

(19)



(10) **LT 6169 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6169** (51) Int. Cl. (2015.01): **C12N 9/00**
(21) Paraiškos numeris: **2014 082**
(22) Paraiškos padavimo data: **2012 08 28**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 02 25**
(45) Patento paskelbimo data: **2015 06 25**
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: **2012 081**
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US2011/023944**
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2011 02 07**
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2012 08 28**
(30) Prioritetas: **61/301666, 2010 02 05, US**
31/387800, 2010 09 29, US

(72) Išradėjas:

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

(73) Patento savininkas:

NEW ENGLAND BIOLABS, INC., 240 County Road, Ipswich, MA 01938, US

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Tatjana STERLINA, UAB „Intels“, Naugarduko g. 32/2, LT-03225 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Didelio tikslumo restrikcijos endonukleazės

(57) Referatas:

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

Teoriniai pagrindai

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

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

Žvaigždinis aktyvumas yra molekulinės biologijos reakcijų problema. Žvaigždinis aktyvumas klonavimo vektoriuose arba kitoje DNR įveda nepageidaujamus kirpimus. Tokiuose atvejuose kaip teismo ekspertizė, kur tam tikras DNR substratas turi būti perkirptas restrikcijos endonukleaze, sukuriant unikalų individo DNR profilį („pirštų atspaudą“), žvaigždinis aktyvumas pakeičia skėlimo

pobūdį, taip komplikuojamas analizė. Žvaigždinio aktyvumo išvengimas taip pat yra lemiamas tokiame pritaikyme, kaip grandinės nustūmimo amplifikacija (Walker, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 89 : 392-396 (1992)) ir nuosekli genų raiškos analizė (Velculescu, et al., Science 270 :484-487 (1995)).

IŠRADIMO SANTRAUKA

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

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

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

Papildomi įgyvendinimai apima:

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

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

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

(d) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 4, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis

yra parinkta iš grupės, susidedančios iš D16, D148 ir E132.

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

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

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

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

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

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

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

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

(m) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 13, kurioje viena arba daugiau aminorūgščių yra mutuotos, kur vienos arba daugiau mutacijų padėtis yra parinkta iš grupės, susidedančios iš H10, N208, K48, K74, R75, Y56, K58 ir M 117.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(aa) Kompoziciją, apimančią: fermentą, apimantį SEQ ID Nr. 27, turintį G26 mutaciją.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

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

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

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

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

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

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

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

Figūroje 3A žvaigždutės (*) ženklas žymi takelį kairėje (takelis 12), kur žvaigždinis aktyvumas daugiau neaptinkamas. Ženklas (#) žymi takelį dešinėje (takelis

12), kur įvyksta dalinis suskaldymas. Nei žvaigždinio aktyvumo nei dalinio DNR suskaldymo nestebima. Pradinė DraIII-WT koncentracija buvo paskaičiuota 1200 vienetų.

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

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

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

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

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

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

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

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

Figūroje 7 parodytas BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas ant pBR322. BsrDI-HF turi FI mažiausiai 1000 buferyje NEB4, tuo tarpu BsrDI-WT turi ½ FI, pateikiant pagerinimo faktorių mažiausiai 2000. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

Figūroje 8 parodytas BclI-HF ir BclI-WT palyginimas buferyje NEB4 ant lambda (dam-). BclI-HF turi FI mažiausiai 2000, tuo tarpu BclI-WT turi FI 32, pateikiant

pagerinimo faktorių mažiausiai 64. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

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

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

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

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

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

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

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

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

Figūroje 17 parodytas BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas ant pBR322. BsrFI-HF turi FI mažiausiai 500 NEB4 buferyje, tuo tarpu BsrFI-WT turi FI 16, pateikiant

pagerinimo faktorių mažiausiai 32. Dešinėje schemoje pateiktas teorinis skaldymo modelis.

DETALUS ĮGYVENDINIMŲ APRAŠYMAS

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

Nesėkmė siekiant pagaminti mutantą gali įvykti dėl daugybės galimų priežasčių, įskaitant bet kurią iš sekančių. Tai gali įvykti dėl nesėkmingos atvirkštinės PGR. Gali būti, kad mutacija, sukelianti naują specifinį aktyvumą yra toksiška ląstelei šeimininkei, netgi jeigu ji vykdo giminingos metilazės raišką, esant sąlygoms, kurios įprastai yra saugios nemutuotos restrikcijos endonukleazės raiškai. Šiomis aplinkybėmis negali būti gaunamas gyvybingas mutantinis klonas. Be to mutantas gali turėti pirmenybę tam tikram buferiui, kad jeigu tiriama kitame buferyje, aktyvumas nenustatomas. Kitas sunkumas, su kuriuo susiduriama, yra tas, kad net jeigu paprastai tiriamas kiekvienos mutacijos neapdorotas lizatas ir lizate aktyvumas neaptikamas, laikant, kad bandymas neigiamas. Kai kuriais atvejais fermentas turi būti išgrynintas, kad būtų aptiktas aktyvumas.

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

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

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

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

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

Pavyzdžiui, tai buvo nustatyta Styl mutantams: M33A, D37A, F41A, D55A, D71A, N77A, R79A, E80A, F81A, T82A, E83A, F97A, F101A, E136A, W137A, M138A, M 140A, K144A, Q145A, R151A, R255A, R259A, S261A, T264A, F278A, R281A, T284A, M297A, H305A, N306A, D314A, D338A ir E382A.

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

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

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

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

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

1lentelė: HF fermentų savybių santrauka

Fermentas	Substratas	FI1'	FI2'	FI3'	FI4'	Pvz.	Seka Nr.
PvuI-HF	pXba	≥2000(1/8)	≥16000(1)	≥4000(¼)	≥16000(1)	1	1
HindIII-HF	λ	≥260000(¼)	≥260000(¼)	≥250(1/2000)	≥520000(1)	2	2
DraIII-HF	λ	≥120(1/16)	≥1000(¼)	≥32(1/64)	≥2000(1)	3	3
KpnI-HF	pXba	≥1000000(1)	≥1000000(1)	≥30000(1/500)	≥1000000(1)	4	4
StyI-HF	λ	≥4000(¼)	2000(1)	≥16(1/250)	4000(¼)	5	5
BsaJI-HF	pBR322	≥1000(¼)	≥4000(1)	≥4000(1)	≥4000(1)	6	6
BsaWI-HF	pXba	8(1/64)	120(1)	≥120(1))	≥4000(1)	7	7
BglI-HF	λ	≥4000(¼)	≥8000(1)	≥500(1/16)	≥8000(1)	8	8
BsrDI-HF	pBR322	≥120(1/8)	≥500(1)	≥64(1/16)	≥1000(1)	9	9
NsiI-HF	pXba	≥250(1/32)	≥1000(1/8)	≥500(1/16)	≥8000(1)	10	10
DpnII-HF	λ(-)	4000(¼)	2000(1/8)	64(1/128)	8000(1)	11	11
BclI-HF	λ(-)	≥250(1/32)	≥500(¼)	≥32(1/64)	≥2000(1)	12	12

BglII-HF	pXba	≥8000(1/8)	≥128000(1)	2000(%)	≥32000(%)	13	13
BstEII-HF	λ	≥64(1/32)	≥1000(%)	≥32(1/64)	≥2000(1)	14	14
BanII-HF	λ(-)	≥4000(1)	≥2000(%)	≥500(1/8)	≥2000(%)	15	15
PspGI-HF	pBC4	≥1000(%)	≥4000(1)	≥4000(1)	≥4000(1)	16	16
SpeI-HF	T7	≥4000(%)	≥250(1/8)	≥120(%)	≥1000(1)	17	17
BsmAI-HF	FX174	≥4000(1)	≥2000(%)	≥500(1/8)	≥4000(1)	18	18

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

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

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

PAVYZDŽIAI

Pavyzdys 1: Didelio tikslumo (HF) PvuI konstravimas

1. PvuI raiška

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

2. PvuI-HF mutagenezė

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

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

3. PvuI-HF atranka

PvuI-HF atranka buvo atlikta naudojant NEB3 ir NEB 4 (New England Biolabs,

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

4. PvuI-HF gryninimas

Du litrai EK2683(pUC19-PvuI(P154A), pACYC184-PvuIM)) ląstelių buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml 30 °C per naktį. Ląstelės surenkamos ir veikiamos ultragarsu 20-yje ml Tris-HCl, kurio pH 7,5 ir 50 mM NaCl. Po 30 min centrifugavimo prie 15000 rpm, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Didesnio aktyvumo frakcijos buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, now Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) ir laikomos glicerine prie -20 °C.

5. PvuI-HF ir PvuI-WT palyginimas

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

Lentelė 2: PvuI-HF ir PvuI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 2: HF HindIII konstravimas

HindIII atpažįsta ir skaldo A/AGCTT, kaip aprašyta Tarptautinės publikacijos Nr. WO2009/009797 21-ame pavyzdyje. HindIII(K198A) mutantas buvo atrinktas kaip HindIII HF versija. Tolimesnis šio mutanto charakterizavimas atskleidžia, kad netgi jeigu HindIII(K198A) elgesys vienos valandos skalėje yra puikus, tačiau jis nėra puikus skaldyme per naktį. Tuo tarpu didesnio skaičiaus mutantų paieška parodė, kad HindIII(Q148A) taip pat yra dalinai geras. Sekantis žingsnis tolesnio pagerinimo kryptimi buvo alanino pakeitimas kita aminorūgšties liekana. Tarp kitų, HindIII(Q148I) pasirodė puikiai ir vienos valandos skaldyme ir skaldyme per naktį ir jis pavadintas HindIII-HF (Figūra 2).

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

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

Lentelė 3: HindIII-HF ir HindIII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 3: HF DralIII konstravimas

1. DralIII raiška

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

2. DralIII mutagenėzė

DralIII baltymo ilgis yra 227 aminorūgštys. Pradžioje buvo numatytas mutuoti į Ala (arba Phe) bendras 132 aminorūgščių saitai. Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Gly ir Trp buvo mutuotos į Ala. Try buvo mutuota į Phe. Tai buvo: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 51, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 76, 77, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 123, 124, 127, 128, 130, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 150, 154, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 165, 167, 169, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 180, 181, 183, 184, 185, 187, 189, 190, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 22 ir 223.

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

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

3. DralIII-HF atrinkimas

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

Mutantai S15A, H20A, E34A, M58A, Q95A, R106A, K108A, T181A, R187A, R199A, N202D, T181G, T181N, T181Q, T181C, T181V, T181L, T181I, T181M, D55A, D55S, D55C, D55G, D55N, T12A, H20A, E34A, H45A, T57A, M58A, T60A, S66A,

R76A, F90A, M94A, T101A, C115A, F169A, N172A, R173A, H189A, N193A ir Q95A/K104A buvo atrinkti atrankos bandymuose. Po keleto palyginimo skirtingose sąlygose su skirtingais substratais ciklų, buvo surasta, kad DralIII(T181A) yra pageidaujamas mutantas, išlaikantis aukštą skaldymo aktyvumą, bet turintis iš esmės sumažintą žvaigždinį aktyvumą. DralIII(T181A) buvo pažymėtas DralIII-HF.

4. DralIII-HF ir DralIII-WT palyginimas

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

Lentelė 4: DralIII-HF ir DralIII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys Nr.4: HF KpnI konstravimas

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

trigubas mutantas, taigi dvigubas mutantas KpnI(D16N/D148E) buvo pavadintas KpnI-HF.

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

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

Lentelė 5: KpnI-HF ir KpnI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys Nr.5: HF Styl konstravimas

1. Styl raiška

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

2. Styl mutagenezė

Atrinktų mutacijų taškinė mutagenezė buvo atlikta su atvirkštinės PGR metodu. Styl buvo atliktos 237 aminorūgščių mutacijos sekančiai: Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutuotos į Ala. Tyr buvo mutuotas į Phe. Tai buvo padėtyse: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 49, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 65, 66, 69,

70, 73, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 135, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 158, 159, 163, 164, 165, 166, 167, 170, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 181, 183, 187, 188, 192, 193, 194, 195, 196, 200, 203, 204, 205, 207, 209, 211, 212, 213, 214, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 227, 229, 230, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 242, 245, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 266, 267, 269, 272, 274, 277, 280, 282, 283, 284, 286, 288, 289, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 303, 304, 305, 307, 308, 309, 313, 317, 318, 319, 320, 323, 324, 326, 327, 329, 331, 335, 336, 337, 339, 340, 343, 345, 346, 347, 349, 350, 351, 353, 355, 356, 359, 360, 361, 363, 365, 366, 368, 369, 370, 372, 373, 376, 377, 379, 381 ir 382.

