



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 436 404 B1**

(51) Int. Cl.  
*C12P 19/34 (2006.01)*  
*C12P 21/06 (2006.01)*  
*C07H 21/04 (2006.01)*  
*C12Q 1/68 (2006.01)*

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
 PATENDIKIRJELDUSE TÖLGE**

|                                                        |                                         |                        |                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (10) Registreeringu number:                            | <b>E004066</b>                          | (73) Patendiomanik:    | <b>ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.</b><br><b>352 Knotter Drive,</b><br><b>Cheshire, CT 06410, US</b> |
| (11) Patendikirjelduse tõlke number:                   | <b>EE-EP 1 436 404</b>                  | (72) Leiutise autorid: | <b>BOWDISH, Katherine, S.</b><br><b>13773 Boquita Drive, Del Mar, CA 92014, US</b>                 |
| (30) Prioriteediandmed:                                | <b>19.09.2001</b><br><b>US 323455 P</b> |                        | <b>FREDERICKSON, Shana</b><br><b>508 N. Rios Avenue,</b><br><b>Solana Beach, CA 92075, US</b>      |
| (96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:        | <b>19.09.2002</b>                       |                        | <b>MARUYAMA, Toshiaki</b><br><b>3253 Caminito Eastbluff 28,</b><br><b>LaJolla, CA 92037, US</b>    |
| (96) Euroopa patendi-taotluse number:                  | <b>02775901.8</b>                       |                        | <b>LIN, Ying-Chi</b><br><b>4259 Robbins Street,</b><br><b>San Diego, CA 92122, US</b>              |
| (97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: | <b>11.11.2009</b>                       |                        | <b>RENSHAW, Mark</b><br><b>12725 Moran Way, San Diego, CA 92129, US</b>                            |
| (97) Euroopa patendi number:                           | <b>EP 1 436 404</b>                     | (74) Patendivolinik:   | <b>Juhan Hämmalov</b><br><b>OÜ Intels</b><br><b>Riia 11-3, 51010 Tartu, EE</b>                     |
| Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:             | <b>27.01.2010</b>                       |                        |                                                                                                    |
| Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:        | <b>15.04.2010</b>                       |                        |                                                                                                    |

(54) Konstrueeritud matriitsid ja nende kasutamine üksikpraimeri amplifikatsioonis

## KONSTRUEERITUD MATRIITSID JA NENDE KASUTAMINE ÜKSIKPRAIMERI AMPLIFIKATSIOONIS

### 5    **Tehnikavaldkond**

Käesolev leiutis käsitleb konstrueeritud matriitse, mis on mõeldud kasutamiseks nukleiinhappe sihtmärkjärjestuse amplifitseerimiseks. Leiutis käsitleb täpsemalt pesistatud oligonukleotiidi ekstensioonireaktsiooniga (NOER) saadud konstrueeritud matriitse, mis sisaldavad oma vastasotstes komplementaarseid järjestusi. Konstrueeritud matriits võimaldab konstrueeritud maatriksis sihtmärkjärjestuse amplifitseerimiseks üksikpraimeri amplifikatsiooni (SPA). Eriti kasulikes teostusviisides on polüpeptiidide või proteiinide raamatukogu, nagu näiteks antikeha raamatukogu saamiseks konstrueeritud maatriksite sihtmärkjärjestused kloonitud ekspressioonivehiikulitesse.

15

### **Leiutustase**

Nukleiinhappe amplifikatsiooni meetodid ja amplifikatsiooniproduktide avastamismeetodid võimaldavad nukleiinhappejärjestuste avastamist, identifitseerimist, kvantiseerimist ja järjestusanalüüsi. Nukleiinhappe amplifikatsioon kujutab endast olulist astet sarnastest geenidest, nagu näiteks antikehade geenidest, raamatukogude koostamisel. Neid raamatukogusid võib skriinida spetsiifiliste, soovitud aktiivsusega antikehade suhtes. Nukleiinhappeanalüüs on olulise tähtsusega patogeenide avastamisel ja identifitseerimisel, defineeritud fenotüüpe andvate geenimuutuste avastamisel, geneetiliste haiguste või haigusele vastuvõtlikkuse diagnoosimisel, arengus, haiguse korral ja teatud stiimulile vastureaktsioonis geeniekspressiooni hindamisel, aga samuti erinevates genoomiprojektides. Nukleiinhappe amplifikatsioonimeetodi teisteks rakendusteks on haruldaste rakkude avastamine, patogeenide avastamine ja pahaloomuliste haigusseisundite korral muutunud geeniekspressioonide avastamine jms.

Nukleiinhappe amplifikatsioon on kasutatav ka defineeritud geenijärjestuste kvalita-

30

tiivses analüüsis (nagu näiteks defineeritud nukleiinhappejärjestuste avastamiseks) ning defineeritud nukleiinhappejärjestuste kvantiseerimisel (kasutatav, näiteks patogeensete järjestuste hulga hindamiseks, aga samuti ka geeni multiplikatsiooni või deletsiooni ning normaalse raku pahaloomuliseks rakutüübiks transformeerumise määramisel jne).

- 5 Nukleiinhappejärjestuses järjestuse muutuste avastamine on tähtis mutantsete genotüüpide avastamisel, mis on geneetilises analüüsis seotud ravimiresistentsust põhjustavate mutatsioonide avastamisega, farmako-genoomikaga jne.

- Nukleiinhappe amplifikatsioonil on palju variatsioone, näiteks eksponentsiaalne  
10 amplifikatsioon, aheldatud lineaarne amplifikatsioon, ligeerimispõhine amplifikatsioon ja transkriptsioonipõhine amplifikatsioon. Nukleiinhappe eksponentsiaalse amplifikatsioonimeetodi üheks näiteks on polümeraasahelreaktsioon (PCR), mis on avaldatud arvukates publikatsioonides. Vt, näiteks Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263-273 (1986); Mullis K., EP 201 184; Mullis *et al.*, US patent nr 4 582 788;  
15 Erlich *et al.*, EP 50 424, EP 84 796, EP 258 017, EP 237 362; ning Saiki R. *et al.*, US patent nr 4 683 194. Tõepoolest, polümeraasahelreaktsioon (PCR) on kõige laialdasemalt levinud sihtmärgi amplifikatsiooni meetod. PCR põhineb mitmetsüklilisel denaturatsioonil, sihtmärkahelate vastasahelate kahe erineva oligonukleotiidpraimeri mitmetsüklilisel hübridisatsioonil ning praimeri ekstensioonil nukleotiidi polümeraasi  
20 teel, andmaks sihtmärkjärjestuse kaheahelaliste koopiate hulga.

- Samuti on avaldatud üksikpraimeri kasutamisega amplifikatsioonimeetodid. Vt, näiteks US patendid nr 5 508 178, 5 595 891, 5 683 879, 5 130 238 ja 5 679 512. Praimeriks võib olla DNA/RNA kimäärne praimer, nagu see on avaldatud US patendis  
25 nr 5 744 308.

Mõnedes amplifikatsioonimeetodites on kasutatud matriitsi lülitavaid oligonukleotiide (TSOd) ja blokeerivaid oligonukleotiide. Näiteks on dokumentides US patendid nr 5 679 512, 5 962 272, 6 251 639 ja Patel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

93:2969-2974 (1996) avaldatud matriitsi lülitav amplifikatsioon, kus on kasutatud kimäärset DNA praimerit.

Kuid eespool kirjeldatud sihtmärgi amplifikatsioonimeetoditel on mitmeid puudusi. Näiteks on transkriptsioonipõhised amplifikatsioonimeetodid, nagu nukleiinhappejärjestusepõhine amplifikatsioon (NASBA) ja transkriptsioonivahenduslik amplifikatsioon (TMA) piiratud vajadusega sisestada polümeraasi promootorjärjestus praimeriga amplifikatsiooniprodukti, mis kujutab endast protsessi, mis võib anda tulemuseks mittespetsiifilise amplifikatsiooni. Toodud amplifikatsioonimeetodite teisteks puudusteks on vajadus kahe sidumissündmuse järele, mis võivad tagada optimaalse sidumise erinevatel temperatuuridel, aga samuti ka looduslikult esinevaid järjestusi sisaldavate praimerite kasutamine. Nende tegurite kombinatsioon suurendab ebaõnnestunud praimimise tõenäosust ja sihtmärjärjestusest erinevate resulteerivate järjestuste amplifikatsiooni tõenäosust.

Seetõttu on olemas vajadus neist puudustest vabade nukleiinhappe parandatud amplifikatsioonimeetodite järele. Siinjuures toodud leiutises on need puudused kõrvaldatud ning sellele on omased veel ka täiendavad eelised.

## 20 Kokkuvõte

Siinjuures on avaldatud uued nukleiinhappe amplifikatsioonimeetodid, mis sisaldavad järgmisi astmeid: a) praimer nukleiinhappe matriitsjärjestusega anniilimist, kusjuures praimer sisaldab esimest, matriitsiga anniiluvat osa ja teist ettemääratud järjestuse osa, mis matriitsiga ei anniilu; b) polünukleotiidi sünteesimist, mis on komplementaarne matriitsi osaga matriitsiga anniilunud praimer esimese osa ja matriitsi otsa vahel, kusjuures polünukleotiidil on esimene ots ja teine ots, kusjuures esimene ots sisaldab praimerit; c) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi matriitsist eraldamist; d) matriitsi oligonukleotiidi astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi teise otsa anniilimist, kusjuures matriitsi oligonukleotiidil on esimene, polünukleotiidi teise otsaga anniiluv osa ja teine,

praimeri teise osaga samasugune ettemääratud järjestus; e) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi pikendamist, andmaks selle terminaalse osa, mis on ettemääratud järjestusega komplementaarne, kusjuures mainitud matriitsi oligonukleotiid ei ole oma 3'-otsa juures pikenenud; ning f) pikenenud polünukleotiidi amplifitseerimist, kasutades selleks ettemääratud järjestusega üksikpraimerit.

Alternatiivse teostusviisi korral sisaldab meetod järgmisi astmeid: a) praimeri ja piirneva oligonukleotiidmatriitsi nukleiinhappejärjestusega anniilimist, kusjuures praimeril on esimene, matriitsiga anniiluv osa ja ettemääratud järjestuse teine osa, mis ei anniilu matriitsiga; b) polünukleotiidi sünteesimist, mis on komplementaarne matriitsi osaga matriitsiga anniilunud praimeri esimese osa ja matriitsi selle osa, millega on piirnev oligonukleotiid anniilunud, vahel, kusjuures polünukleotiidil on esimene ots ja teine ots, kusjuures esimene ots sisaldab praimerit; c) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi matriitsist eraldamist; d) oligonukleotiidmatriitsi astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi teise otsa anniilimist, kusjuures oligonukleotiidmatriitsil on polünukleotiidi teise otsaga anniiluv esimene osa ja teine, praimeri teise osaga samasugune ettemääratud järjestusega osa; e) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi pikendamist, andmaks selle terminaalse osa, mis on komplementaarne ettemääratud järjestusega, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriits ei ole oma 3'-otsa juures pikenenud; ning f) pikenenud polünukleotiidi amplifitseerimist, kasutades selleks ettemääratud järjestusega üksikpraimerit.

Samuti on arvestatud sellega, et inseneeritud nukleiinhappe ahel, mis on selle esimeses otsas ettemääratud järjestusega ning mille teise otsa järjestus on ettemääratud järjestusega komplementaarne, moodustab iseenesest käesolev leiutise ühe iseseisva osa.

Ühe teise aspekti kohaselt käsitleb leiutis nukleiinhappeahela amplifitseerimismeetodit, sisaldades astmeid, kus saadakse inseneeritud nukleiinhappeahel, mis on selle esimeses otsas ettemääratud järjestusega ning mille teises otsas on ettemääratud järjestusega komplementaarne järjestus ning kus inseneeritud nukleiinhappeahel viiakse polümeraasi

ja nukleotiidide juuresolekul kokku ettemääratud järjestusega praimeriga nukleotiidide polümerisatsiooniks sobivatel tingimustel.

Siinjuures kirjeldatud amplifitseerimisprotsessi ja inseneeritud matriitse võib kasutada  
5 selliste amplifitseeritud produktide valmistamiseks, milliseid võib ligeerida sobivasse  
ekspressioonivektoris. Seejärel võib vektorit kasutada asjakohase peremeesorganismi  
transformeerimiseks, kasutades seejuures standardseid meetodeid sihtmärkjärjestusega  
kodeeritud polüpeptiidi või proteiini valmistamiseks. Eriti kasulikes teostusviisides on  
siinjuures kirjeldatud tehnilisi võtteid kasutatud sarnaste järjestuste perekonna  
10 amplifitseerimiseks, võimaldamaks moodustada komplekse raamatukogu, nagu näiteks  
antikeha raamatukogu.

### Jooniste lühikirjeldus

15 Joonisel fig. 1 on illustreeritud skemaatiliselt matriitsiga anniilitud praimer ja piirnev  
oligo.

Joonisel fig. 2A on illustreeritud skemaatiliselt nukleiinhappeahelaga anniilitud  
restriktsiooni oligo.

Joonisel fig. 2B on illustreeritud skemaatiliselt lühendatud 5'-otsaga matriitsi anniilitud  
20 praimer.

Joonisel fig. 3 on illustreeritud skemaatiliselt alternatiivne teostusviis, kus on teostatud  
polümerisatsiooni kordsed voorud ning restriktsiooni oligonukleotiid on anniilitud  
pigem värskelt sünteesitud ahelatesse, kui originaalmatriitsiga.

Joonisel fig. 4 on illustreeritud skemaatiliselt äsjasünteesitud nukleiinhappeahelasse  
25 anniilitud pesistatud oligo.

Joonisel fig. 5 on illustreeritud skemaatiliselt käesolevale leiutisele vastav inseneeritud  
matriits.

