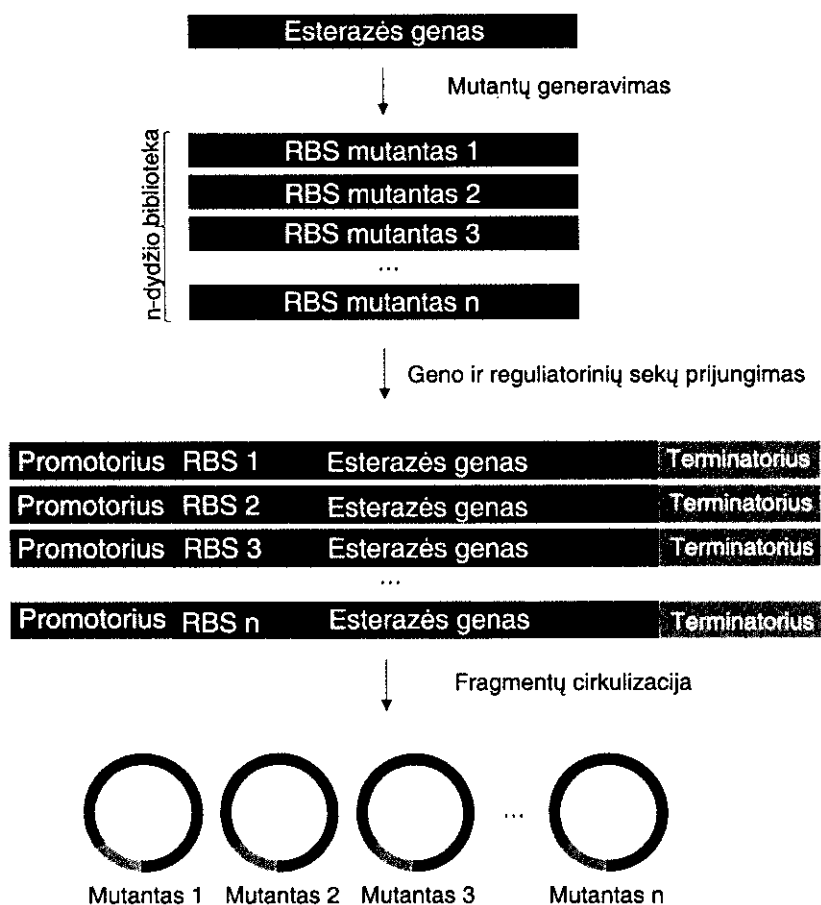


2 Pav.

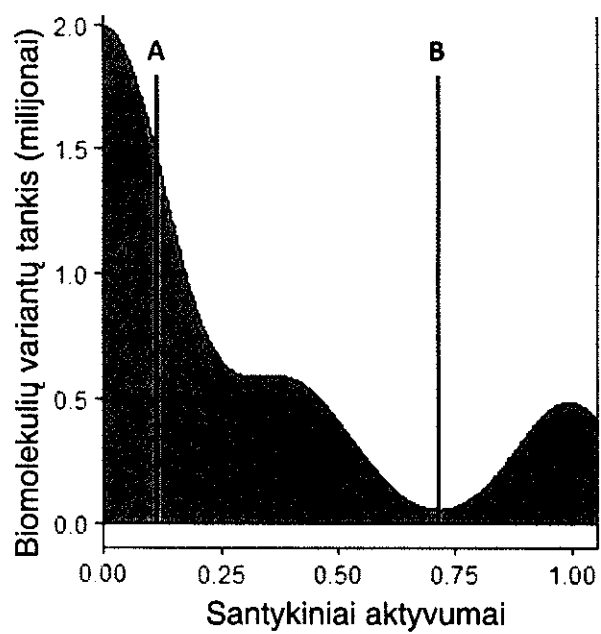


3 Pav.





4 Pav.



5 Pav.