Pradmenų projektavimo (design) ir PGR metodai gali būti atliekami kaip aprašyta ir paskelbta PCT paraiškoje WO2009/0029376 (Pavyzdys Nr. 1). PGR produktas buvo skaldomas DpnI ir transformuotas į kompetentines ląsteles ER2833(pACYC-StylM0).

3. Styl-HF atranka

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

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

4. Styl-HF ir Styl-WT palyginimas

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

Lentelė 6: Styl-HF ir Styl-WT palyginimas

Buferis	HindIII-HF		HindIII-WT		Pagerini mo faktorius
	Santykinis aktyvumas	FI	Santykinis aktyvumas	FI	

NEB1	50 %	≥4000	25 %	32	≥125
NEB2	100 %	2000	100 %	16	125
NEB3	0,4 %	≥16	50 %	32	≥0,5
NEB4	50 %	4000	25 %	16	250

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

Pavyzdys 6: HF BsaJI konstravimas

1. BsaJI raiška

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

2. BsaJI-HF mutagenėzė

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

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

3. BsaJI-HF atrinkimas

BsaJI-HF atrinkimas buvo atliekamas naudojant BEB3 ir NEB4 palyginimą ir naudojant pBR322 DNR kaip substratą. E198A ir D200A turi didžiausią aktyvumą.

D200A turėjo NEB4 buferyje žymiai mažesnę žvaigždinę aktyvumą, negu WT. BsaJI(D200A) yra pavadintas BsaJI-HF.

4. BsaJI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER3081* (pRRS-BsaJIR(D200A)+M) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp, 33 µg/ml Cam ir 0,5 mM IPTG prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 50-yje ml 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po 30 minučių centrifugavimo prie 15000 rpm, supernatantas švirkštu buvo leidžiamas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Amicon® Ultra 30KDa (Millipore, U.S. A; dabar Merck, Germany). Į koncentruotą BsaJI-HF buvo pridėtas toks pat tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. BsaJI-HF ir BsaJI-WT palyginimas

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

Lentelė 7: BsaJI-HF ir BsaJI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 7: HF BsaWI konstravimas

1. BsaWI raiška

BsaWI raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pLacZZ1-BsaWIR ir

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

2. BsaWI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 9, 10, 13, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 39, 42, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 71, 74, 75, 78, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 88, 89, 92, 93, 96, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 107, 109, 113, 114, 115, 117, 121, 112, 123, 124, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 145, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 160, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 181, 184, 189, 195, 196, 197, 200, 202, 203, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 218, 219, 221, 222, 228, 229, 230, 231, 233, 234, 237, 239, 241, 243, 247, 248, 250, 251, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 264, ir 266; o Tyr yra pakeista į Phe padėtyse 11, 57, 106, 147, 157, 215, 224, 236 ir 265.

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

3. BsaWI-HF atranka

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

4. BsaWI-HF gryninimas

Du litrai *ER3081* (pLacZZI-BsaWI(Q261A), pACYC-MspIM)) buvo auginamos 30 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml. Po 8 val. kultūra buvo indukuota 0,5 mM IPTG. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min supernatantas buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc.,

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

5. BsaWI-HF ir BsaWI-WT palyginimas

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

Lentelė 8: BsaWI-HF ir BsaWI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 8: Didelio tikslumo BglI konstravimas

1. BglI raiška

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

2. BglI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 34, 36, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 52, 54, 5, 57, 60, 61, 65, 67, 68, 70, 71, 72,

73, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 107, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 128, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 152, 158, 159, 160, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 193, 194, 196, 197, 202, 203, 204, 205, 208, 211, 215, 216, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 234, 236, 239, 241, 242, 243, 245, 249, 250, 251, 255, 256, 259, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 279, 281, 283, 286, 287, 289, 290, ir 291 ; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 19, 13, 33, 53, 66, 119, 127, 153, 199, 218, 233, 252 ir 258.

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

2. BglI-HF atrinkimas

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

3. BglI-HF gryninimas

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

4. BglI-HF ir BglI-WT palyginimas

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

Lentelė 9: BglI-HF ir BglI-WT palyginimas

Buferis	BglI-HF		BglI-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	50 %	≥ 4000	25,0 %	64	≥ 62
NEB2	100 %	≥ 8000	100 %	64	≥ 125
NEB3	6,3 %	≥ 500	100 %	250	≥ 2
NEB4	100 %	≥ 8000	50 %	32	≥ 250

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

Pavyzdys 9: HF BsrDI konstravimas

1. BsrDI raiška

BsrDI fermentas turi du subvienetus: BsrDIA ir BsrDIB.

Norint gauti gryną BsrDIA subvienetą, buvo naudojama IMPACT (Intermediate Mediated purification with an Affinity Chitin-Binding Tag) sistema (NEB katalogas: E6901) vienos pakopos BsrDIA gryninimui. Trumpai sakant, BsrDIA genas buvo subklonuotas į pTXB1 vektorių, kuris po to buvo transformuotas į kompetentinį kamieną, turintį T7 polimerazę, kontroliuojamą lac operono (NEB Nr. ER2566). Po atrankos ir sekvenavimo buvo atrinktas tinkamas kamienas. Ląstelės buvo auginamos LB terpėje su ampicilinu (100 $\mu\text{g/ml}$) prie 37 °C iki OD₆₀₀ pasiekia 0,5. Tuomet buvo pridedama IPTG iki galutinės koncentracijos 0,4 mM dėl BsrDIA indukcijos 3 valandas. Ląstelių kultūra buvo išsodinta, resuspenduota lediniame kolonėlės buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM HCl) ir lizuota, veikiant ultragarsu. Gautas ląstelių lizatas buvo centrifuguojamas, norint pašalinti ląstelių nuolaužas. Po to, supernatantas buvo užneštas ant nulygsvarintos chitino kolonėlės. Po praplovimo su užnešimo buferiu, kolonėlė buvo inkubuota su skaldymo buferiu (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM NaCl

ir 50 mM DTT) prie 4 °C per naktį. Galiausiai, Btsl.A baltymas buvo eliuotas dialize prieš saugojimo buferį (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM KCl ir 50 % glicerolio).

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

2. BsrDI-HF mutagenėzė

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

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

3. BsrDI-HF atranka

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

Tolimesniam žvaigždinio aktyvumo sumažinimui, kombinuojant mutacijas,

buvo padaryti dvigubi mutantai: K363A/Q230A, K363A/K408A, Q230A/K408A. Tuomet BsrDI su mutacijomis Q230A/K363A ant BsrDIB yra pavadintas kaip BsrDI-HF.

4. BsrDI-HF gryninimas

Du litrai *ER2566*(pUC19-BsrDI(Q230A/K363A), pLG-BsrDIM1M2)) buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kam. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min supernatantas buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM-1M NaCl linijinis gradientas ir 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsrDI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

5. BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas

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

Lentelė 10: BsrDI-HF ir BsrDI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 10: HF Nsil konstravimas

1.Nsil raiška

Nsil raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose placz1-NsilR ir pACYX-NsilR M, kiekviena turi NsilR endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

2. Nsil-HF mutagenezė

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

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

3. Nsil-HF atranka

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

4. Nsil-HF gryninimas

Du litrai *ER3081* (placzzl- Nsil(F376A), pACYC-NsilM)) buvo auginamos 37 °C per naktį LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam ir 0,5 mM IPTG. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 50 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 min. Supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5 ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ), iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to sekanti 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl pakopa. Po to testuotas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruotos Amicon Ultra 30 KDa (Millipore, U.S.A.; dabar Merck, Germany). Į koncentruotą Nsil-HF buvo pridamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. Nsil-HF ir Nsil-WT palyginimas

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

Lentelė 11: Nsil-HF ir Nsil-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 11: DpnII konstravimas

1. DpnII raiška

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

2. DpnII mutagenėzė

Atrinktų mutacijų taškinė mutagenėzė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu.

DpnII buvo padarytos sekancios 189 aminorūgščių mutacijos: Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mutuotos į Ala. Try buvo mutuotas į Phe. Tai buvo: 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 69, 76, 77, 78, 80, 81, 82, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 125, 126, 129, 130, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 164, 168, 169, 171, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 180, 181, 183, 184, 186, 188, 189, 191, 192, 193, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 208, 211, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 254, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 272, 274, 275, 277, 278, 280, 281 ir 282.

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

3. DpnII-HF atranka

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

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

4. DpnII-HF gryninimas

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

10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos, turinčios didžiausią aktyvumą buvo toliau koncentruojamos. Į koncentruotą DpnII-HF buvo pridėtas toks pat tūris glicerolio ir laikoma prie -20 °C.

5. DpnII-HF ir DpnII-WT palyginimas

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

Lentelė 12: DpnII-HF ir DpnII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 12: Didelio tikslumo BclI konstravimas

1. BclI raiška

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

2. BclI-HF atranka

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

Y192F. BclI(Y192F) yra pavadintas kaip BclI-HF.

4. BclI-HF gryninimas

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

5. BclI-HF ir BclI-WT palyginimas

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

Lentelė 13: BclI-HF ir BclI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 13: HF BglII konstravimas

1. BglII raiška

BglII raiška buvo vykdoma *E.coli*, transformuotose pLacZZ-BglIIR ir pACYC-

BglIIIM, kurių kiekviena turi BglII endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 37 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Cam.

2. BglII-HF mutagenezė

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

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

3. BglII-HF atranka

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

4. BglII-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER3081*(pLacZZ-BglII(N208A), pACYC184-BglIIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas buvo užneštas ant 5ml

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

4. BgIII-HF ir BgIII-WT palyginimas

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

Lentelė 14: BgIII-HF ir BgIII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 14: HF BstEII konstravimas

1. BstEII raiška

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

2. BstEII-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 9, 10, 14, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 32, 36, 37, 40, 41, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 72, 75, 76, 79,

80, 81, 82, 83, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 98, 99, 101, 102, 103, 105, 106, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 147, 150, 151, 152, 154, 155, 157, 160, 161, 162, 163, 165, 166, 167, 171, 172, 175, 176, 178, 179, 180, 182, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 199, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 227, 228, 232, 233, 234, 236, 238, 243, 244, 245, 246, 247, 251, 252, 255, 256, 258, 261, 262, 264, 265, 266, 272, 274, 277, 278, 279, 281; o Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 8, 15, 24, 27, 35, 43, 77, 129, 131, 139, 156, 188, 203, 229, 257 ir 263.

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

3. BstEII-HF atranka

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

4. BstEII-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER2683*(pUC19-BstEII(R105), pACYC-BstEIIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Po to buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH,

Goettingen, Germany). Į koncentruotą BstEII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikomas -20 °C.

5. BstEII-HF ir BstEII-WT palyginimas

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

Lentelė 15: BstEII-HF ir BstEII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 15: HF BanII konstravimas

1. BanII raiška

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

2. BanII mutagenezė

Visos liekanos, išskyrus Tyr (ir tas, kurios jau buvo Ala) buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 35, 38, 39, 43, 44, 45, 47, 49, 54, 59, 61, 63, 64, 66, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 81, 83, 84, 87, 88, 92, 94, 95, 96, 97, 99, 100, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 135, 139, 142, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 152, 153, 155, 156, 163, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 183, 184, 186, 190, 191, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 207, 208, 211, 213, 214, 215, 216, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 239, 240, 242, 245, 246, 247, 248, 252, 254, 256, 257, 258, 259, 261, 262, 263, 264, 266, 267, 270, 271, 272, 274, 276, 278, 279, 281, 284, 285, 286, 287, 289,

291, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 302, 303, 305, 309, 311, 312, 314, 317, 318, 319, 322, 326, 327, 328, 330, 331, 334, 338, 339, 341, 342, 344, 346, 347, 348, 349, 351, 352, 355, 356 ir 358; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 27, 50, 80, 160, 182, 197, 244, 251, 260, 307 ir 313.