Joonisel fig. 6 on illustreeritud skemaatiliselt inseneeritud matriitsi üksikpraimeri  
amplifikatsioon.

30 Joonisel fig. 7 on esitatud tähistatud kui TMX24CMnpt pesistatud oligo järjestus.

Joonistel fig. 8a-8e on esitatud näites 3 valmistatud isoleeritud Fab-ide järjestus.

Joonistel fig. 9a-9d on esitatud näites 5 valmistatud isoleeritud Fab-ide järjestus.

### **Eelistatud teostusviiside üksikasjalik kirjeldus**

Käesolevas leiutises on avaldatud meetod nukleiinhappe sihtmärkjärjestuse amplifitseerimiseks. Eriti kasulikes teostusviisides on nukleiinhappe sihtmärkjärjestuseks polüpeptiidi või proteiini kodeeriv geen. Samuti on leiutises kirjeldatud seda, kuidas saab amplifikatsiooniprodukte kloonida ja sobivates ekspressioonisüsteemides ekspresseerida. Eriti eelistatud teostusviisides on siinjuures kirjeldatud 10 tehnilisi võtteid kasutatud sarnaste järjestuste perekonna amplifitseerimiseks, eesmärgiga moodustada kompleksne raamatukogu, nagu näiteks antikeha raamatukogu.

Nukleiinhappe sihtmärkjärjestus on eksponentsiaalselt amplifitseeritud protsessi kaudu, 15 millesse on haaratud üksikpraimer. Üksikpraimer kasutamise võimalus (st vajaduseta erinevate järjestustega päripidise ja pööratud praimerite järele) on saavutatud amplifitseeritavat sihtmärkjärjestust sisaldava nukleiinhappe ahela inseneerimise teel. Inseneeritud nukleiinhappe ahel (siinjuures on sellele mõnikord viidatud kui “inseneeritud matriitsile”) on valmistatud kahest matriitsist, nimelt, 1) lähtematerjalist, 20 milleks on amplifitseeritavat järjestust sisaldav looduslik või sünteetiline nukleiinhape (näiteks DNA või cDNA) ning 2) pesistatud oligonukleotiidist. Lähtematerjali võib käsitleda originaalmatriitsina. Pesistatud oligonukleotiidi kasutatakse matriitsina originaalmatriitsi nukleotiidijärjestuse pikendamiseks nukleiinhappe inseneeritud ahela loomise käigus. Nukleiinhappe inseneeritud ahel on moodustatud originaalmatriitsist rea 25 manipulatsioonide kaudu, andes tulemuseks selle vastasotstes komplementaarsete järjestuste olemasolu. Just need komplementaarsed järjestused võimaldavad teostada üksnes üksikpraimeriga amplifikatsiooni.

Siinjuures kirjeldatud protsesside korral võib lähtematerjalina kasutada suvalist, puhtas 30 vormis või puhastamata vormis nukleiinhapet, eeldusel, et see sisaldab või arvatakse

sisaldavat amplifitseeritavat nukleiinhappe sihtmärkjärjestust. Seega võib protsessis kasutatavaks lähtematerjaliks olla näiteks DNA või RNA, kaasa arvatud informatsiooni RNA, kus DNA või RNA võib olla üheaahelaline või kaheaahelaline. Lisaks sellele võib kasutada DNARNA hübriidi, mis sisaldab neist kummastki ühte ahelat. Samuti võib kasutada neist nukleiinhapetest valitud suvaliste hapete segu või nukleiinhappeid, mis on saadud siinjuures varasemalt teostatud amplifikatsioonireaktsioonist, kasutades samu või erinevaid primereid. Amplifitseeritav nukleiinhappe sihtmärkjärjestus võib moodustada suurema molekuli osa või see võib olla diskreetse molekulina juba algselt olemas. Lähtenukleiinhape võib sisaldada soovitud nukleiinhappe sihtmärkjärjestust, mis võib olla sama või erinev. Seetõttu võib käesolev protsess olla kasutatav mitte üksnes nukleiinhappe sihtmärkjärjestuse suurte koguste valmistamisel, vaid ka samadel või erinevatel nukleiinhappe molekulidel paikneva rohkem kui ühe erineva nukleiinhappe järjestuse samaaegseks amplifikatsiooniks.

Nukleiinhappeid võib saada suvalistest allikatest, näiteks genoomi- või cDNA raamatukogud, plasmiidid, kloonitud DNA või RNA või suvalisest allikast pärinev looduslik DNA või RNA, kaasa arvatud bakterid, pärm, viirused ja kõrgemad organismid, nagu näiteks taimed või loomad. Nukleiinhapped võivad olla kas täielikult või osaliselt looduslikud või sünteetilised. Käesolevas leiutises kasutatud nukleiinhapete saamise ja valmistamise tehnilised võtted on antud ala asjatundjatele tuntud. Kui nukleiinhape sisaldab kahte ahelat, siis on vajalik enne nukleiinhappe originaalmatriitsina kasutamist eraldada nukleiinhappe ahelad teineteisest, seda kas siis eraldi astmena või samaaegselt praimeride pikendamise produktide sünteesiga. Lisaks sellele, kui lähtematerjaliks on DNA esimene ahel, siis võib DNA teise ahela moodustada samaaegselt antud ala asjatundjatele tuntud viisil ning kasutada originaalmatriitsina, millest inseneeritud matriits moodustatakse.

Siinjuures toodud meetodite korral on cDNA esimene ahel eriti kasulik originaalmatriits. DNA matriitside loomise sobivad meetodid on antud ala asjatundjatele hästi tuntud ja hõlpsasti valitavad. Eelistatud teostusviisi korral on cDNA esimene ahel

sünteesitud reaktsioonis, kus pöördtranskriptaas katalüüsib oligodeoksünukleotiid-praimeri ja nelja deoksünukleosiidtrifosfaadi, dATP, dGTP, dCTP ja TTP juuresolekul suvalise RNA lähtematerjali suhtes komplementaarse DNA. Reaktsioon alustatakse oligodeoksünukleotiidpraimeri mRNA 3'-otsa anniilimisega, millele järgneb kasvava  
5 ahela 3'-otsa mRNA nukleotiidi järjestusega seotud paardumise järgi määratud asjakohaste deoksü-nukleotiidide järk-järguline lisamine. Antud ala asjatundjatele on arusaadav, et oligo-dT mRNA polüA sabale anniilimise kaudu cDNA esimese ahela genereerimiseks võib kasutada proovis kogu mRNA-d.

10 Kui originaalmatriits on juba saadud, siis on praimer 20 ja piirnev oligonukleotiid 30 anniilitud originaalmaatriksiga 10 (vt joonis fig. 1). Alates praimeri 3'-otsast kuni umbes piirneva oligonukleotiidi 5'-otsani polümeriseeritakse originaalmatriitsiga komplementaarne nukleiinhappe ahel.

15 Praimer 20, mis on anniilitud originaalmatriitsiga, sisaldab ettemääratud järjestuse esimest osa 22, mis ei ole originaalmatriitsiga anniilunud ning teist osa 25, mis on originaalmatriitsiga anniilunud ning valikuliselt restriksioonisaiti 23 esimese ja teise osa vahel. Praimer anniilub originaalmatriitsiga amplifitseeritava sihtmärkjärjestuse 12 kõrval. Arvestatud on sellega, et praimer võib anniiluda originaalmatriitsiga ampli-  
20 fitseeritavast sihtmärkjärjestusest ülesvoolu või sellega, et praimer võib kattuda amplifitseeritava sihtmärkjärjestuse 12 algusosaga, mis on näidatud joonisel fig. 1. Praimeri mitteanniiluva osa 22 ettemääratud järjestus ei ole originaalmatriitsile omane ning see on valitud, andmaks järjestuse, millega võib amplifikatsiooniprotsessis kasutatud üksikpraimer hübridiseeruda, nagu see on kirjeldatud allpool. Ettemääratud  
25 järjestus võib sisaldada valikuliselt restriksioonisaiti inseneeritud matriitsi osa ekspressioonivektoris sisestamiseks, mida on kirjeldatud detailsemalt allpool.

Originaalmatriitsiga anniilitud piirnev oligonukleotiid 30 täidab nukleiinhappe polümerisatsiooni katkestamise ülesannet. Piirneva oligonukleotiidina 30 võib kasutada  
30 suvalist oligonukleotiidi, mis on suuteline katkestama nukleiinhappe polümerisatsiooni.

Eelistatud teostusviisis sisaldab piirnev oligonukleotiid esimest osa 35, mis annilub originaalmatriitsiga 10 ning teist osa 32, mis ei ole pikendamisreaktsiooni suhtes tundlik. Piirneva oligo pikendamissaidina toimimise takistamise tehnilised võtted on antud ala asjatundjatele tuntud. Näiteks võib piirneva oligo 30 osa 32 kujundada nii, et see ei annilu originaalmatriitsiga 10, mis on näidatud joonisel fig. 1. Selliste teostusviiside korral takistab piirnev oligonukleotiid 30 edasist polümerisatsiooni, kuid ei toimi nukleiinhappe sünteesis praimerina, kuna selle 3'-ots ei hübridiseeru originaalmatriitsiga 10. Alternatiivselt võib piirneva oligo 30 3'-ots olla kujundatud, sisaldamaks sama efekti saamiseks lukustatud nukleiinhapet. Lukustatud nukleiinhape on avaldatud näiteks dokumendis WO 99/14226.

Antud ala asjatundjatele on läbinähtavad ka teised võimalused piirneva oligo 3'-otsa pikendamise tõkestamiseks.

Siinjuures kirjeldatud praimerid ja oligonukleotiidid võib sünteesida antud ala asjatundjatele hästituntud oligonukleotiidide sünteesis kasutamist leidnud meetoditel. Oligonukleotiidid, kaasa arvatud käesoleva leiutise praimerid sisaldavad loomulike või modifitseeritud monomeeride või ahelduste lineaarseid oligomeere, nagu näiteks deoksüribonukleotiide, ribonukleotiide jms, mis on suutelised regulaarsel viisil monomeer-monomeeri interaktsioonide, nagu näiteks Watson-Cricki aluspaardumise kaudu, seostuma spetsiifiliselt sihtmärk-polünukleotiidiga. Monomeerid on tavaliselt seotud fosfodiesteridemetega või nende analoogidega, moodustamaks oligonukleotiidid suurusega, mis ulatub mõnest monomeer-ühikust, näiteks 3-4 kuni mõnekümne monomeer-ühikuni. Priamer on tavaliselt üheaahelaline, kuid ta võib olla ka kaheaahelaline. Praimerites on tüüpiliselt deoksüribonukleiinhapped, kuid käesoleva leiutise meetodites võib kasutada ka antud alal suurel hulgal tuntud erinevaid sünteetilisi ja looduslikult esinevaid praimereid. Praimer on komplementaarne matriitsiga, millega ta on kohandatud hübridiseeruma, andmaks saidi sünteesi käivitamiseks, kuid ta ei pruugi kajastada matriitsi täpset järjestust. Sel juhul sõltub praimeri spetsiifiline hübridisatsioon matriitsiga hübridisatsioonitingimuste rangusest. Praimerid võivad olla märgistatud,

näiteks kromogeensete, radioaktiivsete või fluorestsentsete osistega ning neid võib kasutada avastatavate osistena.

Nukleiinhappe polümerisatsiooni võib teostada antud ala asjatundjatele tuntud  
5 meetoditel. Üldiselt teostatakse polümerisatsiooni ensümaatilisel, kasutades DNA  
polümeraasi, mis lisab järgemööda vastavalt matriitsi valmistamise juhiste vabu  
nukleotiide. Käesolevas protsessis sobivad kasutamiseks mitmed erinevad DNA  
polümeraasid. Teatud teostusviisides hõlmavad valikukriteeriumid eksonukleaasi aktiiv-  
suse puudumist või DNA polümeraase, millel puudub tugev eksonukleaas. Käesoleva  
10 leiutises kasutamiseks mõeldud madala eksonukleaasi aktiivsusega DNA polümeraasid  
võib isoleerida looduslikest allikatest või nad võib valmistada rekombinant-DNA  
tehnoloogia kaudu. Polümeraaside, milliseid võib kasutada, illustreerivateks näideteks  
on ilma piiranguteta T7 Sequenase v. 2.0, DNA polümeraas I Klenow fragment, millel  
puudub eksonukleaasi aktiivsus, Taq polümeraasi, exo.-Pfu DNA polümeraasi, Vent.  
15 (exo.-) DNA polümeraasi ja Deep Vent. (exo.-)DNA polümeraasi Klenow fragment.

Eriti kasulik on teostusviisis on piirneva oligonukleotiidi kasutamine välditud lähte-  
materjali mittevajaliku osa digestsiooni teel eemaldamisega. Selles teostusviisis, mis on  
esitatud skemaatiliselt joonisel fig. 2A, on restriksiooni oligonukleotiid 70 anniilitud  
20 lähtematerjaliga 100 selleks eelnevalt valitud kohas. Restriksiooni oligonukleotiid  
annab restriksioonisaiti 72 sisaldaval lähtematerjalil kaheaahelalise osa. Sobivateks  
restriksioonisaitides on, kuid mitte piirava loeteluna, Xho I, Spe I, NheI, Hind III, Nco  
I, Xma I, Bgl II, Bst I ja Pvu I. Pärast sobivale restriksiooniensüümile eksponeerimist  
on lähtematerjal digesteeritud ning seega mittevajaliku järjestuse eemaldamiseks  
25 lühendatud, säilitades samas soovitud amplifitseeritava sihtmärkjärjestuse 12 (või selle  
osa), mida kasutatakse originaalmatriitsina 110. Kui originaalmatriits 110 on juba  
saadud, siis anniilitakse praimer 20 originaalmatriitsil 110 (vt joonis 2B) sihtmärk-  
järjestuse 12 kõrval või sellega kattuvalt, mis oli kirjeldatud eespool seoses eelnevate  
teostus-viisidega. Originaalmatriitsi osaga praimer 20 3'-otsa ja originaalmatriitsi 110  
30 5'-otsa vahel komplementaarne nukleiinhappe 40 ahel on polümeriseeritud. Antud ala

asjatundjatele on arusaadav, et selles teostusviisis, kus originaalmatriitsi loomiseks on kasutatud restriksiooni oligonukleotiidi, puudub vajadus piirneva oligonukleotiidi kasutamise järele, kuna praimerit pikendamine saab toimuda tervenisti kärbitud originaalmatriitsi 110 5'-otsa suunas.