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

3. BanII-HF atranka

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

2. BanII gryninimas

Du litrai ląstelių *ER2566*(pUC19-BanII(R126A),pACYC-BanIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BanII-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. BanII-HF ir BanII-WT palyginimas

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

Lentelė 16: BanII-HF ir BanII-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 16: HF PspGI konstravimas

1. PspGI raiška

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

2. PspGI-HF mutagenezė

PspGI baltymo ilgis yra 272 aminorūgštys. Visos PspGI baltymo 166 a.r. vietos buvo numatytos mutuoti į Ala (arba Phe). Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Trp buvo mututos į Ala. Try buvo mutuota į Phe. Tai buvo: 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 32, 34, 35, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 60, 61, 62, 65, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 82, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 109, 110, 113, 134, 135, 136, 137, 138, 142, 143, 145, 149, 150, 151, 152, 153, 158, 160, 161, 162, 164 ir 165. Mutagenezė buvo atlikta atvirkštinės PGR metodu su poriniais pradmenimis ir po to sekančiu skaldymu DpnI. Apdorotas produktas buvo tuomet transformuotas į *E. coli* ER2984 kamieną.

3. PspGI-HF atranka

PspGI-HF atranka buvo atlikta naudojant mutantų ir WT aktyvumo palyginimą NEB4 buferyje ir naudojant pBC4 DNR kaip substratą. PspGI atrankos bandymai buvo atliekami naudojant pBC4 DNR kaip substratą NEB4 buferyje (2h skaldymas prie 69 °C). Rasta 11 mutantų, turinčių didesnę aktyvumą, negu WT NEB4 buferyje: T20A,

P52A, Y67F, K68A, R75A, E86A, Q90A, S91A, Q93A, H121A ir G172A. PspGI (R75A) turėjo daug didesnį aktyvumą, negu WT NEB4 buferyje. Paprastai, mutantas su didžiausiu aktyvumu NEB4 turi pagerintą žvaigždinį aktyvumą. Po keleto ciklų palyginimų skirtingomis sąlygomis ir esant skirtingiems substratams, rasta, kad PspGI yra pageidaujamas mutantas, išlaikantis aukštą skėlimo aktyvumą, bet rodantis iš esmės sumažintą žvaigždinį aktyvumą. PspGI (R75A) yra pavadintas PspGI-HF.

4. PspGI-HF gryninimas

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

5. PspGI-HF ir PspGI-WT palyginimas

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

Lentelė 17: PspGI-HF ir PspGI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 17: HF Spel konstravimas

1. Spel raiška

Spel raiška buvo vykdoma *E. coli*, transformuotose pRRS-Spel ir pASYX20-SpelM9, kiekviena turi Spel endonukleazės ir metilazės geną. Ląstelės buvo auginamos prie 30 °C per naktį LB terpėje su Amp ir Kan.

2. Spel-HF mutagenezė

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

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

3. Spel-HF atranka

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

3. Spel-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER 3081*(pRRS-SpelM7(P065A), pSYX20-SpelM9)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po

centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą Spel-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. Spel-HF ir Spel-WT palyginimas

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

Lentelė 18: Spel-HF ir Spel-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 18: HF BsmAI konstravimas

1. BsmAI raiška

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

2. BsmAI-HF mutagenezė

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

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

3. BsmAI-HF atranka

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

4. BsmAI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *EK2566*(pBAD241-BsmAI(N212A), pACYC184-BsmAIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Po to ląstelės buvo indukuotos 4 val. arabinoze, kurios galutinė koncentracija 0,2 %. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-1M NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. Frakcijos su didesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BsmAI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. BsmAI-HF ir BsmAI-WT palyginimas

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

Lentelė 19: BsmAI-HF ir BsmAI-WT palyginimas

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

BsmAI-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB1 ir NEB4 buferiuose, kur FI buvo

≥ 4000 ; BsmAI-WT aktyviausias buvo NEB4, kur FI buvo 250. Taigi, bendras pagerinimo faktorius yra $\geq 4000/250 = \geq 16$.

Pavyzdys 19: HF BstXI konstravimas

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

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

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

Lentelė 20: BstXI-HF ir BstXI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 20: HF SfiI konstravimas

1. SfiI raiška

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

2. SfiI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 29, 30, 32, 33,

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

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

3. Sfil-HF atranka

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

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

4. Sfil-HF gryninimas

Du litrai ląstelių ER2169(pRRS-Sfil(R114A), pSX33-SfilM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Kan prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl

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

5. Sfil-HF ir Sfil-WT palyginimas

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

Lentelė 21: Sfil-HF ir Sfil-WT palyginimas

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

Sfil-HF didžiausią aktyvumą rodė NEB4 buferyje, kur FI buvo ≥8000; Sfil-WT aktyviausias buvo NEB3, kuriame FI buvo 2000. Bendras pagerinimo faktorius FI yra $\geq 8000/2000 = \geq 4$.

Pavyzdys 21: HF Pmel konstravimas

1. Pmel raiška

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

2. Pmel-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 10, 13, 14, 17, 20, 21, 22, 25, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 37, 39, 41, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 54, 55, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 87, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 121, 123, 124, 127, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 138, 145, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 160, 162, 165, 166, 167,

169, 170, 171, 172, 177, 180, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 190, 191, 192, 193, 194, 199, 200, 201, 202, 204, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 215, 218, 219, 221, 222, 223, 225; Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 111, 129, 146 ir 161.

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

3. Pmel-HF atranka

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

4. Pmel-HF gryninimas

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

5. Pmel-HF ir Pmel-WT palyginimas

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

(žemiau).

Lentelė 22: Pmel-HF ir Pmel-WT palyginimas

Buferis	Pmel-HF		Pmel-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	12,5 %	≥2000	100 %	250	≥64
NEB2	6,3 %	≥500	100 %	250	≥500
NEB3	0,4 %	≥32	50 %	120	≥125
NEB4	100 %	≥8000	25 %	64	≥500

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

Pavyzdys 21: HF Smal konstravimas

1. Smal raiška

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

2. Smal-HF mutagenezė

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

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

3. Smal-HF atranka

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

4. Smal-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2428(pRRS-Smal(F60L/S61R), pSYX20-SmalM) buvo

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

5. Smal-HF ir Smal-WT palyginimas

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

Lentelė 23: Smal-HF ir Smal-WT palyginimas

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

ND: nenustatyta

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

Pavyzdys 23: Didelio tikslumo AatII konstravimas

1. AatII raiška

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

2. AatII-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 45, 46, 49, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 83, 84, 86, 87, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 99, 100, 103, 104, 106, 107, 111, 113, 114, 117, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 153, 155, 156, 157, 160, 164, 165, 167, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 179, 181, 182, 186, 189, 191, 192, 193, 194, 196, 198, 200, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 213, 214, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 226, 228, 230, 231, 233, 235, 236, 237, 238, 240, 241, 244, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 262, 264, 265, 266, 268, 269, 272, 273, 275, 280, 281, 282, 283, 286, 298, 292, 293, 295, 296, 297, 298, 301, 302, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 317, 319, 321, 325, 327, 329, 330, 333, 334, 335, 336; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 82, 89, 98, 112, 232, 305 ir 306.

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

3. AatII-HF atranka

AatII-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą vandeniniame NEB4 su NEB Exol buferyje glicerolyje, naudojant pXba DNR kaip substratą. Mutantai, kurie rodė žvaigždinio aktyvumo pasikeitimus, esant glicerolio sąlygoms, buvo atrinkti tolimesniam tyrimui iki tol, kol jie turėjo panašų arba aukštesnį aktyvumą negu WT esant normalioms sąlygoms vandenyje. Po pradinės atrankos buvo atrinkta keletas mutantų tolimesniam tyrimui: G013A, G016A, K018A, P052A, R053A, K070A, E071A, D072A, G073A, S84A, E086A, R090A, K094A, R095A, P099A, P103A, K113A, N135A, S151A, P157A, G173A, T204A, S206A, K207A, E233A, N235A, E237A, S238A, D241A, K295A, S301A ir S302A. AatII(N235A) yra pavadintas kaip AatII-HF.

4. AatII-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EK2426(pRRS-AatII(N235A), pACYC184-AatIIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml

HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą AatII-HF buvo pridamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

3. AatII-HF ir AatII-WT palyginimas

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

Lentelė 24: AatII-HF ir AatII-WT palyginimas

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

NC: nežbaigta; ND: neišmatuojama

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

Pavyzdys 24: HF Apol konstravimas

1. Apol raiška

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

2. Apol-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin ir Arg, buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29,

33, 35, 36, 37, 39, 41, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 124, 125, 128, 129, 131, 132, 133, 136, 137, 143, 144, 145, 148, 153, 155, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 166, 167, 169, 170, 175, 176, 178, 179, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 199, 201, 202, 204, 206, 207, 209, 210, 214, 216, 217, 218, 221, 226, 227, 229 ir 230.

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

3. Apol-HF atranka

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

4. Apol-HF gryninimas

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

5. Apol-HF ir Apol-WT palyginimas

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

(žemiau).

Lentelė 24: Apol-HF ir Apol-WT palyginimas

Buferis	Apol-HF		Apol-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	50 %	≥2000	25 %	120	≥16
NEB2	100 %	≥4000	100 %	32	≥125
NEB3	25 %	≥1000	100 %	64	≥16
NEB4	50 %	≥2000	50 %	32	≥64

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

Pavyzdys 25: HF BsmBI konstravimas

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

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

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

Lentelė 26: BsmBI-HF ir BsmBI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 26: Didelio tikslumo Bmtl konstravimas

1. Bmtl raiška

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

2. Bmtl mutagenėzė

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

3. Bmtl-HF atranka

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

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

4. Bmtl-HF gryninimas

Du litrai *E. coli* ląstelių 3081 (placzz1-BmtlR(S50A), pACYC-BmtlM) buvo

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

5. Bmtl-HF ir Bmtl-WT palyginimas

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

Lentelė 27: Bmtl-HF ir Bmtl-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 27: HF BstNI konstravimas

1. BstNI raiška

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

2. BstNI-HF mutagenezė ir atranka

Serijos BstNI mutacijų sukūrimo eksperimento metu buvo surastas

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

3. BstNI-HF gryninimas

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

3. BstNI-HF ir BstNI-WT palyginimas

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

Lentelė 28: BstNI-HF ir BstNI-WT palyginimas

Buferis	BstNI-HF		BstNI-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	50 %	≥120	50 %	8	≥16
NEB2	100 %	≥500	100 %	64	8
NEB3	25 %	≥120	100 %	250	≥1/8
NEB4	100 %	500	50 %	4	≥32

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

Pavyzdys 28: HF MluI konstravimas**1. MluI raiška**

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

2. MluI mutagenezė

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

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

3. MluI-HF atranka

MluI-HF atranka buvo pasiekta panaudojant aktyvumo palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant lambda DNR kaip substratą. Buvo atrinkti mutantai su didesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra padidinto tikslumo indikatorius. Buvo rastas vienintelis mutantas, atitinkantis mūsų kriterijus buvo E112A/R132A; MluI(E112A/R132A) pavadintas MluI-HF.

4. MluI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių EKi582(pUC19-MluI(E112A/R132A), pACYC184- MluIM)) buvo auginamos LB terpėje su su 100 µg/ml Amp and 30 µg/ml Cam prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc.,

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

5. Mlul-HF ir Mlul-WT palyginimas

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

Lentelė 29: Mlul-HF ir Mlul-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 29: HF BanI konstravimas

1. BanI raiška

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

2. BanI-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 47, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 61, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 75, 76, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 100, 103, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 121, 122, 123, 124, 126, 130, 131, 133, 135, 136, 138,

139, 140, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 151, 152, 154, 156, 157, 160, 161, 169, 171, 174, 175, 176, 178, 179, 182, 183, 185, 187, 188, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 201, 202, 203, 208, 209, 211, 212, 213, 215, 217, 218, 220, 221, 224, 225, 226, 229, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 275, 277, 279, 281, 282, 283, 284, 285, 287, 288, 289, 291, 292, 294, 296, 298, 301, 302, 303, 304, 305, 312, 313, 315, 316, 318, 319, 320, 321, 324, 325, 328, 329, 330, 331, 333, 337, 338, 339, 340, 342, 346; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 104, 125, 127, 156, 159, 204, 239, 297, 306 ir 336.

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

3. BanI-HF atranka

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

4. BanI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių *ER2683*(pUC19-BanI(P154A), pACYC184-BanIM)) buvo auginamos LB terpėje su 100 µg/ml Amp ir 33 µg/ml Cam prie 37 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas

eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą BanI-HF buvo pridamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. BanI-HF ir BanI-WT palyginimas

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

Lentelė 30: BanI-HF ir BanI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 30: HF KasI konstravimas

1. KasI raiška

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

2. KasI-HF mutagenezė

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

248, 251, 253, 255, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 269, 270, 271, 274, 275, 276, 277 ir 278; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 19, 41, 74, 80, 95, 207 ir 256.

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

3. KasI-HF atranka

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

4. KasI-HF gryninimas

Du litrai ląstelių ER2683(pLacZZ-KasI(M251A), pACYC-SfoIM)) buvo auginama LB terpėje su 100 µg/ml Amp and 33 µg/ml Cam prie 30 °C per naktį. Ląstelės buvo surinktos ir veikiamos ultragarsu 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl. Po centrifugavimo prie 15000 rpm 30 minučių, supernatantas švirkštu buvo įleistas į 5ml HiTrap™ Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, dabar Pfizer, Inc., Piscataway, NJ) iš anksto subalansuotą su tuo pačiu buferiu. Į kolonėlę įleidžiama tokia eiga: 48 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50mM-IM NaCl linijinis gradientas ir po to 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl. Buvo tiriamas eliuotų frakcijų aktyvumas. frakcijos su aukštesniu aktyvumu buvo toliau koncentruojamos Vivaspin® 15R (Vivascience, dabar Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). Į koncentruotą KasI-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. KasI-HF ir kasI-WT palyginimas

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

Lentelė 31: KasI-HF ir KasI-WT palyginimas

Buferis	KasI-HF		KasI-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	50 %	≥8000	100 %	1	≥8000
NEB2	100 %	≥16000	100 %	8	≥2000

NEB3	12,5 %	≥ 2000	100 %	8	≥ 250
NEB4	100 %	≥ 16000	100 %	4	≥ 4000

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

Pavyzdys 31: HF Nrul konstravimas

1. Nrul raiška

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

2. Nrul-HF mutagenezė

Visos liekanos Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr buvo pakeistos į Ala padėtyse 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 34, 36, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 99, 101, 103, 104, 106, 107, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 124, 125, 127, 132, 134, 137, 138, 139, 141, 146, 147, 148, 149, 152, 154, 155, 157, 158, 159, 162, 163, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 174, 175, 177, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 189, 190, 191, 193, 196, 197, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211 ir 213; Tyr buvo pakeistas į Phe padėtyse 11, 31, 52, 69, 98, 64 ir 187.

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

3. Nrul-HF atranka

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

4. Nrul-HF gryninimas

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

5. Nrul-HF ir Nrul-WT palyginimas

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

Lentelė 32: Nrul-HF ir Nrul-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 32: HF Nspl konstravimas

1. Nspl raiška

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

2. Nspl-HF mutagenezė

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

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

3. Nspl-HF atranka

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

4. Nspl-HF gryninimas

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

Goettingen, Germany). Į koncentruotą Nspl-HF buvo pridedamas lygus tūris glicerolio ir laikoma -20 °C.

5. Nspl-HF ir Nspl-WT palyginimas

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

Lentelė 33: Nspl-HF ir Nspl-WT palyginimas

Buferis	Nspl-HF		Nspl-WT		Pagerinimo faktorius
	Aktyvumas	FI	Aktyvumas	FI	
NEB1	100 %	≥4000	100 %	250	≥16
NEB2	100 %	≥500	100 %	16	≥32
NEB3	12,5 %	≥250	25 %	120	≥50
NEB4	100 %	500	50 %	32	≥16

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

Pavyzdys 33: HF BsrFI konstravimas

1. BsrFI raiška

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

2. BsrFI-HF mutagenezė

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

250, 253, 254, 257, 258, 259, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 273, 276, 278, 279, 281, 282, 284 ir 285; Tyr yra pakeistas į Phe padėtyse 14, 34, 53, 90, 96, 99, 125, 160, 227, 236, 237.

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

3. BsrFI-HF atranka

BsrFI-HF atranka buvo pasiekta naudojant aktyvumų palyginimą NEB3 ir NEB4 buferiuose, naudojant pBR322 DNR kaip substratą. Mutantai su disesniu aktyvumu negu WT NEB4 buferyje buvo atrinkti, kadangi padidintas aktyvumas NEB4 yra padidinto tikslumo indikatorius. Buvo rasti sekantys mutantai, turintys didesnį aktyvumą NEB4: K021A/I031R ir T120A. BsrFI(K021A/I031R) yra pavadintas kaip BsrFI-HF.

4. BsrFI-HF gryninimas

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

5. BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas

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

Lentelė 35: BsrFI-HF ir BsrFI-WT palyginimas

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

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

Pavyzdys 34: HF BspEI konstravimas

1. BspEI raiška (SEQ ID Nr. 34)

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

2. BspEI-HF mutagenezė

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

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

3. BspEI-HF atranka

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

Pavyzdys 35: Didelio tikslumo BamHI konstravimas (papildomi mutantai)

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

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

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

SEQ ID Nr. 17

<120> Didelio tikslumo restrikcijos endonukleazės

<130> NEB-331-PCT

<150> 61/301,666

<151> 2010-02-05

<150> 61/387,800

<151> 2010-09-29

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 17

<211> 188

<212> PRT

<213> Sphaerotilus natans

<400> 17

Met Ser Ile Asp Pro Asn Lys Leu Asn Ser Ala Leu Tyr Ala Ile Leu

1 5 10 15

Gly Gly Tyr Arg Gly Lys Phe Ser Asn Lys Val Tyr Asn Gly Glu Asn

20 25 30

Asp Glu Phe Asp Ile Leu Met Glu Ile Phe Gly Ile Ser Pro Leu Leu

35 40 45

Lys Arg Glu Ser Arg Gln Tyr Trp Gly Arg Glu Leu Gly Met Cys Trp

50 55 60

Pro Arg Leu Val Val Glu Ile Cys Lys Gln Thr Arg Asn Asp Phe Gly

65 70 75 80

Ser Ala Leu Gln Ile Asp Gly Gly Glu Pro Cys Asp Leu Ile Val Gly

85 90 95

Gly Leu Ala Ile Glu Thr Lys Tyr Arg Ile Gly Ser Gly Asp Ala Gly
100 105 110

Thr Leu Lys Lys Phe Gln Ala Tyr Gly Ser Leu Leu Ser Ser Met Gly
115 120 125

Tyr Glu Pro Val Leu Leu Ile Val Arg Glu Asp Asn Leu Gly Ala Ala
130 135 140

Ile Thr Ala Cys His Ala Gly Gly Trp Thr Val Ile Thr Gly Gln Arg
145 150 155 160

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

Leu Leu Gln Arg Ala Gly Lys Phe Pro Val Val Arg
180 185

Išradimo apibrėžtis

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

2. Fermentas pagal 1 punktą, kur aminorūgšties mutacija yra parinkta iš grupės, susidedančios iš E059A, P065A, S108A, N172A, K174A, Q179A, G182A ir Y055F.