Kui polümerisatsioon on juba lõppenud (st kasvav ahel 40 ulatub piirneva oligonukleotiidini 30 või kärbitud originaalmatriitsi 110 5'-otsani), siis eraldatakse äsja sünteesitud komplementaarne ahel suvalisel sobival denaturatsioonimeetodil, kaasa arvatud füüsikaliste, keemiliste või ensümaatiliste vahenditega, originaalmatriitsist.

10 Ahela eraldumise võib kutsuda esile ka ensüümiga, mis pärineb helikaasidena tuntud ensüümide rühmast või ensüümiga RecA, millel on helikaasi aktiivsus ning riboATP, mis teatavasti denatureerib DNA, juuresolekul. Nukleiinhapete ahelate helikaasidega eraldamiseks sobivaid reaktsioonitingimusi on kirjeldatud dokumendis *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, kd XLIII "DNA: Replication and  
15 *Recombination*" (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978), B. Kuhn *et al.*, "DNA Helicases", lk 63-67 ning RecA kasutamise tehniliste vahendite kohta ülevaate on esitanud C. Radding, *Ann. Rev. Genetics*, 16:405-37 (1982).

Seega sisaldab uudselt sünteesitud komplementaarne ahel praimeriga 20 esitatud  
20 järjestusi (näiteks ettemääratud järjestus 22, praimerit valikuline restriksioonisaat 23 ja anniiluv osa 25), aga samuti uudselt sünteesitud osa 45, mis on komplementaarne originaalmatriitsi 10 selle osaga, mis asub selle koha, kus praimer 20 oli originaalmatriitsiga 10 anniilunud ja kas originaalmatriitsi 10 selle osa, millega piirnev oligonukleotiid 30 oli anniilunud või originaalmatriitsi kärbitud 5'-otsa vahel. Vt joonist  
25 fig. 4.

Uudselt sünteesitud komplementaarse ahela järgmistes astmetes kasutamiseks ette nähtud korduskoopiate valmistamiseks on valikuliselt teostatud mitu polümerisatsiooni vooru (eelistatult 15-25 vooru), kasutades selleks originaalmatriitsi ja praimerit.  
30 Protsessi selles faasis (ootamata amplifikatsiooni eelselt kogu inseneeritud matriitsi

valmimist) uudselt sünteesitud komplementaarse ahela korduskoopiate valmistamine võimaldab tagada selle, et lõppkokkuvõttes saadud inseneeritud matriitsidesse oleks sisestatud sihtmärkjärjestuse täpsed koopiad. Arvatakse, et originaalmatriitsil põhinevad polümerisatsiooni kordusvoorud suurendavad raamatukogu kõigi liikmete parema esindatuse tõenäosust, tagades sellega võrreldes ühevoorulise polümerisatsiooniga parema mitmekesisuse.

Alternatiivses teostusviisis on uudselt sünteesitud ahelad valmistatud eespoolkirjeldatud praimer 20 originaalmatriitsi 10 anniilimisega ning polümerisatsiooni kordsete voorude teostamisega, seda siis kas ilma blokeeriva oligonukleotiidita või originaalmatriitsi osa emmaldamiseta. Selles teostusviisis, mis on illustreeritud skemaatiliselt joonisel fig. 3, on praimer pikendatud originaalmatriitsi kogupikkuse ulatuses, andes kogupikkusega uudselt sünteesitud ahela 140. Seejärel hübridiseeritakse restriksiooni oligonukleotiid 170 uudselt sünteesitud ahelaga selle kogupikkuse ulatuses. Restriksiooni oligonukleotiid annab restriksioonisaiti sisaldaval uudselt sünteesitud ahelal kaheahelalise osa. Sobivateks restriksioonisaitideks on, kuid mitte piirava loeteluna, Xho I, Spe I, NheI, Hind III, Nco I, Xma I, Bgl II, Bst I, Pvu I, Xcm I, BsaI I, Hpa I, ApaI I, Sac I, Dra III ja Sma I. Sobivale restriksiooniensüümile eksponeerimise järel on uudselt sünteesitud ahel digesteeritud ja seega kärbitud. Seejärel võib pesistatud oligonukleotiidi 50 kärbitud uudselt sünteesitud ahelal 142 hübridiseerida, viimaks lõpule inseneeritud matriitsi valmistamise, mida on kirjeldatud detailsemalt allpool.

Järgmine inseneeritud matriitsi valmistamise aste hõlmab pesistatud oligonukleotiidi 50 uudselt sünteesitud komplementaarse ahela 3'-otsal anniilimist, näiteks nii nagu see on näidatud joonisel fig. 4. Joonisel fig. 4 on näha, et pesistatud oligonukleotiid 50 annab matriitsi edasise polümerisatsiooni, mis on vajalik inseneeritud matriitsi valmistamise lõpuleviimiseks. Pesistatud oligonukleotiid 50 sisaldab osa 52, mis ei hübridiseeru ja/või ei sisalda modifitseeritud aluseid uudselt sünteesitud komplementaarsel ahelal, takistades seega pesistatud oligonukleotiidi praimerina toimimist. Pesistatud oligonukleotiid 50 sisaldab ka osa 55, mis hübridiseerub uudselt sünteesitud komple-

mentaarse ahela 3'-otsal. Osa 55 võib olla uudsel sünteesitud osaga 45 samaulatuslik või ulatuda uudsel sünteesitud osast 45 kaugemale nagu see on näidatud joonisel fig. 4. Pesistatud oligonukleotiid 50 võib sisaldada valikuliselt ka restriksioonisaiti määrat osa 56. Pesistatud oligonukleotiidi 50 lõpuosa 58 sisaldab sama ettemääratud järjestust nagu

5 praimer 20 osa 22. Alates punktist, kus osa 55 ulatub uudsel sünteesitud komple-  
mentaarse ahela alguse 3'-otsast kaugemale, toimib pesistatud oligonukleotiid matriit-  
sina edasiseks polümerisatsiooniks, andmaks inseneeritud matriitsi. Tuleb mõista seda,  
et pesistatud oligo võib sisaldada sihtmärkjärjestuse osa (kui selle osa oli originaal-  
matriitsi valmistamisel kärbitud) või sisaldada geene, mis kodeerivad polüpeptiidi või

10 proteiini (või nende osa), nagu näiteks ühte või mitut CDRi või antikeha raampirkondi  
või püsipiirkondi. Samuti on arvestatud sellega, et võib kasutada ka erinevaid järjestusi  
sisaldavaid pesistatud oligonukleotiidide kogumit, andes sellega matriitside valiku, mis  
tagab mitmekesiste produktide raamatukogu. Nagu on näidatud joonisel fig. 4, pikendab  
polümerisatsioon pesistatud oligonukleotiidiga komplementaarse täiendava nukleiin-

15 happe 60 lisamine uudsel sünteesitud komplementaarset ahelat. Polümerisatsiooni  
tehnilised võtted on antud ala asjatundjatele tuntud. Nagu oli eespool mainitud, võib  
polümeraasi sobiva valikuga teatud teostusviisides eelistada ensüümi, millel puudub  
eksonukleaasi aktiivsus.

20 Kui polümerisatsioon on juba lõpule jõudnud, eraldatakse inseneeritud matriits 120  
antud ala asjatundjatele hästi tuntud meetoditel, nagu näiteks kuumdenaturatsiooni teel,  
pesistatud oligonukleotiidist 50. Saadud inseneeritud matriits 120 sisaldab originaalprai-  
merist 20 pärinevat osa, originaalmatriitsi osaga komplementaarset osa 45 ning  
pesistatud oligonukleotiidi osaga komplementaarset osa 65 (vt joonist fig. 5). Oluline on

25 märkida, et inseneeritud matriitsi 120 3'-ots hõlmab osa 68, mis sisaldab järjestust, mis  
on komplementaarne praimer 20 osa 22 ettemääratud järjestusega. See võimaldab antud  
ala asjatundjatele tuntud tehniliste võtetega praimer 20 osa 22 ettemääratud järjestusega  
samasugust järjestust omava üksikpraimer kasutamise teel amplifitseerida inseneeritud  
matriitsis 120 sisalduva soovitud järjestuse. Üksikpraimer amplifitseerimise ajal on

30 eelistatud eksonukleaasi aktiivsust omava polümeraasi olemasolu, kuna sellised

ensüümid pakuvad teatavasti "korrigeerivat" funktsiooni ning neil on võrreldes eksonukleaasi aktiivsusega polümeraasidega suhteliselt suurem protsessiivsus.

Joonisel fig. 6 on illustreeritud uudselt sünteesitud cDNA matriitsi üksikpraimeri  
5 amplifikatsiooni astmed. Kui praimer on reaktsioonisegus olemas, siis see hübridiseerub matriitsi piiravatel järjestustel ning amplifitseerib matriitsi. Kui praimer puudub, siis arvatakse, et leiab aset sisemine eneseanniilumine ettemääratud järjestuse 5'-otsa ja ettemääratud järjestusega komplementaarse järjestuse 3'-otsa vahel. Ühes eelistatud teostusviisis võivad ettemääratud järjestus ja komplementaarne ettemääratud järjestus  
10 üksikpraimeri amplifikatsioonireaktsiooni ajal vääraprimimise vältimiseks olla kujundatud anniiluvatena kõrgematel temperatuuridel.

Pärast amplifikatsiooni teostamist võib produktid avastada antud ala asjatundjatele tuntud tehniliste vahenditega. Nukleiinhapete avastamiseks kasutatavate meetodite  
15 näideteks on ilma piiranguteta, alleelispetsiifiliste oligonukleotiididega hübridisatsioon, restriksiooni endonukleaasi lõhustamine, üksikahelaline konformatsiooniline polümorfism (SSCP), geelelektroforees, etiidiumbromiidiga värvimine, fluorestsentsi resonantsenergia ülekanne, juuksenõelstruktuuri FRET-analüüs ja TaqMan analüüs.

20 Kui inseneeritud nukleiinhape on juba soovitud kordi amplifitseeritud, võib ahela digesteerimiseks kasutada restriksioonisaite 23 ja 66 või suvalisi sisemisi restriksioonisaite nii, et nukleiinhappe sihtmärkjärjestuse võib sobivasse ekspressioonivektoris ligeerida. Seejärel võib vektorit kasutada standardsetel meetoditel asjakohase peremeesorganismi muundamiseks, andmaks sihtmärkjärjestusega kodeeritud polüpeptiidi  
25 või proteiini.

Eriti kasulikes teostusviisides on siinkirjeldatud meetodeid kasutatud antikehi või nende osi, nagu näiteks muutlikke piirkondi (kas kergelt või raskelt ahelat) kodeerivate sihtmärkjärjestuste amplifitseerimiseks, kasutades antikeha cDNA-d. Sel viisil võib  
30 antikehade raamatukogu amplifitseerida ja skriinida. Seega alustades näiteks antikeha

- mRNA-st, võib originaalmatriitsi saamiseks luua ja digesteerida cDNA esimese ahela. Praimeri võib disainida valitud komplementaarsust määraval piirkonnal (CDR) vastassuunaliseks anniilumiseks nii, et uudselt sünteesitud nukleiinhappe ahel sisaldab CDR-i. Näiteks kui sihtmärkjärjestuseks on CDR3 raske ahel, võib praimeri disainida raske
- 5 ahela karkassi esimesel (FR1) piirkonnal anniilumiseks. Antud alal asjatundjatele on kergesti arusaadav kuidas käesoleva leiutise ulatuses disainida teistel vastassuunalistel saitidel anniilumiseks sobivaid praimereid või kuidas reprodutseerida antikeha cDNA-s teisi valitud sihtmärke.
- 10 Järgnevad näited on lisatud leiutise illustreerimiseks ning mitte selle ulatuse piiramiseks.

### Näide 1

IgM raske ahela varieeruvate geenide repertuaari amplifitseerimine

#### Esimese ahela cDNA sünteesimine ja modifitseerimine

- Inimese perifeerse vere lümfotsüüdi (PBL) mRNA kasutati oligo-dT praimeriga traditsioonilise esimese ahela cDNA genereerimiseks, juhindudes seejuures peamiselt
- 20 kasutatud SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) komplekti kasutusjuhendist. Esimese ahela cDNA produkt puhastati QIAGEN spinokolonnis (PCR puhastuskomplekt). DNA kaheahelalise piirkonna, mille saab restriksiooni endonukleas EcoR I-ga digesteerida, genereerimiseks lisati esimese ahela cDNA-le restriksiooni oligonukleotiid. Restriksiooni oligonukleotiidi (CM EcoR
- 25 I) järjestus oli 5' TCC TGT GAG AAT TCC CCG TCG 3' (SEQ. ID nr 1). Reaktsioon teostati esimese ahela cDNA ja 0,1 uM oligonukleotiidiga. Proovi kuumutati 2 minutit 95 °C juures ning seejärel hoiti spetsiifilise anniilumise toimumiseks 2 minutit 64 °C juures. Proovile lisati sobiv kogus 10X restriksioonipuhvrit H (Roche Diagnostics) ning seejärel see jahutati 37 °C-ni. Lisati restriksiooni endonukleas EcoR I (New
- 30 England Biolabs) ning proovi inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. Restriksiooniensüüm

inaktiveeriti 20-minutilise 65 °C juures kuumutamisega ning seejärel proov jahutati 4 °C-ni.

#### Teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

EcoR I-ga digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati koos praimer "TMX24VH3a" (lõplikult 0,4 uM), dNTP, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvriga (Applied Biosystems) teise ahela cDNA reaktsioonis originaalmatriitsina. Disainitud praimer sisaldas TMX24 ettemääratud järjestust, Xho I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis  
10 anniilub esimese ahela cDNA-l inimese antikeha raske ahela geeni karkassi esimeses piirkonnas. "TMX24VH3a" järjestus oli 5' GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG CTC GAG GAR GTG CAG CTG GTG GAG 3' (SEQ. ID nr 2), kus R aheldab aluste A ja G võrdse molaarse segu. Proov denatureeriti üheminutilise 95 °C juures kuumutamisega, siis see tsüklistati 20 korda 95 °C juures 5 sekundi jooksul, 56 °C  
15 juures 10 sekundi jooksul ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. See tagab teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Seejärel lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,08 uM pesistatud oligoga märgistatud "TMX24CM0". "TMX24CM0" järjestus oli 5' GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG ACT AGT ATT TCT CAC AGG AGA CGA GGG GGA 3' (SEQ. ID nr 3), mis sisaldab järgnevates kloonimisastmetes kasutamiseks Spe I  
20 restriksiooni endonukleaasi saiti. Pesistatud oligo 3'-ots on disainitud tõkestamaks pikenemist vastupidiselt seotud (3'-5' asemel 3'-3') adenosiini sisestumist. Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d 5-sekundilise 94 °C juures kuumutusdenatureerimise teel pesistatud oligost eemale, seejärel tsüklistati 4 korda anniilimiseks ja pikendati 68 °C juures 10-sekundi ja 95 °C juures 5-sekundi, seejärel 68 °C juures 30-sekundi jooksul ja  
25 4 °C juures. Seejärel puhastati saadud teise ahela cDNA või inseneeritud matriits QIAGEN spin kolonnis (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade korral lihtne puhvrivahetus.

Üksikpraimerite amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasi segu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ning järjestusega 5' GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG 3' (SEQ. ID nr 4) üksikpraimerit (TMX24). Proovid

5 denatureeriti 95 °C juures 1-minutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 35 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline hoidmine 68 °C ja 4 °C juures.

10 Kloonimine ja järjestamine

Umbes 450 bp-ga amplifikatsiooni produktid geelpuhastati ja digesteeriti Xho I ja Spe I-ga ning klooniti pBluescript KS+ -i (Stratagene). Eraldati üksikkloonid ja määrati nende DNA järjestused. Kõik 16 analüüsitud klooni olid IgM rasked ahelad, kus neis

15 igauks sisaldas varieeruva pikkusega CDR3 järjestusi, näidates seda, et sellel meetodil oli amplifitseeritud antikeha ahelate mitmekesine populatsioon (vt tabel 1).

Tabel 1

|                          | FR3   | HCDR3                 | FR4 |
|--------------------------|-------|-----------------------|-----|
| Kloon 1 (SEQ. ID nr 5)   | YYCAR | EGSSSGAFDI            | WGQ |
| Kloon 2 (SEQ. ID nr 6)   | YYCAR | AAFYCSCGSCYFDYYYYGMDV | WGQ |
| Kloon 3 (SEQ. ID nr 7)   | YYCAK | DIGGLGVLNFDY          | WGQ |
| Kloon 5 (SEQ. ID nr 8)   | YYCAK | GVLAIRICDY            | WGQ |
| Kloon 6 (SEQ. ID nr 9)   | YYCAR | DPGVYDYVWGSYRYPDAFDI  | WGQ |
| Kloon 7 (SEQ. ID nr 10)  | YYCAR | GMIVGATSYPDY          | WGQ |
| Kloon 8 (SEQ. ID nr 11)  | YYCLL | GYCSSTSCPAFDI         | WGQ |
| Kloon 9 (SEQ. ID nr 12)  | YYCVI | GGAVFSGGSYRQQIDY      | WGQ |
| Kloon 10 (SEQ. ID nr 13) | YYCTR | DRGGSYTSHLGAFDI       | WGQ |
| Kloon 11 (SEQ. ID nr 14) | YYCAK | DNDLGGDYYYYGMDV       | WGQ |
| Kloon 12 (SEQ. ID nr 15) | YYCAR | DRRFPTDLFDI           | WGQ |
| Kloon 13 (SEQ. ID nr 16) | YYCAR | EDGYNSGWSYNWFDP       | WGQ |
| Kloon 14 (SEQ. ID nr 17) | YYCAK | DCVSGSYHYFDY          | WGQ |
| Kloon 16 (SEQ. ID nr 18) | YYCAK | DSYCSGSCYYYYYGVDV     | WGQ |
| Kloon 17 (SEQ. ID nr 19) | YYCAR | EVVPAAIIDYYYYGMDV     | WGQ |
| Kloon 18 (SEQ. ID nr 20) | YYCAK | DLGIAVVVPAH           | WGQ |

**Näide 2**

VH produktide vektorisse kloonimiseks nii, et loomuliku IgM CH1 konstantset piirkonda saaks ümberkorraldada, kasutati esimese ahela cDNA endonukleaasi  
5 digestsiooniks EcoR I-st CH2-s erinevat saiti. Antud alal asjatundjatele on arusaadav, et kui antud katse-eeskirjas on kasutatud Taq polümeraasi, lisatakse paljudele uudselt sünteesitud DNA ahelatele terminaalne A. Mitmekesisuse suurendamiseks arvestatakse terminaalset A olemasoluga pesistatud oligonukleotiidi disainimisel. Kuid täiendava A olemasolu tekitab EcoR I rekognitsioonisaidi kadumise. IgM konstantse piirkonna  
10 analüüs tõi esile teised loomulikud restriksioonisaigid, nagu näiteks Dra III, milliseid võib antud meetodis potentsiaalselt kasutada. Dra III loomuliku restriksioonisaidi kasutamine CH1 domeenis annab tulemuseks, et vastupidine EcoR I sait jääb modifitseerimata ning seda võib kasutada raske ahela repertuaari kloonimiseks. Raske ahela inserdid kloonitakse Xho I ja EcoR I abil asjakohasesse vektorisse, mis sisaldab IgM  
15 CH1 domeeni, mis pärineb CH2 domeeniga liitunud EcoR I –st.

**Esimese ahela cDNA sünteesimine ja modifitseerimine**

Inimese perifeerse vere lümfotsüüdi (PBL) mRNA kasutati oligo-dT praimeriga  
20 traditsioonilise esimese ahela cDNA genereerimiseks. Seejuures juhinduti peamiselt kasutatud SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) komplekti kasutusjuhendist. DNA kaheahelalise piirkonna, mille saab restriksiooni endonukleas Dra III-ga digesteerida, genereerimiseks lisati esimese ahela cDNA-le restriksiooni oligonukleotiid. Restriksiooni oligonukleotiidi (CMDra III)  
25 järjestus oli 5' GAC GAA CAC GTG GTG TGC AAA G 3' (SEQ. ID nr 21). Reaktsioon teostati esimese ahela cDNA ja 1 uM oligonukleotiidiga. Proovi kuumutati 2 minutit 95 °C juures ning seejärel hoiti spetsiifilise anniilumise toimumiseks 2 minutit 64 °C juures. Proovile lisati sobiv kogus 10X restriksioonipuhvrit H (Roche Diagnostics) ning seejärel see jahutati 37 °C-ni. Lisati restriksiooni endonukleas Dra  
30 III (New England Biolabs) ning proovi inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. Restrikt-

siooniensüüm inaktiveeriti 20-minutilise 65 °C juures kuumutamise ja seejärel proov jahutati 4 °C-ni.

#### Teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

Dra III-ga digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati koos praimeriga "TMX24VH1a" (lõplikult 0,4 uM), dNTP, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvriga (Applied Biosystems) teise ahela cDNA reaktsioonis originaalmatriitsina. Disainitud praimer sisaldas TMX24 ettemääratud järjestust, Xho I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis  
 10 anniilub esimese ahela cDNA-l inimese antikeha raske ahela geeni karkassi esimeses piirkonnas. "TMX24VH1a" järjestus oli 5' GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCAGCTGGTGCAG 3' (SEQ. ID nr 22), kus K tähistab aluste G ja T võrdset molaarset segu. Proov denatureeriti üheminutilise 94 °C juures kuumutamise ja, siis see tsüklistati 20 korda 94 °C juures 5 sekundi jooksul, 56 °C juures 10  
 15 sekundi jooksul ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagab teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Seejärel lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM pesistatud oligoga märgistatud "TMX24CMnpt". Nagu on näidatud joonisel fig. 7, sisaldab "TMX24CMnpt" järjestus (SEQ. ID nr 23) modifitseeritud struktuuriga kolme 3'-terminaalset nukleotiidi, mis olid disainitud oligonukleotiidi pikendamise tõkestamiseks.  
 20 Spetsiifiliselt sisaldab pesistatud oligo kolme fosfortioaadiga modifitseeritud terminaalset nukleotiidi ja 2' OMe, mis on disainitud pikendamise tõkestamiseks ning ekso- ja endonukleaasi aktiivsuse vastaseks kaitsmiseks. Selle oligo 3'-otsa nukleotiid on mittehübridiseeriv (c asemel on g). Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d üheminutilise 94 °C juures kuumutusdenatureerimise teel pesistatud oligost eemale, anniiliti ja  
 25 pikendati 68 °C juures 2 minutit ja seejärel 4 °C juures. Seejärel puhastati saadud teise ahela cDNA või inseneeritud matriits QIAGEN spinikolonniga (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade korral lihtne puhvri vahetus. Seda protseduuri korrati ja laiendati ülejäänud VH praimerite paneelile (vt praimerite loetelu), genereerimaks immunoglobuliini  
 30 produktide raamatukogu, mida võib kloonida asjakohasesse vektorisse.

**VH esimese karkassi spetsiifilised praimerid:**

- PRAIMER TMX24VH1a (SEQ. ID nr 25)  
 5 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTKCAGCTGGTGCAG
- PRAIMER TMX24VH1b (SEQ. ID nr 26)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCCAGCTTGTGCAG
- PRAIMER TMX24VH1c (SEQ. ID nr 27)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG
- 10 PRAIMER TMX24VH1d (SEQ. ID nr 28)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCARATGCAGCTGGTGCAG
- PRAIMER TMX24VH2a (SEQ. ID nr 29)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGATCACCTTGAAGGAG
- 15 PRAIMER TMX24VH2b (SEQ. ID Nr 30)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTTCACCTTGARGGAG
- PRAIMER TMX24VH3a (SEQ. ID nr 31)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG
- PRAIMER TMX24VH3b (SEQ. ID nr 32)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG
- 20 PRAIMER TMX24VH3c (SEQ. ID nr 33)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG
- PRAIMER TMX24VH4a (SEQ. ID nr 34)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG
- PRAIMER TMX24VH4b (SEQ. ID nr 35)  
 25 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGCAG
- PRAIMER TMX24VH5a (SEQ. ID nr 36)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG
- PRAIMER TMX24VH6a (SEQ. ID nr 37)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG
- 30 PRAIMER TMX24VH7a (SEQ. ID nr 38)  
 GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGCAA

Toodud järjestustes R on A ja G võrdne segu, K on G ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

Üksikpraimerit amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasi segu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ning järjestusega 5' GTG CTG  
 5 GCC GTT GGA AGA GGA GTG 3' (SEQ. ID nr 4) üksikpraimerit (TMX24). Proovid denatureeriti 95 °C juures 1-minutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline hoidmine 68 °C ja 4 °C juures.

10 Kloonimine ja järjestamine

Umbes 450 bp-ga amplifikatsiooni produktid geelpuhastati ja digesteeriti Xho I ja EcoR I-ga. Inserdid klooniti suvalisse ekspressioonivektoris, mis sisaldab IgM CH1 domeeni ülejäänud osa alates loomuliku EcoR I saidist kuni või sisaldades CH2  
 15 domeeni ning amplifitseeritud fragmentide kloonimiseks ühilduvat restriksioonisaiti.