3. Fermentas pagal 1 arba 2 punktą, kur mutacija yra P065A.

4. Nukleorūgšties seka, koduojanti fermentą, turintį aminorūgščių seką pagal bet kurį 1-3 punktą.

5. Vektorius, apimantis nukleorūgšties seką pagal 4 punktą.

6. Ląstelė šeimininkė, apimanti nukleorūgšties seką pagal 4 punktą arba vektorių pagal 5 punktą.

FIG. 1A

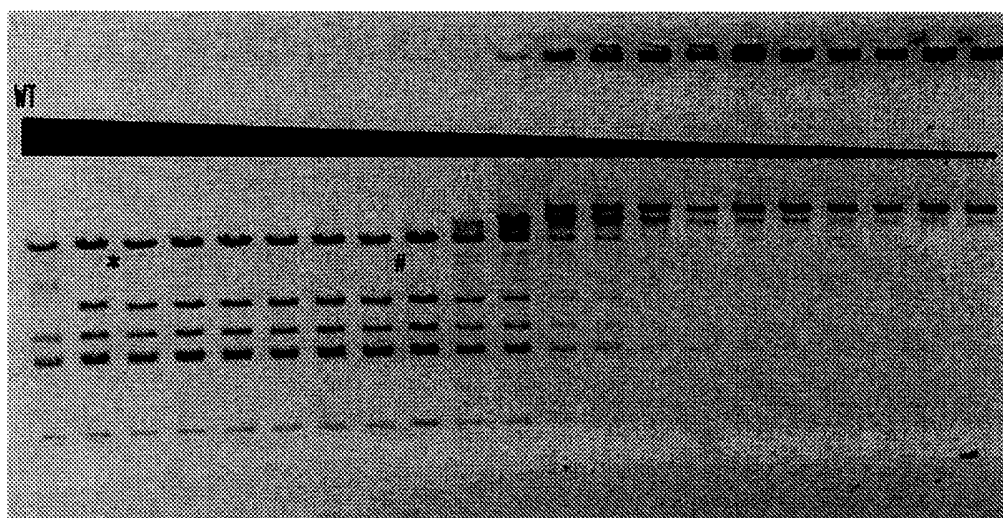


FIG. 1B

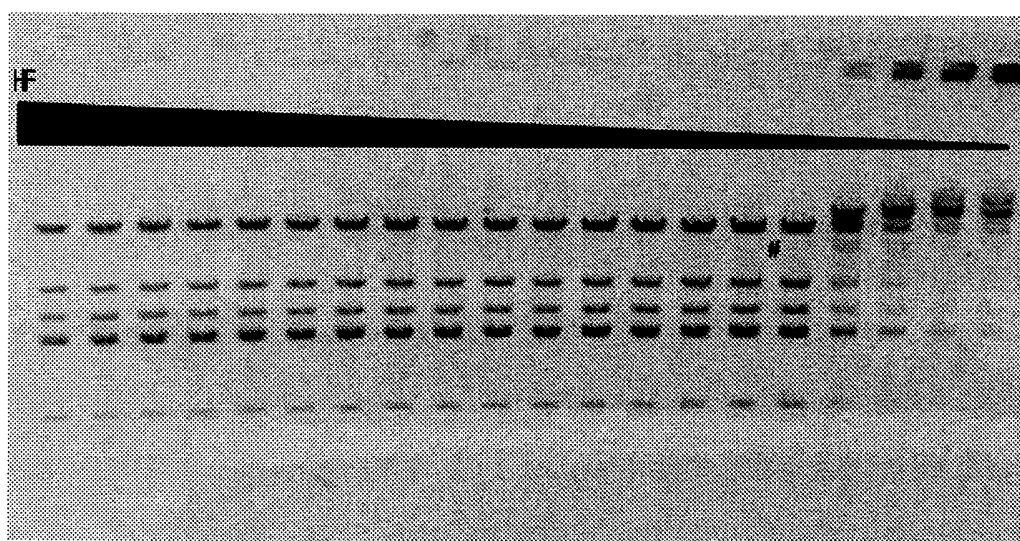


FIG. 2A

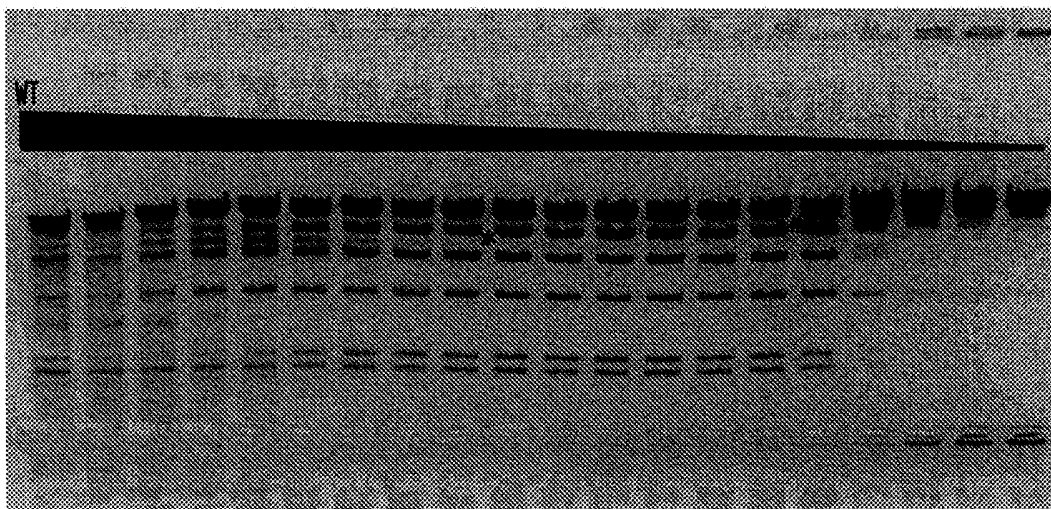