**Näide 3**

Fagemiiddisplei raamatukogu konstrueerimine B-hepatiidi positiivse doonori mRNA-st

20 Esimese ahela cDNA sünteesimine ja modifitseerimine IgG raske ja kapp kerge ahela jaoks

B-hepatiidi suhtes vaksineeritud doonorilt pärineva inimese perifeerse vere lümfotsüüdi (PBL) mRNA kasutati oligo-dT praimeriga traditsionaalse esimese astme CDNA  
 25 genereerimiseks. See teostati, kasutades SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR-i (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES), järgides seejuures põhiliselt komplektiga kaasasolevat juhendit. Kaheahelalise DNA piirkonna, mille võib digesteerida IgG restriksiooni endonukleasiga ApaL I-ga või kapp kerge ahela Sac I-ga, genereerimiseks lisati esimese astme cDNA-le IgG "CGApaL I" või kapp kerge  
 30 ahela "CKSac I" restriksiooni oligonukleotiid. "CGApaL I" järjestus on 5' CCA GCG

- GCG TGC ACA CCT TCC 3' (SEQ. ID nr 39). "CKSacI" järjestus on 5' AGG GCC TGA GCT CGC CCG TC 3' (SEQ. ID. nr 40). Reaktsioon teostati esimese ahela cDNA, 1 uM oligonukleotiidi ja vastava koguse 10X restriksioonipuhvriga A (Roche Diagnostics). Proovi kuumutati 95 °C juures 2 minutit ja siis hoiti seda 64 °C juures 2 minutit, tagamaks spetsiifilise anniilumise ja siis see jahutati 37 °C-ni. Lisati restriksiooni endonukleasid ApaI või Sac I (New England Biolabs) ning proovi inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Restriksiooni ensüüm inaktiveeriti Sac I suhtes 20-minutilise 65 °C juures kuumutamisega ning seejärel jahutati proov 4 °C-ni.
- 10 Esimese ahela cDNA digestiooni iga restriksiooni endonukleasiga kontrolliti PCR-amplifikatsiooni kaudu, kasutades antud ala asjatundjatele tuntud tehnilisi vahendeid. Neidprodukte ei kasutatud antikeha geenide kloonimiseks. Digesteeritud esimese ahela cDNA positiivset amplifikatsiooni täheldati reaktsioonides, kus oli kasutatud 5' VBVH1a ja 3' CG0 sisekontrolli praimerit IgG suhtes ning 5' VBVK1a ja 3' CK0 sisekontrolli praimerit kappa suhtes. Hea amplifikatsioon praimeritega 5' VBVH1a/3' CG0 või 5' VBVK1a/3' CK0 ja minimaalne amplifikatsioon praimeritega 5' VBVH1a/3' CG1Z või 5' VK1a/3' CK1dx2 viitavad esimese astme cDNA matriitsi edukale digestioonile iga restriksiooni endonukleasiga. PCR kontrollimiseks kasutatud praimerite järjestused olid VBVH1a: 5' GAG CCG CAC GAG CCC CTC GAG CAG  
 20 GTK CAG CTG GTG CAG 3' (SEQ. ID nr 41); CG0: 5' GRG CGC CTG AGT TCC ACG ACA CCG 3' (SEQ. ID nr 42); VBVK1a: 5' GAC GCG CAC AAC ACG GAG CTC RAC ATC CAG ATG ACC CAG 3' (SEQ. ID nr 43); CK0: 5' GTG ACT TCG CAG GCG TAG ACT T 3' (SEQ. ID nr 44); CG1z: 5' GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG 3' (SEQ. ID nr 45); CK1dx2: 5' AGA CAG TGA GCG CCG  
 25 TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G 3' (SEQ. ID Nr 46).

Kerge ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

Sac I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise ahela cDNA reaktsioonide alustamiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist praimerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit (Applied Biosystems). Praimerid disainiti, sisaldades kappi korral ettemääratud TMX24K järjestust 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' (SEQ. ID nr 47), Xba I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis annilus inimese antikeha kappi kerge ahela geenide esimeses karkassis esimese ahela cDNA-l. Nood annilunud järjestused

10 pärinesid VBase andmebaasi praimeritest ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)), mis disainiti inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal ja mis teatavasti katavad inimese antikeha kappi kerge ahela geenide kogu repertuaari.

**Kappi kerge ahela esimese karkassi spetsiifilised praimerid:**

TMX24Vk1a (SEQ. ID nr 48) Xba I  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGARACATCCAGATGACCCAG

TMX24Vk1b (SEQ. ID nr 49)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGMCATCCAGTTGACCCAG

20 TMX24Vk1c (SEQ. ID nr 50)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGCCATCCRGATGACCCAG

TMX24Vk1d (SEQ. ID nr 51)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGTCATCTGGATGACCCAG

25 TMX24Vk2a (SEQ. ID nr 52)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATTGTGATGACCCAG

TMX24Vk2b (SEQ. ID nr 53)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATRTTGTGATGACTCAG

TMX24Vk3a (SEQ. ID nr 54)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGTTGACRCAG

30 TMX24Vk3b (SEQ. ID nr 55)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATAGTGATGACGCAG

TMX24Vk3c (SEQ. ID nr 56)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTAATGACACAG

TMX24Vk4a (SEQ. ID NR. 57)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCGTGATGACCCAG

TMX24Vk5a (SEQ. ID nr 58)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAACGACACTCACGCAG

5 TMX24Vk6a (SEQ. ID nr 59)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAG

TMX24Vk6b (SEQ. ID nr 60)

GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTGTGATGACACAG

- 10 Eelnevates järjestustes R on A ja G võrdne segu, M on A ja C võrdne segu, Y on C ja T võrdne segu, W on A ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Kappa ahelate korral "TMX24CKnpt"-na tähistatud pesistatud oligo lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. "TMX24CKnpt" sisaldab ettemääratud järjestust TMX24K ja järjestuseks oli 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG CTC GAG CTC AGG CCC TGA TGG GTG ACT TCG CT 3' (SEQ. ID nr 61). Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d pesistatud oligost eemale 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, 20 anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinokoloni (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

#### Kerge ahela üksikpraimeri amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja kappa ahelate "TMX24K" praimerit. "TMX24K" järjestus on 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' 30 (SEQ. ID nr 62). Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamisega,

seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

#### Kerge ahela kloonimine

5

Amplifikatsiooni kappa-produktid geelpuhastati ja seejärel digesteeriti Xba I ja Sac I-ga. Inserdid klooniti sobivasse ekspressioonivektoris, mis sisaldas kappa kerge ahela konstantse piirkonna ülejäänud osa. Ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA maksiprepi (QIAGEN) kerge ahela raamatukogu DNA taastamiseks. Seejärel kasutati 10 kerge ahela raamatukogu DNA järgnevates astmetes Xho I/Age I-ga raamatukogu konstrueerimise lõpuleviimiseks raske ahela Fd fragmentidesse kloonimiseks.

#### Raske ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

ApaL I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise ahela cDNA reaktsioonide alustamiseks, kasutades seejuures esimese karkassi spetsiifilist praimerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit (Applied Biosystems). Praimerid disainiti, sisaldamaks ettemääratud 20 TMX24 järjestust, Xho I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis annilus inimese antikeha raske ahela geenide esimeses karkassis esimese ahela cDNA-ga. Need anniilitud järjestused pärinesid VBase andmebaasi praimerite hulgast, mis olid disainitud inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal ning mis katavad teadaolevalt inimese antikeha raske ahela geenide kogu repertuaari.

#### **Raske ahela esimese karkassi spetsiifilised praimerid:**

TMX24VH1a (SEQ. ID nr 63)

GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCAGCTGGTGCAG

30 TMX24VH1b (SEQ. ID nr 64)

GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCCAGCTTGTGCAG

- TMX24VH1c (SEQ. ID nr 65)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG
- TMX24VH1d (SEQ. ID nr 66)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCARATGCAGCTGGTGCAG
- 5 TMX24VH2a (SEQ. ID nr 67)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGATCACCTTGAAGGAG
- TMX24VH2b (SEQ. ID nr 68)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACCTTGARGGAG
- 10 TMX24VH3a (SEQ. ID nr 69)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG
- TMX24VH3b (SEQ. ID nr 70)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG
- TMX24VH3c (SEQ. ID nr 71)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG
- 15 TMX24VH4a (SEQ. ID nr 72)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG
- TMX24VH4b (SEQ. ID nr 73)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGCAG
- 20 TMX24VH5a (SEQ. ID nr 74)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG
- TMX24VH6a (SEQ. ID nr 75)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG
- TMX24VH7a (SEQ. ID nr 76)  
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGCAA

Toodud järjestustes R on A ja G võrdne segu, K on G ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

- Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati
- 30 neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti
- jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligo-
- nukleotiid, tähistatud kui "TMX24CGnpt" (järjestusega 5' GTG CTG GCC GTT GGA
- AGA GGA GTG TGT TTG CAC GCC GCT GGT CAG RGC GCC TGA GTT G 3'
- (SEQ: ID nr 77)) lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. Nagu on näha joonisel fig.
- 35 1, oli IgM pesistatud oligo korral kolm 3'-terminaalset nukleotiidi oligo pikenemise

tõkestamiseks modifitseeritud. Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d pesistatud oligost eemale 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinnkoloni (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

#### Üksikpraimeri amplifikatsioon (SPA)

10 Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja praimerit "TMX24". Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamise, seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

#### Raske ahela kloonimine ja raamatukogu koostamine

Amplifitseeritud produktid koguti ning puhastati seejärel geelpuhastuse teel. DNA taastati QIAquick PCR puhastuskomplektiga (QIAGEN). DNA digesteeriti järgemööda 20 Xho I ja Age I restriksiooniensüümiga ja seejärel puhastati geelpuhastuse teel. Age I sait on IgG konstantse piirkonna CH1-s ApaL I saidist ülevoolu loomulikult olemas. DNA taastati QIAquick geeli ekstraktsioonikomplektiga (QIAGEN).

Kerge ahela raamatukogu DNA digesteeriti järgemööda Xho I ja Age I-ga ning siis 25 puhastati geelpuhastuse teel. Kerge ahela raamatukogu DNA ligeeriti raske ahela fragmentidega. Ligeeritud DNA asetati reaktsioonipuhvri ja DNA kontsentreerimiseks spinnkolonnile (PCR puhastuskomplekt, QIAGEN). Lõplik transformatsioon teostati elektrokompetentsetes XL-1 sinistes rakkudes (Stratagene).

Raamatukogu HBsAg suhtes paanimine ja skriinimine

Raamatukogu paaniti 4 vooru immobiliseeritud HbsAg suhtes, peamiselt nii nagu seda on kirjeldanud Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK ja Silverman, GJ (2001), Phage  
 5 Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2., 3. ja 4. vooru üksikkloone skriiniti HBs Ag suhtes ELISA analüüsi kaudu.

Esimese ahela cDNA sünteesimine ja lambda kerge ahela suhtes modifitseerimine

B-hepatiidi vastu vaktsineeritud doonorilt pärinevat inimese PBL mRNA kasutati oligo-  
 dT praimeriga traditsioonilise esimese ahela cDNA loomiseks. Selle teostamiseks kasutati SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (INVITROGEN LIFE  
 TECHNOLOGIES) komplekti põhiliselt komplektiga kaasasoleva juhendi järgi. Kahe-  
 15 ahelalise DNA piirkonna, mille saab restriksiooni endonukleas Sma I-ga digesteerida, genereerimiseks lisati restriksiooni oligonukleotiid "CLSma I" esimese ahela cDNA-le.  
 "CLSma I" järjestus on 5' GAC TTC TAC CCG GGA GCY GTG 3' (SEQ. ID nr 78), kus Y on C ja T segu. Reaktsioon alustati esimese ahela cDNA, 1 uM oligonukleotiidi ja sobiva koguse 10X restriksioonipuhvriga A (Roche Diagnostics). Proovi kuumutati  
 20 95 °C juures 2 minutit ning siis hoiti seda spetsiifiliseks anniilumiseks 2 minutit 64 °C juures ning seejärel jahutati 37 °C-ni. Lisati restriksiooni endonukleas Sma I (New England Biolabs) ja proovi inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Restriksiooniensüüm inaktiveeriti 65 °C juures kuumutamisega ning seejärel jahutati proov 4 °C-ni.

25 Esimese ahela cDNA restriksiooni endonukleasiga digesteerumist kontrolliti PCR amplifikatsiooni kaudu, kasutades seejuures antud ala asjundjatele tuntud tehnilisi võtteid. Neidprodukte ei kasutatud antikeha geenide kloonimiseks. Digesteeritud esimese ahela cDNA positiivset amplifikatsiooni vaadeldi reaktsioonis, kasutades 5'VBVL1a ja 3'CL0 sisekontrolli praimerit. Hea amplifikatsioon praimeritega  
 30 5'VBVL1a/3'CL0 ja minimaalne amplifikatsioon praimeritega 5'VBVL1a/3'CL2dx2

näitasid Sma I-ga esimese ahela cDNA matriitsi edukat digesteerumist. PCR kontrollipraimerit järjestused olid VBVL1a 5' GAC GCG CAC A AC ACG GAG CTC CAG TCT GTG CTG ACT CAG 3' (SEQ. ID nr 79), CL0 5' CCT CAG AGG AGG GYG GG A ACAG 3' (SEQ. ID nr 80) ja CL2Dx2 5' AGA CAG TGA CGC CGT CTA  
 5 GAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG 3' (SEQ. ID nr 81).

Lambda kerge ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

10 Sma I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise ahela vDNA reaktsioonide alustamiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist praimerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit (Applied Biosystems). Praimerid disainiti, sisaldades ettemääratud TMX24L järjestust, Xba I saiti ja piirkonda, mis anniilus inimese antikeha lambda kerge ahela geenide  
 15 karkassis esimese ahela cDNA-l. Need anniilunud järjestused pärinesid VBase andmebaasi praimeritest ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)), mis disainiti inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal ja mis teatavasti katavad inimese antikeha lambda kerge ahela geenide kogu repertuaari. Lambda kerge ahela esimese karkassi spetsiifilised praimerid on need, milliseid on kasutatud näites 4. Proovid denatureeriti  
 20 94 °C juures üheminutilise kuumutamise ja seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligonukleotiidid, mis on näites 4 tähistatud kui "TMX24CLnpt", lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. Nagu on näha joonisel fig. 7, on IgM pesistatud oligonukleotiidi "TMX24CMnpt" korral  
 25 "TMX24CLnpt" 3'-terminaalsed nukleotiidid oligo pikendamise tõkestamiseks modifitseeritud. Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d pesistatud oligonukleotiidist eemale 94 °C juures üheminutilise kuundenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks PCR puhastuskomplekti (QIAGEN). Selles

astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

#### Lambda kerge ahela üksikpraimerit amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades seejuures Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja praimerit "TMX24L". TMX24L ettemääratud järjestus on 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG 3' (SEQ. ID nr 82). Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures seismine.

#### Lambda kerge ahela kloonimine

Lambda kerge ahela amplifikatsiooniproduktid puhastati PCR puhastuskomplektiga (QIAGEN) ning digesteeriti Xba I ja Sac I-ga. Insert puhastati geelekstraktsiooni komplekti (QIAGEN) abil ning klooniti sobivasse vektorisse, mis sisaldas lambda kerge ahela konstantse piirkonna ülejäänud osa. Ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA maksiprepi (QIAGEN) lambda kerge ahela raamatukogu DNA taastamiseks.