FIG. 2B

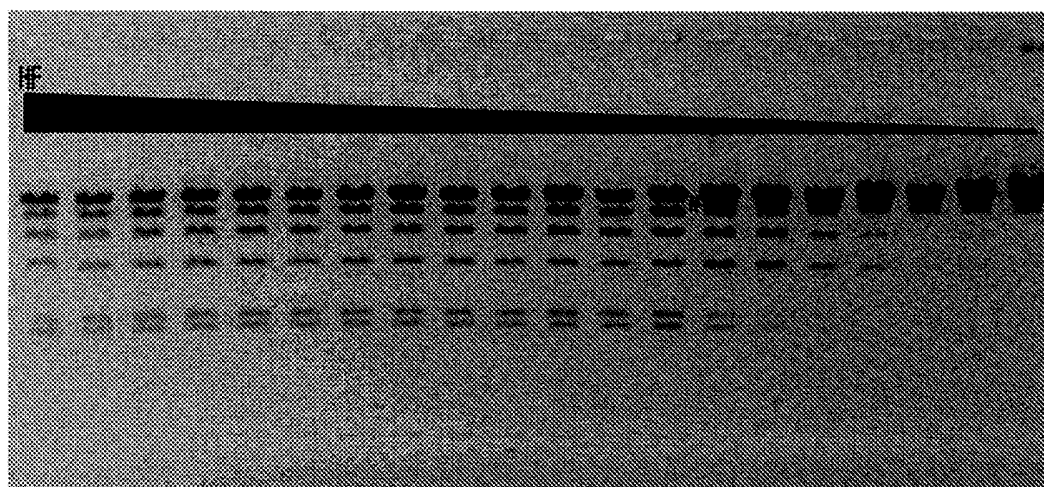


FIG. 3A

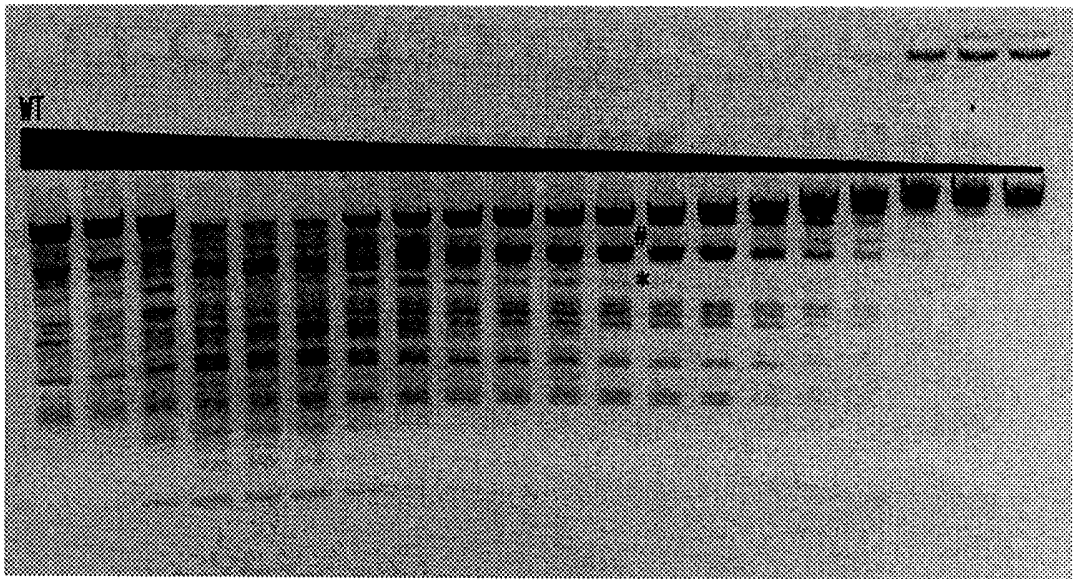


FIG. 3B

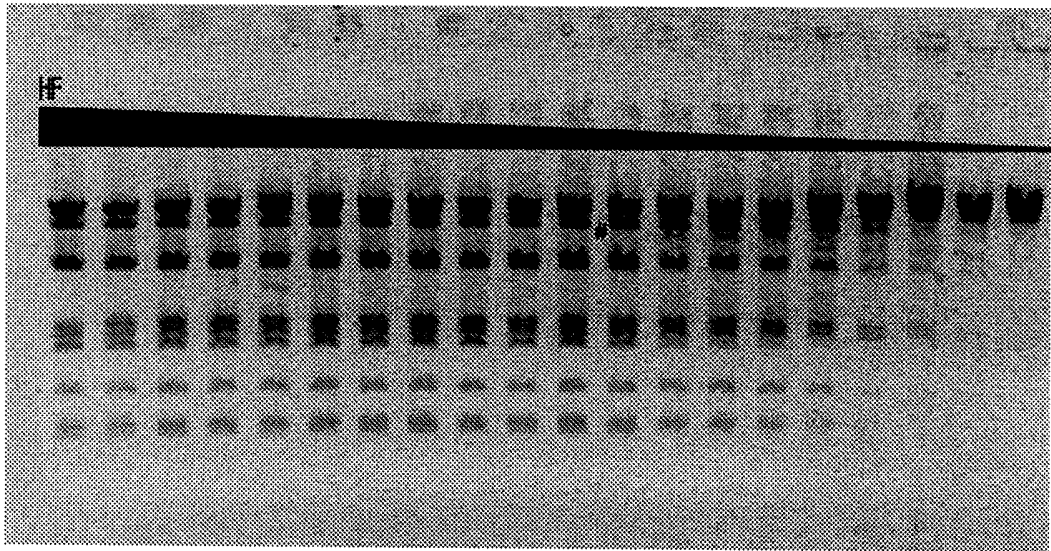


FIG. 4A

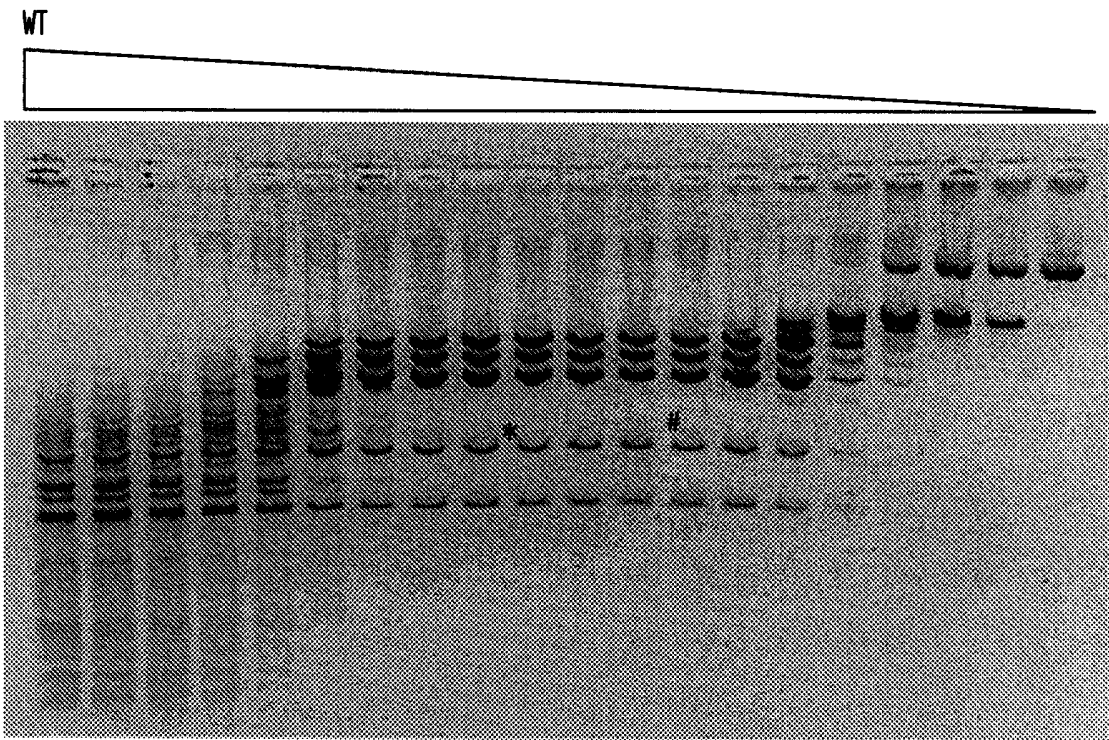


FIG. 4B

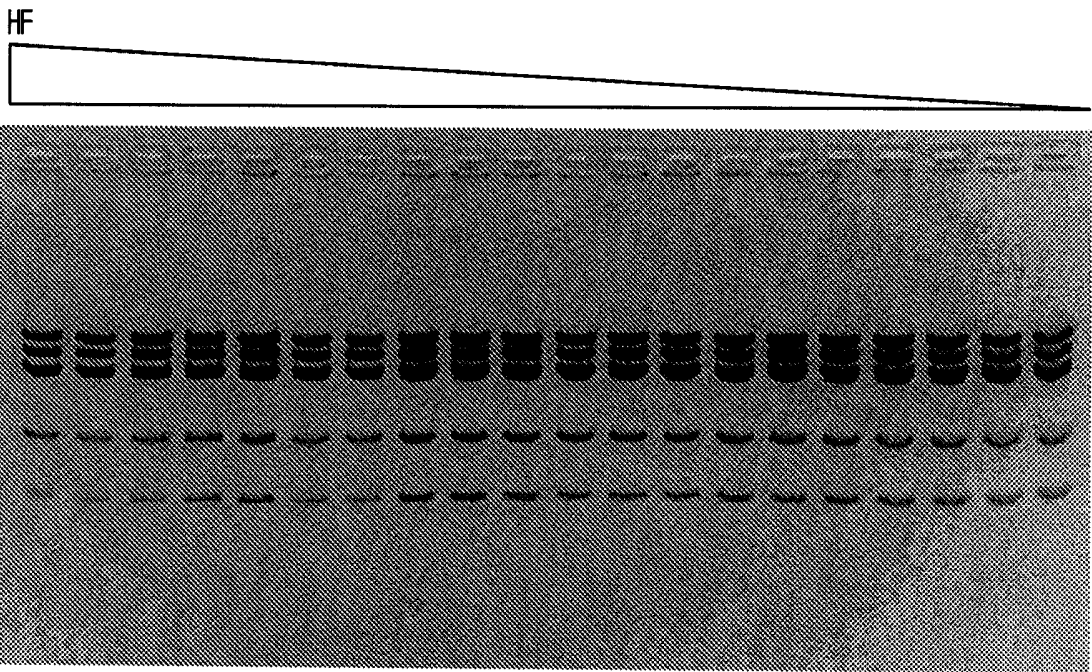


FIG. 5A

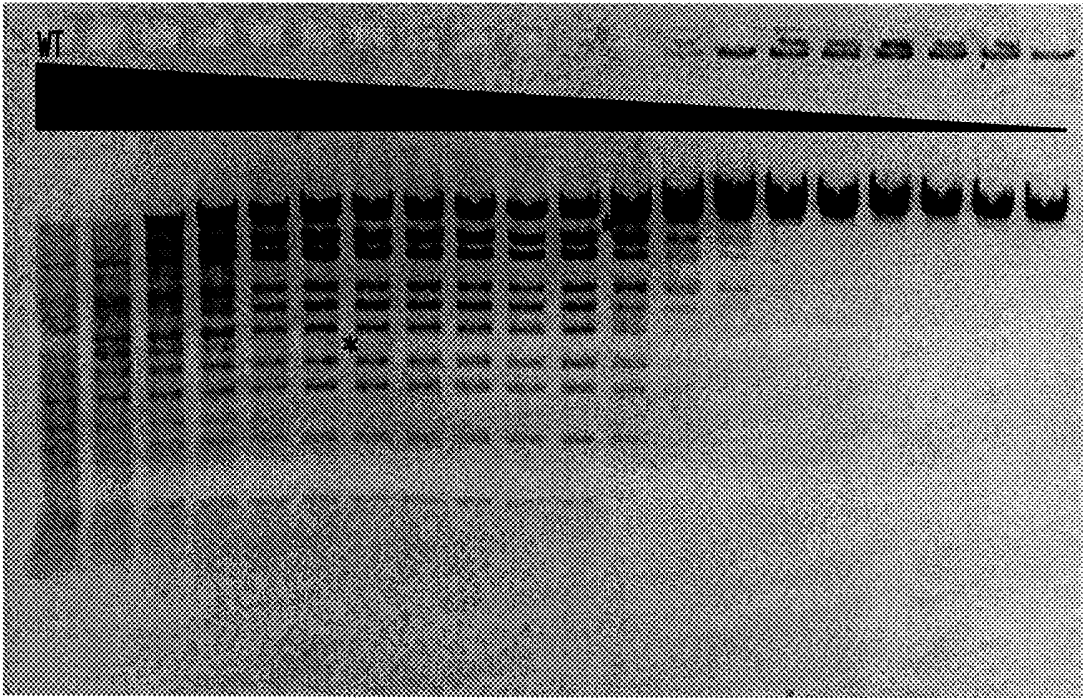


FIG. 5B

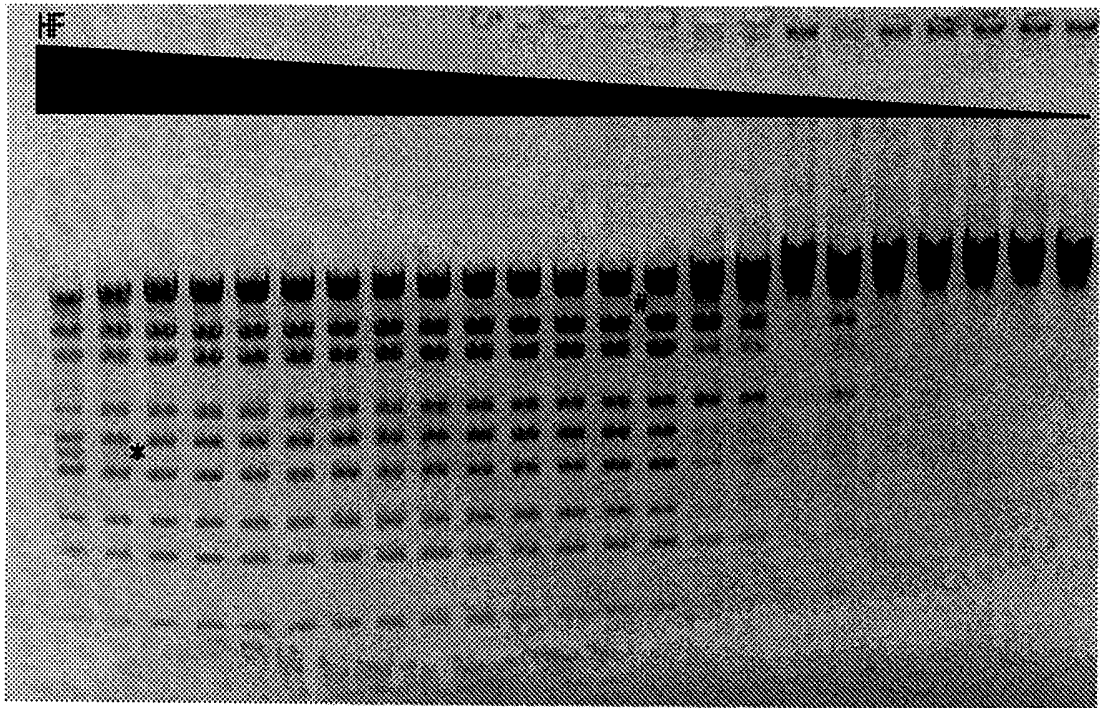


FIG. 6

WT

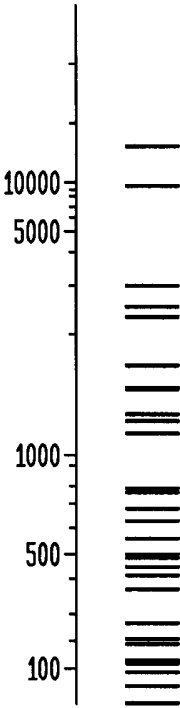
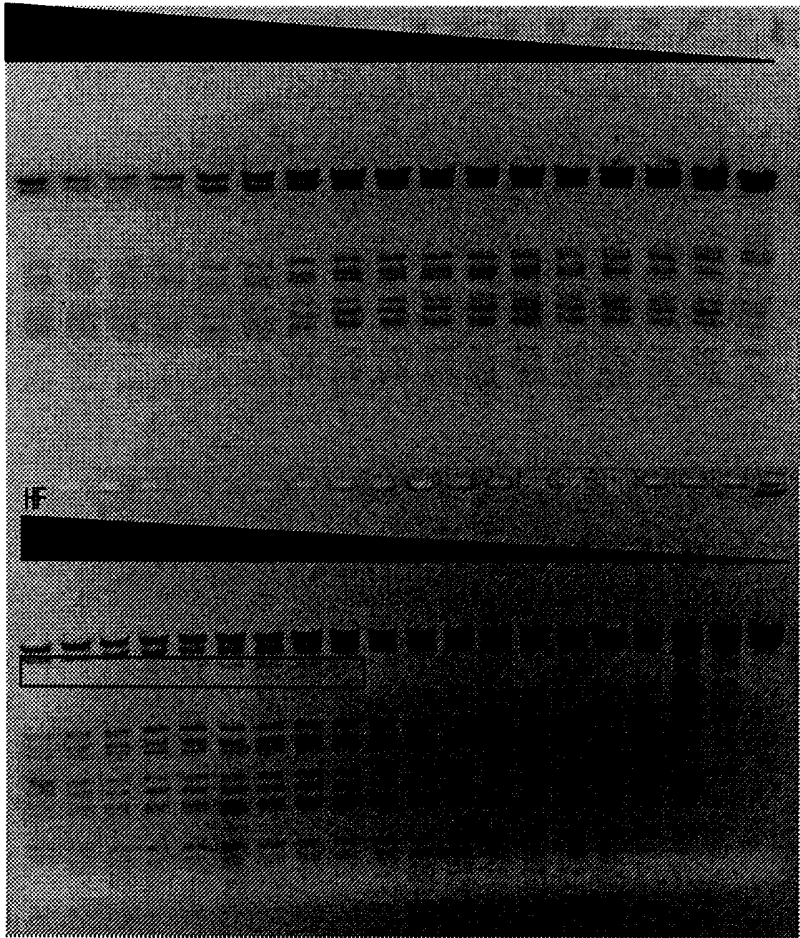


FIG. 7

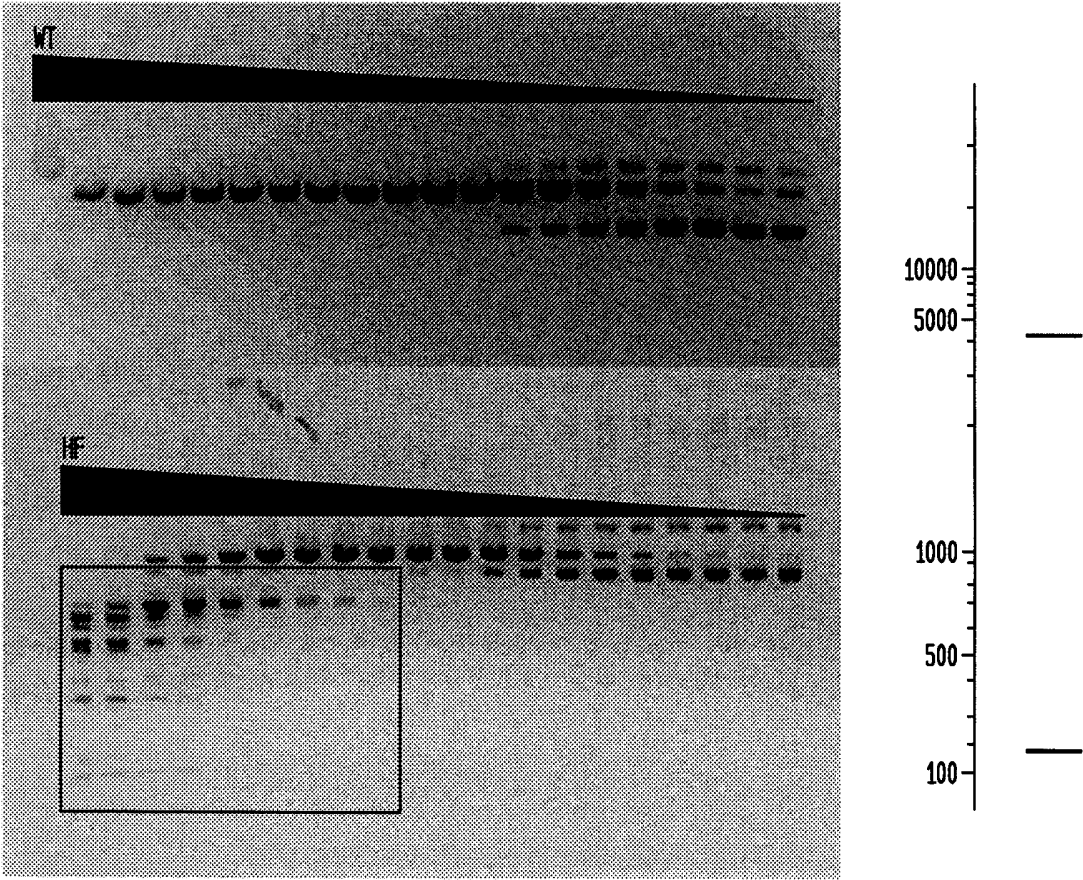


FIG. 8

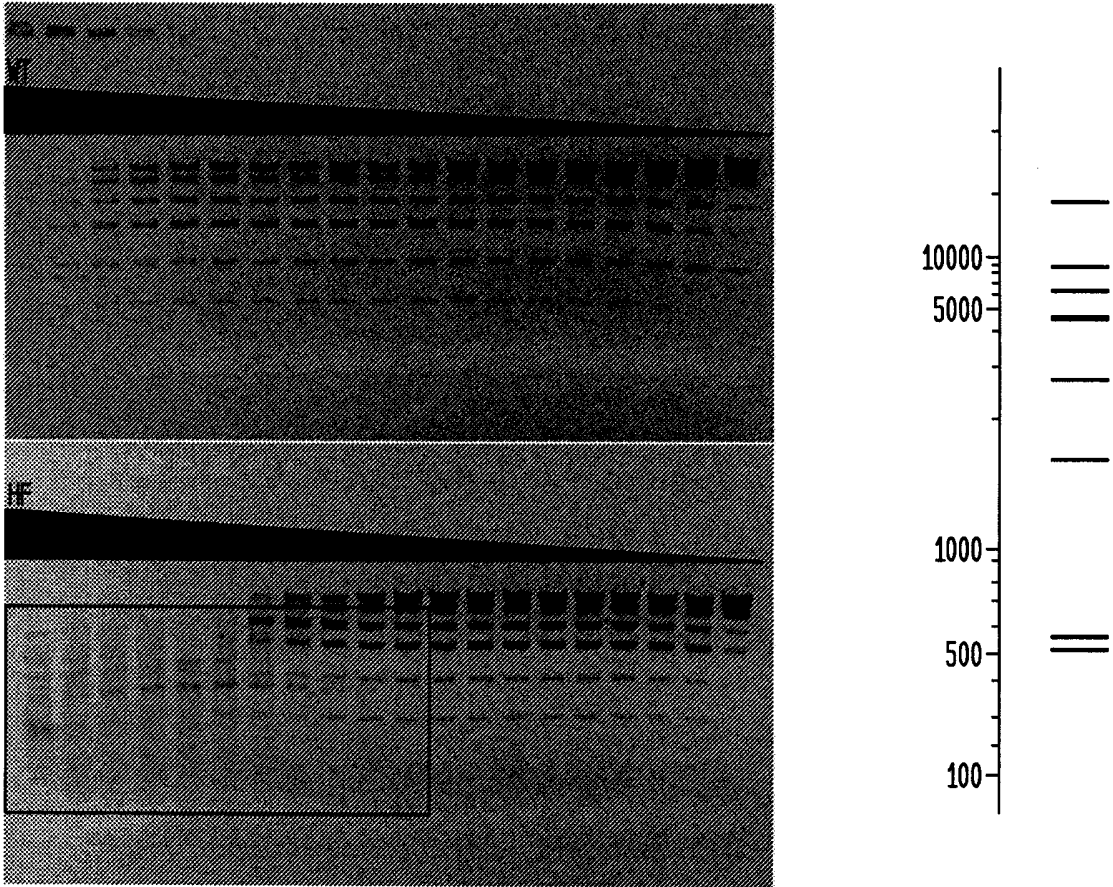


FIG. 9

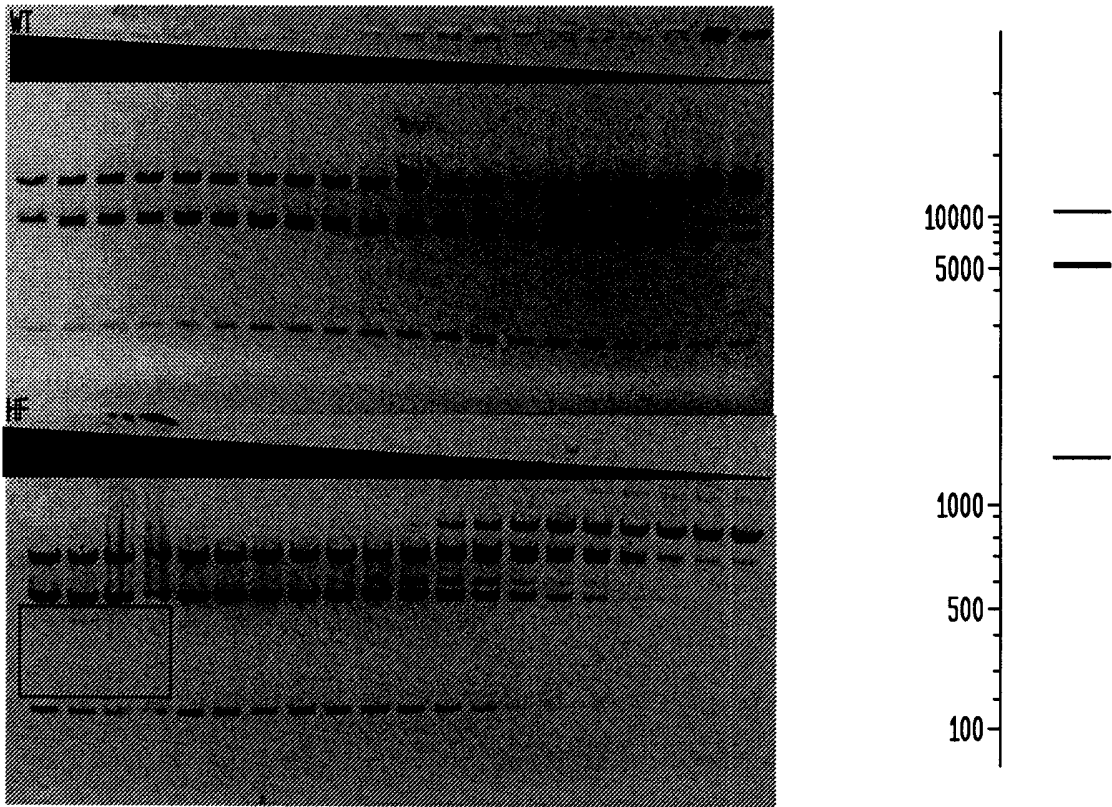


FIG. 10

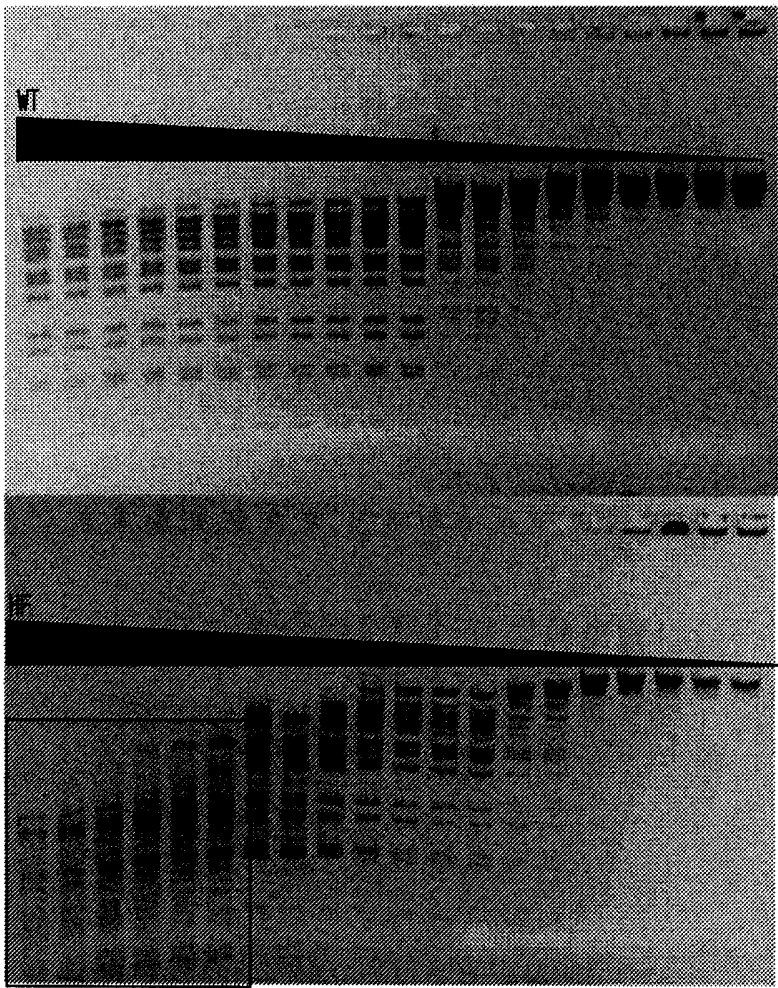
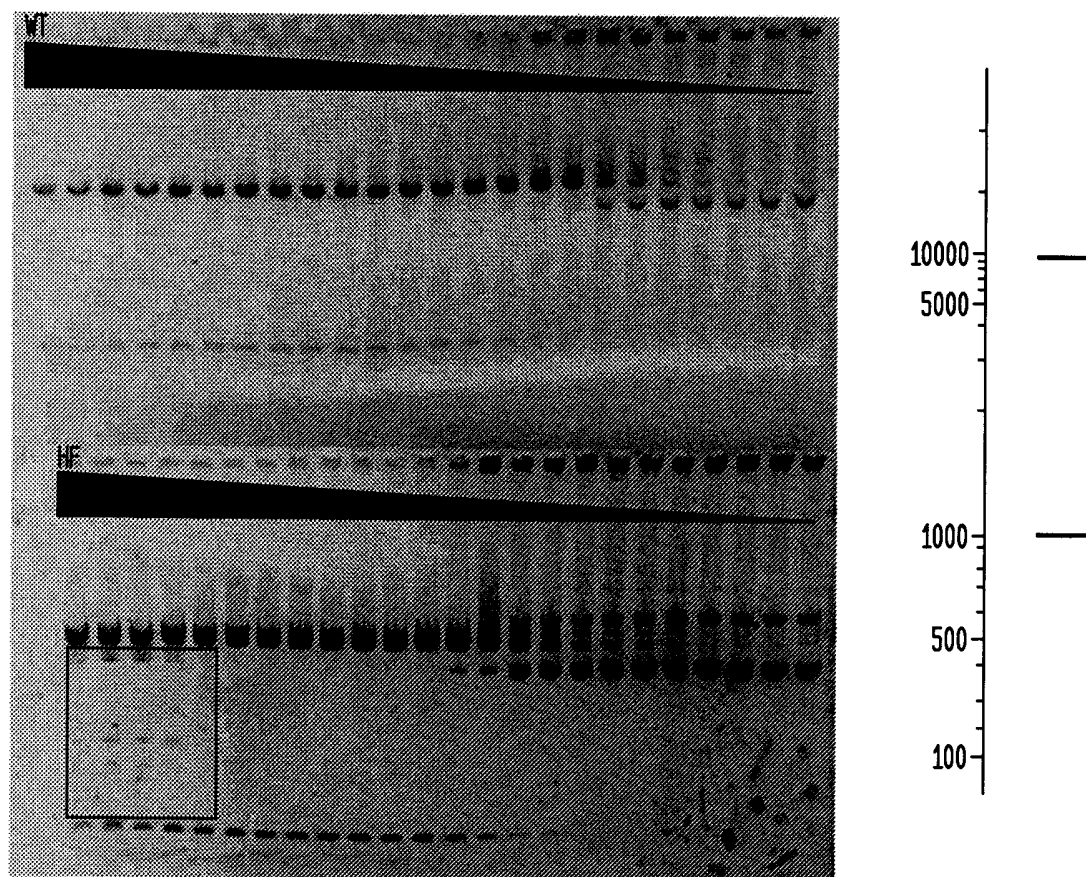