#### Raske ahela kloonimine ja IgG lambda raamatukogu koostamine

Eespoolkoostatud lambda kerge ahela raamatukogu DNA digesteeriti järgemööda Xho I ja Age I-ga raske ahela Fd fragmentide, mis olid juba eespool kirjeldatud viisil IgG kappa raamatukogu jaoks valmistatud, insertsiooniks. Ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA maksiprepi (QIAGEN) kogu IgG lambda raamatukogu DNA taastamiseks.

Raamatukogu HBsAg suhtes paanimine ja skriinimine

Paanimist ja skriinimist teostati eespool IgG kappa raamatukogu korral kirjeldatud viisil. DNA järjestamises analüüsis ja iseloomustamises uuriti ELISA skriinimise teel

5 isoleeritud Fab kloone, mis ilmutasid HBsAg-ga spetsiifilist seostumist ja mittespetsiifilise proteiiniga, ovalbumiiniga minimaalset seostumist. Vt jooniseid fig. 8a-8e. B-hepatiidi vastu vaktsineeritud doonorilt pärinevast PBL mRNA-st valmistatud raamatukogudest isoleeriti HBsAg suhtes kokku 38 eristuvat IgG kappa Fab-i (25 rasket ahelat ja 37 kerget ahelat) ning 17 eristuvat IgG lambda Fab-i (13 rasket ahelat ja 16

10 kerget ahelat).

**Näide 4**

Faagdisplei antikeha raamatukogu konstrueerimine inimese PBL mRNA-st.

15 Esimese ahela cDNA sünteesimine ja kergete ahelate jaoks modifitseerimine

Doonorilt pärineva inimese PBL mRNA kasutati oligo-dT praimeriga traditsioonilise esimese ahela cDNA genereerimiseks, juhindudes peamiselt SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) komplekti kasutus-

20 juhendist. Kappa ja lambda kerge ahela reaktsioonid toimusid eraldi. Kaheaahelalise DNA piirkonna, mille võib digesteerida kappa kerge ahela restriksiooni endonukleasiga Sac I või lambda kerge ahela restriksiooni endonukleasiga Sma I, genereerimiseks lisati restriksiooni oligonukleotiid "CKSac I" või "CLSma I" esimese aheel cDNA-le. Kuna esineb hulgaliselt konstantseid lambda piirkondi (C1, C2, C3 ja

25 C6), siis on oluline märkida, et Sma I sait on konserveerunud kõigi funktsionaalsete konstantsete lambda domeenide (C1, C2, C3 ja C6) keskel. "CKSac I" järjestus on 5' AGG GCC TGA GCT CGC CCG TC 3' (SEQ. ID nr 179), "CLSma I" järjestus on 5' GAC TTC TAC CCG GGA GCY GTG 3' (SEQ. ID nr 180), kus Y on C ja T segu. Reaktsioonid on teostatud esimese ahela cDNA ja 1 uM oligonukleotiidiga. Proovi

30 kuumutatakse 95 °C juures 2 minutit ning siis hoitakse seda spetsiifiliseks anniilumiseks

2 minutit 64 °C juures. Proovidele lisatakse asjakohane kogus 10X restriksioonipuhvrit A (Roche Diagnostics) ning seejärel jahutatakse need 37 °C-ni. Lisatakse restriksiooni endonukleas Sac I või Sma I (New England Biolabs) ja proove inkubeeritakse 37 °C juures 30 minutit. Restriksiooniensüüm inaktiveeritakse 20-minutilise 65 °C juures kuumutamise ja seejärel proovid jahutatakse kuni 4 °C.

#### Kerge ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

Sac I digesteeritud esimese ahela cDNA-d või Sma I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise ahela cDNA reaktsioonide teostamiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist praimerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit (Applied Biosystems). Primerid disainiti, sisaldades TMX24K (kappa korral) või TMX24L (lambda korral) järjestust, Xba I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis annilub inimese antikeha kappa või lambda kerge ahela geenide karkassis esimese ahela cDNA-l. Need annilunud järjestused pärinesid VBase andmebaasi praimeritest ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)), mis disainiti inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal ja mis teatavasti katavad inimese antikeha kerge ahela geenide kogu repertuaari. Kappa kerge ahela esimese karkassi spetsiifilised primerid on need, milliseid on kasutatud näites 3. Vt praimerite järgmist loetelu kasutamiseks lambda amplifikatsioon.

#### **Lambda kerge ahela esimese karkassi spetsiifilised primerid:**

TMX24VL1a (SEQ. ID nr 181)  
 GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTTCTAGACAGTCTGTGCTGACTCAG  
 TMX24VL1b (SEQ. ID nr 182)  
 GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTTCTAGACAGTCTGTGYTGACGCAG  
 TMX24VL1c (SEQ. ID nr 183)  
 GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTTCTAGACAGTCTGTCGTGACGCAG  
 TMX24VL2 (SEQ. ID nr 184)  
 GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTTCTAGACAGTCTGCCCTGACTCAG  
 TMX24VL3a (SEQ. ID nr 185)

- GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATTCCTATGWGCTGACTCAG
- TMX24VL3b (SEQ. ID nr 186)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATTCCTATGAGCTGACACAG
- TMX24VL3c (SEQ. ID nr 187)  
5 GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATTCTTCTGAGCTGACTCAG
- TMX24VL3d (SEQ. ID nr 188)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATTCCTATGAGCTGATGCAG
- TMX24VL4 (SEQ. ID nr 189)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGCYTGTGCTGACTCAA
- 10 TMX24VL5 (SEQ. ID nr 190)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGSCTGTGCTGACTCAG
- TMX24VL6 (SEQ. ID nr 191)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGAAATTTATGCTGACTCAG
- 15 TMX24VL7 (SEQ. ID nr 192)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGRCTGTGGTGACTCAG
- TMX24VL8 (SEQ. ID nr 193)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGACTGTGGTGACCCAG
- TMX24VL4/9 (SEQ. ID nr 194)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACWGCCTGTGCTGACTCAG
- 20 TMX24VL10 (SEQ. ID nr 195)  
GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGGCAGGGCTGACTCAG

Toodud järjestustes R on A ja G võrdne segu, M on A ja C võrdne segu, Y on C ja T võrdne segu, W on A ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

- Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligonukleotiid, tähistatud kappi ahelate korral kui “TMX24CKnpt” või lambda ahelate korral kui “TMX24CLnpt” lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. Pesistatud oligonukleotiidi järjestused on: “TMX24CKnpt” 5’ GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG CTC GAG CTC AGG CCC TGA TGG GTG ACT TCG CT 3’ (SEQ. ID Nr 196) ja “TMX24CLnpt” 5’ GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG AAG AGC TCC TGG GTA GAA GTC ACT KAT SAG RCA CAG 3’ (SEQ. ID nr 197). Nagu on
- 30

näha joonisel fig. 7, oli IgM pesistatud oligo korral kolm 3'-terminaalset nukleotiidi oligo pikenemise tõkestamiseks modifitseeritud. Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega pesistatud oligost eemale. Saadud teise  
 5 ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinn-koloni (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

#### Kerge ahela üksikpraimeri amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja kappa ahelate korral praimerit "TMX24K" või lambda ahelate korral praimerit "TMX24L". "TMX24K" järjestus on 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' (SEQ. ID nr 198) ning "TMX24L"  
 15 järjestus on 5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG 3' (SEQ. ID nr 199). Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamise, seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

#### 20 Kerge ahela kloonimine

Kappa ja lambda amplifikatsiooniproduktid puhastati PCR puhastuskomplektiga (QIAGEN) ning neid puhastati veel kumbagi eraldi geelpuhastuse teel. Saadud produktid digesteeriti Xba I ja Sac I-ga. Inserdid klooniti sobivasse vektorisse, mis  
 25 sisaldas vastava kerge ahela konstantse piirkonna ülejäänud osa. Ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA "maxiprep"-i kerge ahela raamatukogu DNA taastamiseks. Kerge ahela raamatukogu DNA "prep"-e kasutati kloonimisvektorina raske ahela Fd fragmentide Xho I/EcoR I-ga insertiooniks, viies niiviisi raamatukogu koostamise  
 30 lõpule.

### Esimese ahela cDNA sünteesimine ja raske ahela jaoks modifitseerimine

Doonorilt pärineva inimese PBL mRNA kasutati oligo-dT praimeriga traditsioonilise  
5 esimese ahela cDNA genereerimiseks. Seejuures juhitud peamiselt SuperScript First-  
Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) komplekti  
kasutusjuhendist. Kaheaahelalise DNA piirkonna, mille võib digesteerida restriksiooni  
endonukleasiga Dra III, genereerimiseks lisati esimese ahela cDNA-le restriksiooni  
oligonukleotiid CMDra III. Reaktsioonid on viidud läbi esimese ahela cDNA ja 1 uM  
10 oligonukleotiidiga. Proovi kuumutati 95 °C juures 2 minutit ning siis hoiti seda  
spetsiifiliseks anniilumiseks 2 minutit 64 °C juures. Proovile lisati asjakohane kogus  
10X restriksioonipuhvrit H (Roche Diagnostics) ning seejärel jahutati see 37 °C-ni.  
Lisati restriksiooni endonukleas Dra III (New England Biolabs) ja proovi inkubeeriti  
37 °C juures 30 minutit ning seejärel jahutati 4 °C juures.

Esimese ahela cDNA Dra III-ga digestiooni kontrolliti PCR amplifikatsiooni kaudu.  
Amplifikatsiooniprodukte ei kasutatud antikeha fragmentide kloonimiseks. Diges-  
teeritud esimese ahela cDNA positiivset amplifikatsiooni vaadeldi reaktsioonides, kus  
kasutati kahe erinevalt puhverdatud tingimuse juures 5' VBVH1a ja 3' CM0 sise-  
20 kontrolli praimeerit. Praimeeritega 5'VBVH1a/3'CM0 hea amplifikatsioon ja praime-  
ritega 5'VBVH1a/3'CM1 minimaalne amplifikatsioon viitavad esimese ahela cDNA  
matriitsi edukale Dra III digestioonile.

### Raske ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

Dra III digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise  
ahela cDNA reaktsioonide läbiviimiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist  
praimeerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsiooni-  
puhvrit (Applied Biosystems). Praimeerid disainiti, sisaldades TMX24 järjestust, Xho I  
30 restriksioonisaiti ja piirkonda, mis on anniilunud inimese antikeha raske ahela geenide

karkassis esimese ahela cDNA-ga. Need anniilunud järjestused pärinesid VBase andmebaasi praimeritest, mis on disainitud inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal ja mis teatavasti katavad inimese antikeha raske ahela geenide kogu repertuaari nagu seda on kirjeldatud näites 3. Raske ahela esimese karkassi spetsiifilised praimerid on  
5 need, mis on loetletud näites 3.

Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamisega ning seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligo-  
10 nukleotiid, mis on tähistatud kui "TMX24CMnpt" (nagu kasutatud näites 3), lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d pesistatud oligost eemale 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinnkoloni  
15 (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvri vahetus.

#### Raske ahela üksikpraimeri amplifikatsioon (SPA)

20 Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja praimerit. "TMX24". Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

#### Raske ahela kloonimine ja raamatukogu koostamine

Umbes 500 bp amplifikatsiooniproduktid puhastati geelpuhastuse teel ning seejärel digesteeriti Xho I ja EcoR I-ga. Inserdid klooniti sobivasse vektorisse, mis sisaldas IgM

CH1 domeeni ülejäänud osa. Fab raamatukogu sisaldav ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse.

Bakteriofaagi pinnal Fab raamatukogu loomiseks kasutati supressorrakke, nagu näiteks XL1BLUE (Stratagene). Elektroporatsiooni järel loksutati rakke 1 tund 37 °C juures, seejärel lisati karbenitsilliini kuni kontsentratsiooni 20 ug/ml saavutamiseni. Pärast tunniajalist 37 °C juures loksutamist suurendati karbenitsilliini kogust kuni 50 ug/ml ja loksutamist jätkati 37 °C juures veel ühe tunni jooksul. Seejärel lisati VCS-M13 abistajafaag (Stratagene), andmaks kõik vajalikud komponendid fagemiidiosakeste genereerimiseks ning söötme ruumala SB keskkonnas tõsteti kuni 100 ml. Pärast tunniajalist 37 °C juures olekut lisati abistajafaagi DNA sisaldavate bakterite selekteerimiseks kanamütsiini kontsentratsiooniga kuni 70 ug/ml. Söödet loksutati 37 °C juures üleöö. Selle aja jooksul tootsid bakterid uusi fagemiidi osakesi, mis avaldasid oma pinnal Fab-i. Järgmisel hommikul võib fagemiidi osakesed eraldada spinnimise teel bakterirakkudest välja ning seejärel sadestada fagemiidi osakesed 30 minuti jooksul jääle olevast 4 % PEG 8000 ja 0,5 M NaCl supernatandist. Sadestunud faagi kuulike saadakse kiirusega 14300 x g tsentrifugimisega. Kuulikese võib PBS/1% BSA-s uuesti suspendeerida. Bakteriaalsete jääkide eemaldamiseks võib preparaadi filtreerida. Saadud raamatukogu on säilitatud 4° juures.

### Näide 5

Fagemiiddisplei raamatukogu konstrueerimine IgE või rekombinantse IgE Fc CH2-4-ga immuniseeritud hiirte mRNA-st.