FIG. 11



WT

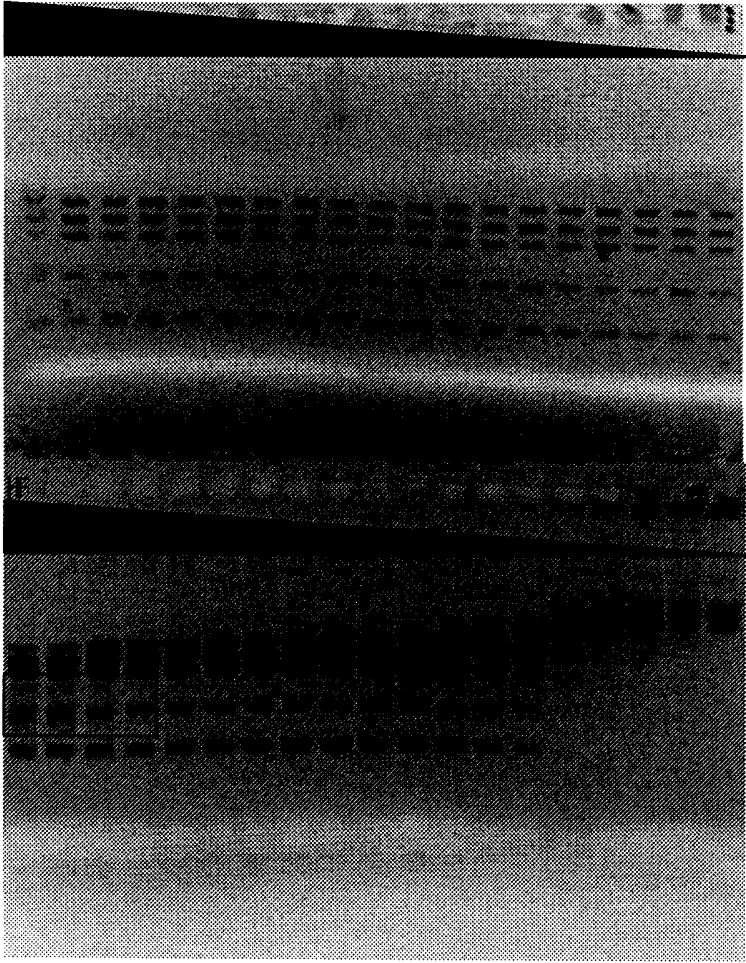


FIG. 12

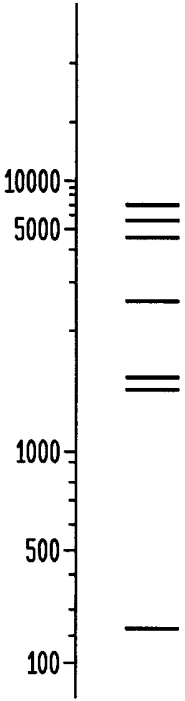


FIG. 13

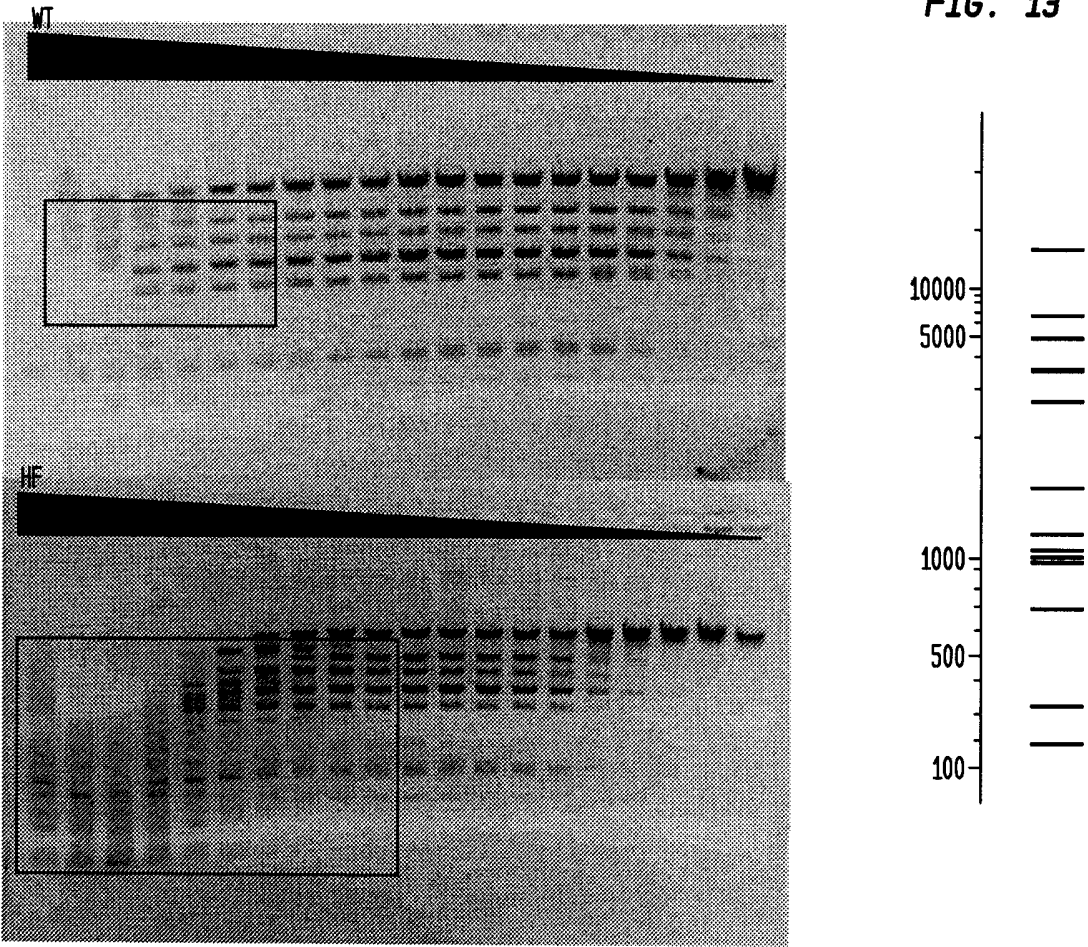


FIG. 14

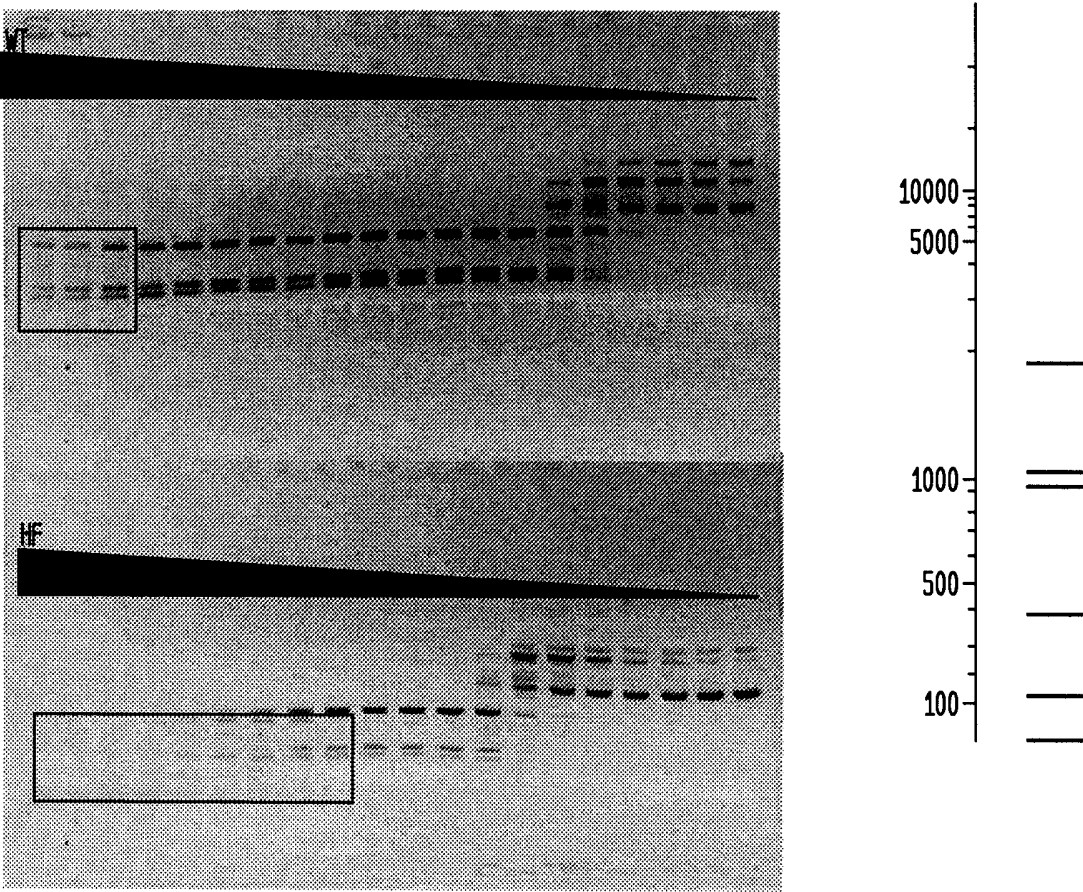


FIG. 15

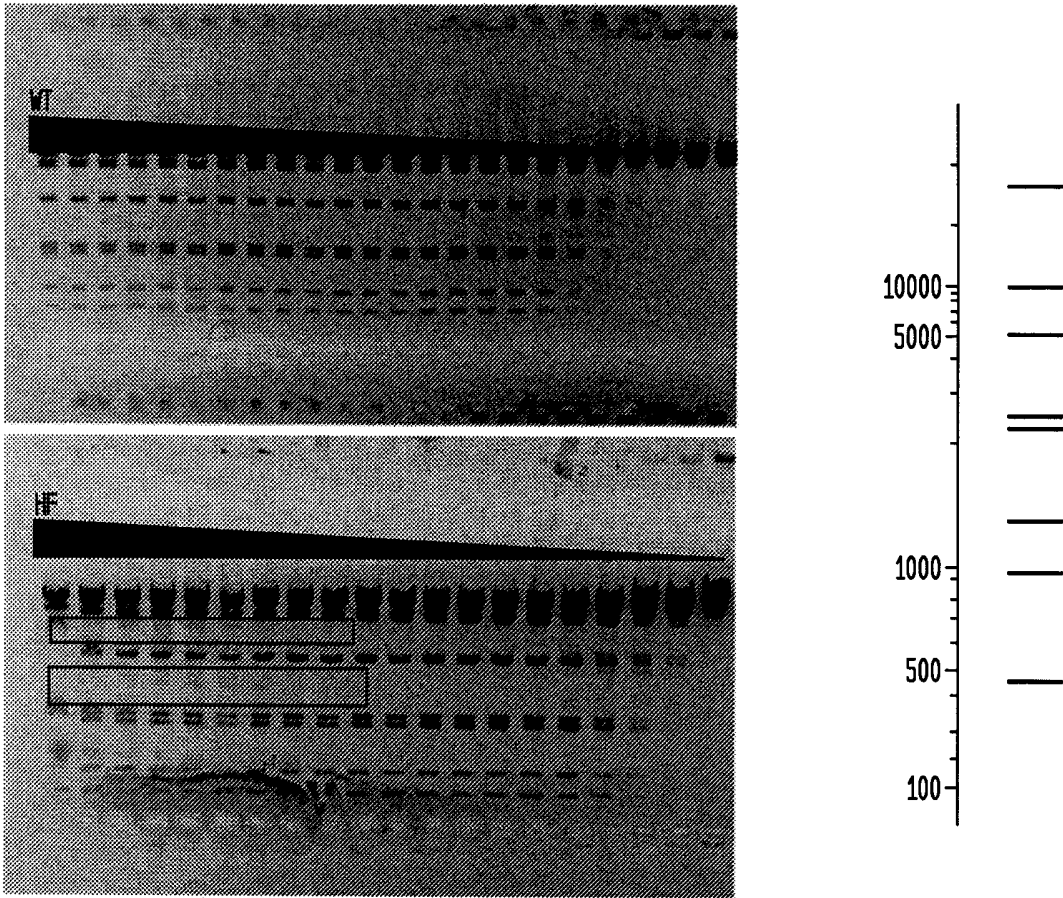


FIG. 16

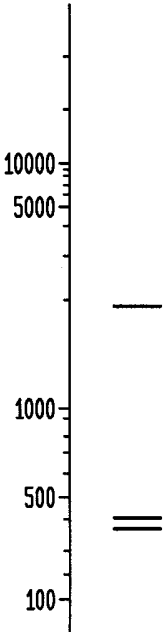
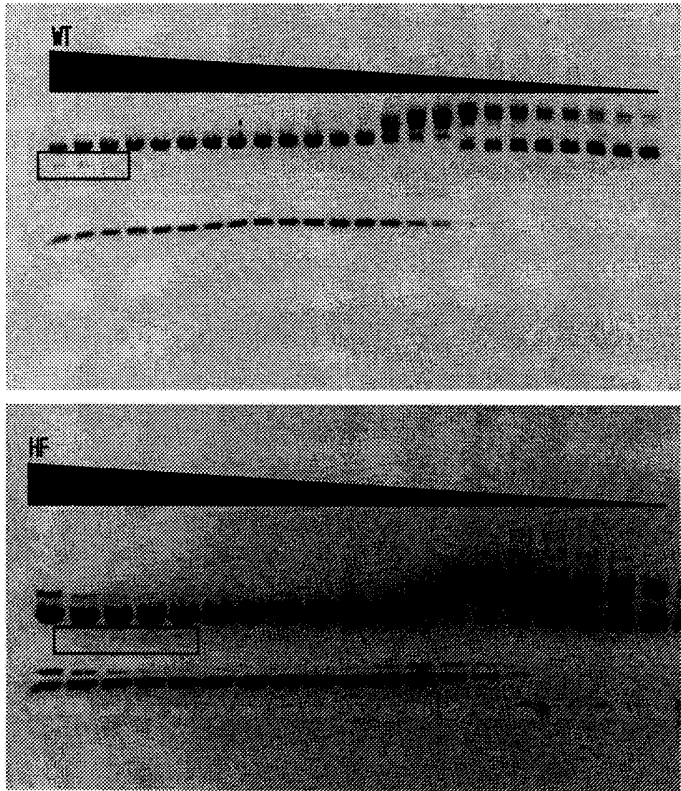


FIG. 17