25 Esimese ahela cDNA sünteesimine ja IgG raske ja kappa kerge ahela jaoks modifitseerimine

Oligo-dT praimeriga traditsionaalse esimese ahela cDNA genereerimiseks kasutati inimese IgE või inimese rekombinantse IgE-ga immuniseeritud hiirte põrna mRNA-d. Selle läbiviimiseks kasutati SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen

Life Technologies), juhindudes põhiliselt komplekti kasutamishendist. Kaheahelalise DNA piirkonna, mille võib digesteerida IgG1 restriksiooni endonukleasiga Xcm, IgG2a korral BsaI-ga või kappa kerge ahela korral Hpa I-ga, genereerimiseks lisati esimese ahela cDNA-le IgG1 korral restriksiooni oligonukleotiid "mCG1Xcm I",

5 IgG2a korral "mCG2aBsaI I" või kappa kerge ahela korral "mCKHpa I". "mCG1Xcm I" järjestus on 5'CTAACTCCAT GGTGACCCTGGGATG3' (SEQ. ID nr 200). "mCG2aBsaI I" järjestus on 5'CAACTGGCTCCTCGGT GACTCTAG3' (SEQ. ID nr 201). "mCKHpa I" järjestus on 5'CAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG3' (SEQ. ID nr 202). Reaktsioon viidi läbi esimese ahela cDNA, 1 uM oligonukleotiidi ja asjakohase

10 koguse 10X NE-puhvriga (New England Biolabs) või 10X restriksioonipuhvriga A (Roche Diagnostics). Proovi kuumutati 95 °C juures 2 minutit ja seejärel hoiti seda spetsiifiliseks anniilumiseks 2 minutit 64 °C juures ning jahutati Xcm I ja Hpa I korral 37 °C-ni ja BsaI I korral 60 °C-ni. Lisati restriksiooni endonukleas Xcm I, BsaI I või Hpa I (New England Biolabs) ning proove inkubeeriti vastavalt 37 °C juures 30 minutit,

15 60 °C juures 30 minutit ja 37 °C juures 10 minutit. Restriksiooniensüüm inaktiveeriti Xcm I korral 20-minutilise 65 °C juures, BsaI I korral 20-minutilise 80 °C juures kuumutamisega ning seejärel jahutati proov 4 °C-ni.

Esimese ahela cDNA restriksiooni endonukleasiga digesteerumist kontrolliti PCR

20 amplifikatsiooni kaudu, kasutades seejuures antud ala asjatundjatele tuntud tehnilisi võtteid. Neidprodukte ei kasutatud antikeha geenide kloonimiseks. Digesteeritud esimese ahela cDNA positiivset amplifikatsiooni vaadeldi reaktsioonides, kus kasutati IgG1 korral 5' TMX24mVHIIIBshort ja 3' mCG1 sisekontrolli praimerit, IgG2a korral 5' TMX24mVHIIIBshort ja 3' mCG2a sisekontrolli praimerit ning kappa korral 5'

25 TMX24mVKIVshort ja 3' mCK0 sisekontrolli praimerit. Hea amplifikatsioon praimeritega 5' TMX24mVHIIIBshort/3' mCG1 või praimeritega 5' TMX24mVHIIIBshort/3' mCG2a või 5' TMX24mVKIVshort/3' mCK0 ning mini-maalne amplifikatsioon praimeritega 5' TMX24mVHIIIBshort/3' mCGIB või 5' TMX24mVHIIIBshort/3' mCG2aB või 5' TMX24mVKIVshort/3' mCKB näitasid

esimese ahela cDNA matriitsi edukat digesteerumist iga restriksiooni endonukleasiga. PCR kontrollimiseks kasutatud praimerite järjestused olid

TMX24mVHIBshort (SEQ. ID nr 203)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCCAACTGCAGCAGYC3'

mCG1 (SEQ. ID nr 204) 5'CATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAG3'

mCG1B (SEQ. ID nr 205) 5'CAACGTTGCAGGTGACGGTCTC3'

mCG2a (SEQ. ID Nr 206) 5'CGAGGAGCCAGTTGTATCTCCAC3'

10 mCG2aB (SEQ. ID nr 207) 5'CCACATTGCAGGTGATGGACTG3'

TMX24mVKIVshort (SEQ. ID Nr 208)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAAWTGTGCTCACCCAGT  
CTC3'

mCK0 (SEQ. ID nr 209) 5'CTGCTCACTGGATGGTGGGAAG3'

15 mCKB (SEQ. ID nr 210) 5'GAGTGGCCTCACAGGTATAGCTG3'

#### Kerge ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligo pikendamine

Hpa I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati originaalmatriitsina kordsete teise  
20 ahela cDNA reaktsioonide teostamiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist prai-  
merit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit  
(Applied Biosystems). Praimerid disainiti, sisaldades kapp korral TMX24mK järjestust  
ja Xba I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis anniilus hiire antikeha kapp või lambda  
kerge ahela geenide esimeses karkassis esimese ahela cDNA-l. Need anniilunud  
25 järjestused disainiti Kabat andmebaasist (<http://Himmuno.bme.nwu.edu/>) pärinevate hiire  
antikehade praimeritest mis disainiti inimese antikehade tuntud järjestuste põhjal, kattes  
hiire antikeha kapp kerge ahela geenide kogu repertuaari.

**D. Kappa esimese karkassi spetsiifilised praimerid:**TMX24mVKIshort (SEQ. ID nr 211) Xba I

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGWCACAGT  
 5 CTC3'

TMX24mVKIIshort (SEQ. ID nr 212)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTKTGATGACCCARAC  
 TC3'

TMX24mVKIIbshort (SEQ. ID nr 213)

10 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGACKCAGG  
 CTG3'

TMX24mVKIIIshort (SEQ. ID nr 214)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACA WTGTGCTGACCCART  
 CTC3'

TMX24mVKIVshort (SEQ. ID nr 215)

15 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAA WTGTGCTCACCCAGT  
 CTC3'

TMX24mVKVshort (SEQ. ID nr 216)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCCAGATGACMCAGT  
 20 CTC3'

TMX24mVKbshort (SEQ. ID nr 217)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATCCAGATGACACAGA  
 CTAC3'

TMX24mVKcshort (SEQ. ID nr 218)

25 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTSATGACCCAGTC  
 3'

TMX24mVKVIshort (SEQ. ID nr 219)

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGACAAATTGTTCTCACCCAGTC  
 TC3'

Kusjuures R on A ja G võrdne segu, M on A ja C võrdne segu, K on G ja T võrdne segu, W on A ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligonukleotiid, tähistatud kappahelate korral kui "TMX24mCKnoer" lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. "TMX24CKnpt" järjestus on 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCCGGATGTCTAACTGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGG2' OMe[A(ps)U(ps)U(ps)](propüül) 3' (SEQ. ID nr 220). Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamisega pesistatud oligost eemale. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits) puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinokoloni (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

#### Kerge ahela üksikpraimer amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja kappahelate praimerit "TMX24mK". "TMX24mK" järjestus on 5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTG3' (SEQ. ID nr 221). Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamisega, seejärel tsüklistati neid 25 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

#### Kerge ahela kloonimine

Kappa amplifikatsiooniproduktid puhastati geelpuhastuse teel ja digesteeriti seejärel Xba I ja BspE I-ga. Insetid klooniti sobivasse ekspressioonivektoris, mis sisaldas vastava kappa kerge ahela konstantse piirkonna ülejäänud osa. Ligeeritud produkt

sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*'sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA "maxiprep"-i kerge ahela raamatukogu DNA taastamiseks. Kerge ahela raamatukogu DNA kasutati järgmistes astmetes raske ahela Fd fragmentide Xho I/Bln I-ga kloonimiseks, viies allpool lõigus 'raske ahela kloonimine'

5 kirjeldatud viisil raamatukogu koostamise lõpule.

#### Raske ahela teise ahela lineaarne amplifikatsioon ja pesistatud oligopikendamine

Hcm I ja BsaJ I digesteeritud esimese ahela cDNA-d kasutati kordsete teise ahela

10 cDNA reaktsioonide teostamiseks, kasutades esimese karkassi spetsiifilist praimerit (lõplikult 0,4 uM), dNTP-id, AmpliTaq ensüümi ja selle 10X reaktsioonipuhvrit (Applied Biosystems). Praimerid disainiti, sisaldades TMX24mH järjestust, Xho I restriksioonisaiti ja piirkonda, mis annilus hiire antikeha raske ahela geenide esimeses karkassis esimese ahela cDNA-l. Need annilunud järjestused disainiti Kabat andme-

15 baasist (<http://immuno.bme.nwu.edu/>) pärinevate hiire antikehade tuntud järjestuste põhjal, kattes hiire antikeha raske ahela geenide kogu repertuaari.

#### **Raske ahela esimese karkassi spetsiifilised praimerid:**

20 TMX24mVHIAshorter (SEQ. ID nr 222) Xho I  
 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTTCAGSAGTC3'

TMX24mVHIBshorter (SEQ. ID nr 223)  
 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTGAAGSAGTC3'

TMX24mVHIIAshorter (SEQ. ID nr 224)  
 25 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTYCAGCTGCARCARTC3'

TMX24mVHIIIBshorter (SEQ. ID nr 225)  
 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCCAAGTGCAGCAGYC3'

TMX24mVHIICshorter (SEQ. ID nr 226)  
 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTC3'

TMX24mVHIIIAshorter (SEQ. ID nr 227)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTGGTGGAGWC3'

TMX24mVHIIIBshorter (SEQ. ID nr 228)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTTCTGGAGTC3'

5 TMX24mVHIIIDshorter (SEQ. ID nr 229)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGMAGCTGGTGGAGTC3'

Kusjuures R on A ja G võrdne segu, M on A ja C võrdne segu, Y on C ja T võrdne segu ning S on C ja G võrdne segu.

Proovid denatureeriti 94 °C juures üheminutilise kuumutamise, seejärel tsüklistati neid 20 korda 94 °C juures 5 sekundi, 56 °C juures 10 sekundi ja 68 °C juures 2 minuti jooksul. See tagas teise ahela cDNA lineaarse amplifikatsiooni. Pesistatud oligonukleotiid, tähistatud IgG1 korral kui "TMX24mCG1noer" ja IgG2a korral kui

15 "TMX24mCG2anoer" lisati jääl lõppkontsentratsiooniga 0,2 uM. "TMX24mCG1noer" järjestus oli 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCCTAGGGTTACCATGGAG TTAGTTTGG GCAGCAGA2'OMe[U(ps)C(ps)A(ps)](propüül) 3' (SEQ. ID nr 230) ja "TMX24mCG2anoer" järjestus oli 5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCCTAG GGTCATCGAGGAGCCAGTTGTA TCTCCACA2' OMe[C(ps)A(ps)U(ps)](propüül)

20 3' (SEQ. ID nr 231).

Seejärel pikendati teise ahela cDNA-d 94 °C juures üheminutilise kuumdenatureerimisega, anniilimisega ning 68 °C juures 2-minutilise, seejärel 4 °C juures pikendamise, pesistatud oligost eemale. Saadud teise ahela cDNA-d (inseneeritud matriits)

25 puhastati, kasutades selleks QIAGEN spinokoloni (PCR puhastuskomplekt). Selles astmes eemaldatakse vabad oligonukleotiidid ja tagatakse päripidiste eeskirjade järgne lihtne puhvrivahetus.

Raske ahela üksikpraimerit amplifikatsioon (SPA)

Inseneeritud matriits amplifitseeriti, kasutades selleks Advantage 2 polümeraasisegu (Clontech) ja selle 10X reaktsioonipuhvrit, dNTP-id ja raskete ahelate praimerit

5 “TMX24mH”. “TMX24mH” järjestus on 5’GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTG3’ (SEQ. ID nr 232). Proovid denatureeriti 95 °C juures üheminutilise kuumutamise, seejärel tsüklistati neid IgG1 korral 28 korda ja IgG2a korral 30 korda 95 °C juures 5 sekundi ja 68 °C juures 1 minuti jooksul. Sellele järgnes täiendav 3-minutiline 68 °C ja 4 °C juures hoidmine.

Raske ahela kloonimine

Raske ahela amplifikatsiooniproduktid puhastati geelpuhastuse teel ja digesteeriti seejärel Xho I ja Bln I-ga. Insertid klooniti kappa ahela raamatukogu DNA-desse, mis

15 sisaldasid IgG1 ja IgG2a rakse ahela konstantse piirkonna ülejäänud osa. Ligeeritud produkt sisestati elektroporatsiooni teel *E. coli*’sse ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel hommikul kasutati DNA maksiprepi IgG1 kappa või IgG2a kappa raamatukogu DNA taastamiseks.

20 Raamatukogude paanimine ja skriinimine rekombinantset IgE Fc CH2-4-l

Raamatukogud paaniti 4 vooruga rekombinantse IgE Fc CH2-4-l põhiliselt nii, nagu seda on kirjeldanud Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK ja Silverman, GJ (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

25 Spring Harbor, New York. Paanimise 2., 3. ja 4.vooru üksikkloonid skriiniti ELISA analüüsis rekombinantse IgE Fc CH2-4-l.

Kloone, mis ilmutasid ELISA analüüsi põhjal spetsiifilist IgE Fc CH2-4-ga seostumist ja minimaalset mittespetsiifilise proteiiniga, ovalbumiiniga seostumist, analüüsiti DNA

järjestuse järgi. Hiirte raamatukogust eraldati kokku 31 eristatavat IgE Fc CH2-4 seostunud Fab-i. Vt jooniseid fig. 9a-9d.

On arusaadav, et siinjuures kirjeldatud teostusviisides võib teha erinevaid modifikat-  
5 sioone. Seetõttu ei tule eespool kirjeldatud teostusviise käsitleda leiutise ulatust piirava-  
vatena, vaid need on lisatud üksnes eelistatud teostusviiside näitlikustamise eesmärgil.

**Patendinõudlus**

1. Meetod nukleiinhappe amplifitseerimiseks, sisaldades
- a) praimer annilimist matriitsiga, kusjuures praimer sisaldab esimest osa, mis  
5 anniilub matriitsiga ning ettemääratud järjestusega teist osa, mis matriitsiga ei anniilu;
  - b) polünukleotiidi sünteesimist, mis on komplementaarne matriitsi osaga, mis paikneb  
praimer esimese osa matriitsil anniilumise asukoha ja matriitsi otsa vahel, kusjuures  
polünukleotiid sisaldab selle esimese otsas ja selle teises otsas praimerit;
  - c) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi matriitsilt eraldamist;
  - 10 d) oligonukleotiidmatriitsi astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi teisel otsal  
anniilimist, kusjuures oligonukleotiidmatriits sisaldab esimest osa, mis on anniilunud  
polünukleotiidi teise otsaga ning teist osa, mis on samasuguse ettemääratud järjestusega  
nagu praimer teine osa;
  - e) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi pikendamist, andmaks selle terminaalse osa,  
15 mis on ettemääratud järjestusega komplementaarne, kusjuures mainitud oligonukleotiid-  
matriits ei ole selle 3'-otsas pikenenud; ning
  - f) pikendatud polünukleotiidi amplifitseerimist, kasutades ettemääratud järjestusega  
üksipraimerit.
- 20 2. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures oligonukleotiidmatriitsi anniilimisaste  
sisaldab erinevate järjestustega oligonukleotiidmatriitside kogumit ning oligonukleotiid-  
matriitside kogumi viimist astmes (b) sünteesitud polünukleotiidiga kokkupuutesse.
3. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures matriits on enne praimer annilimist  
25 digesteeritud.
4. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures astmes (b) sünteesitud polünukleotiid  
on enne oligonukleotiidmatriitsi annilimist digesteeritud.
- 30 5. Meetod nukleiinhappe amplifitseerimiseks, sisaldades

- a) praimer ja piirneva oligonukleotiidi matriitsiga anniilimist, kusjuures praimer sisaldab esimest osa, mis anniilub matriitsiga ja ettemääratud järjestusega teist osa, mis matriitsiga ei anniilu, kusjuures piirnev oligonukleotiid seostub matriitsiga praimer 3'-otsast allavoolu paiknevas asendis ning katkestab praimer piki matriitsi pikenemise umbes selles asendis, millega on piirneva oligonukleotiidi 5'-ots seostunud;
- b) polünukleotiidi sünteesimist, mis on komplementaarne matriitsi osaga, mis paikneb praimer esimese osa matriitsil anniilumise asukoha ja matriitsi selle osa vahel, millega on piirnev oligonukleotiid anniilunud, kusjuures polünukleotiid sisaldab selle esimese otsa ja selle teise otsa praimerit;
- c) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi matriitsilt eraldamist;
- d) oligonukleotiidmatriitsi astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi teisel otsal anniilimist, kusjuures oligonukleotiidmatriits sisaldab esimest osa, mis on anniilunud polünukleotiidi teise otsaga ning teist osa, mis on samasuguse ettemääratud järjestusega nagu praimer teine osa;
- e) astmes (b) sünteesitud polünukleotiidi pikendamist, andmaks selle terminaalse osa, mis on ettemääratud järjestusega komplementaarne, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriits ei ole selle 3'-otsas pikenenud; ning
- f) pikendatud polünukleotiidi amplifitseerimist, kasutades ettemääratud järjestusega üksikpraimerit.

6. Meetod vastavalt nõudluspunktile 5, kusjuures oligonukleotiidmatriitsi anniilimisaste sisaldab erinevate järjestustega oligonukleotiidmatriitside kogumit ning oligonukleotiidmatriitside kogumi viimist astmes (b) sünteesitud polünukleotiidiga kokkupuutesse.

7. Meetod antikeha raamatukogu loomiseks, sisaldades

- a) matriitside mitmekesise populatsiooni valmistamist;
- b) matriitside mitmekesise populatsiooni viimist kokkupuutesse vähemalt ühe praimeriga, kusjuures see vähemalt üks praimer sisaldab esimest osa, mis anniilub matriitsiga ja ettemääratud järjestusega teist osa, mis matriitsiga ei anniilu;

- c) polünukleotiidi sünteesimist, mis on komplementaarne matriitsi osaga, mis paikneb praimeril esimene osa matriitsil anniilumise asukoha ja matriitsi otsa vahel, kusjuures polünukleotiid sisaldab selle esimese otsas ja selle teises otsas praimerit;
- d) astmes (c) sünteesitud polünukleotiidi matriitsilt eraldamist;
- 5 e) vähemalt ühe oligonukleotiidmatriitsi astmes (c) sünteesitud polünukleotiidi teisel otsal anniilimist, kusjuures vähemalt üks oligonukleotiidmatriits sisaldab esimest osa, mis on anniilunud polünukleotiidi teise otsaga ning teist osa, mis on samasuguse ettemääratud järjestusega nagu praimeril teine osa;
- f) astmes (c) sünteesitud polünukleotiidi pikendamist, andmaks selle terminaalse osa,
- 10 mis on ettemääratud järjestusega komplementaarne, kusjuures mainitud vähemalt üks oligonukleotiidmatriits ei ole selle 3'-otsas pikenenud; ning
- g) pikendatud polünukleotiidi amplifitseerimist, kasutades ettemääratud järjestusega üksikpraimerit.
- 15 8. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1 või 5, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriitsi 3'-ots ei hübridiseeru astmes (b) sünteesitud polünukleotiidiga.
9. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1 või 5, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriitsi 3'-ots sisaldab modifitseeritud aluseid, mis tõkestavad mainitud oligonukleotiidmatriitsi
- 20 3'-otsas pikenemise.
10. Meetod vastavalt nõudluspunktile 5, kusjuures mainitud piirneva oligonukleotiidi 3'-ots ei hübridiseeru matriitsiga.
- 25 11. Meetod vastavalt nõudluspunktile 5, kusjuures piirnev oligonukleotiid sisaldab lukustatud nukleiinhapet, mis tõkestab mainitud piirneva oligonukleotiidi 3'-otsas pikenemise.
12. Meetod vastavalt nõudluspunktile 7, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriitsi 3'-
- 30 ots ei hübridiseeru astmes (c) sünteesitud polünukleotiidiga.

13. Meetod vastavalt nõudluspunktile 7, kusjuures mainitud oligonukleotiidmatriitsi 3'-ots sisaldab modifitseeritud aluseid, mis tõkestavad mainitud oligonukleotiidmatriitsi 3'-otsas pikenemise.

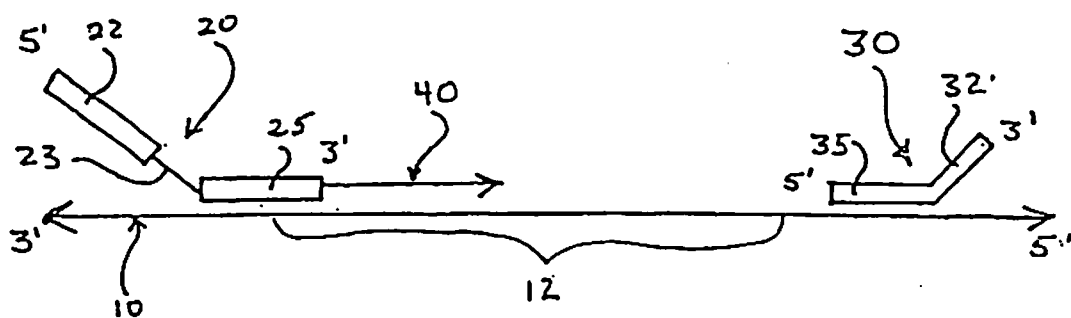


Fig. 1

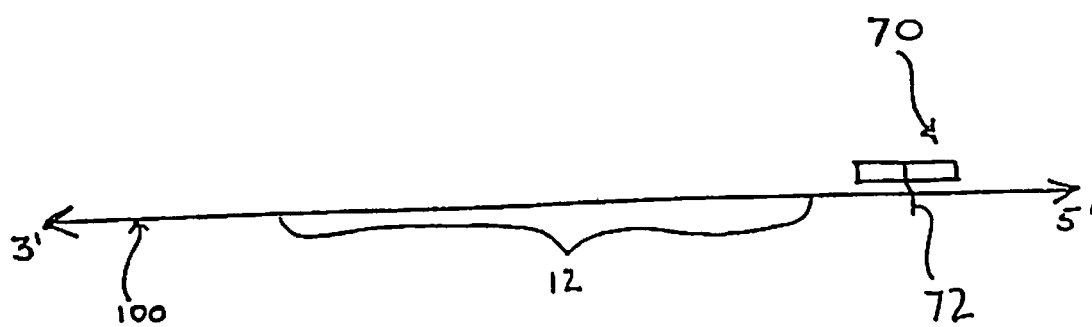


Fig. 2A

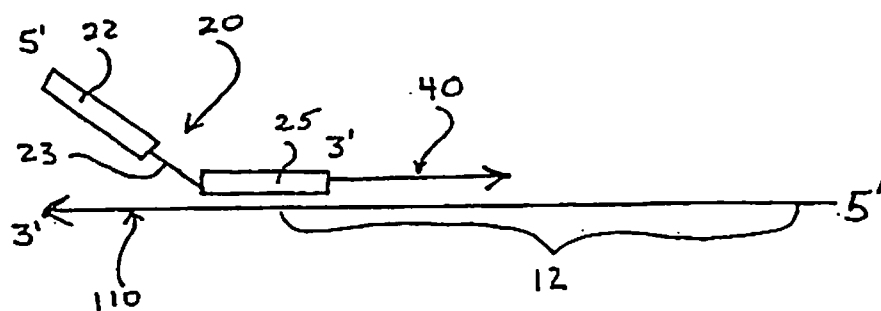
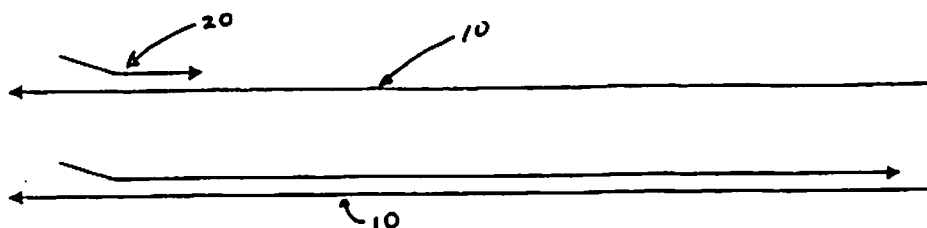
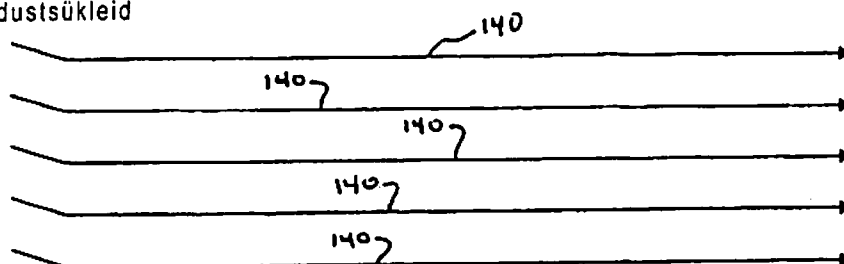


Fig. 2B

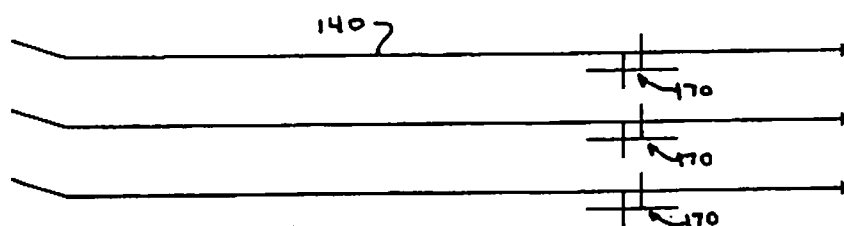
Teise ahela cDNA sünteesimine esimese ahela cDNA-I praimeriga, millel on antikeha geeni muutliku piirkonnaga hübridiseeruv esimene osa ja ettemääratud järjestusega teine osa



Korda kordustükkeid



Hübridiseeri restriktiooni oligonukleotiid antikeha geeni konstantses piirkonnas soovitud asendis ning digesteeri asjakohase restriktiooniensüümiga (RED)



Denatureeri kuumutamisega ja lisa pesistatud oligonukleotiid ning teosta pesistatud oligonukleotiidi ekstensioonireaktsioon (NOER)

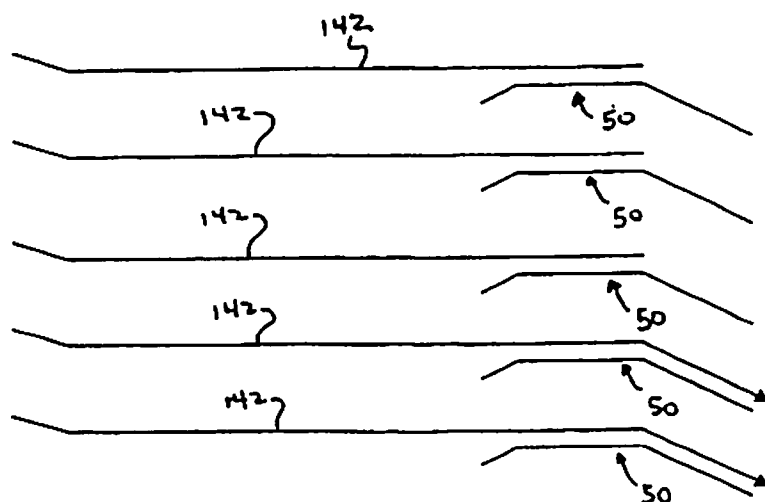


Fig. 3

3/14

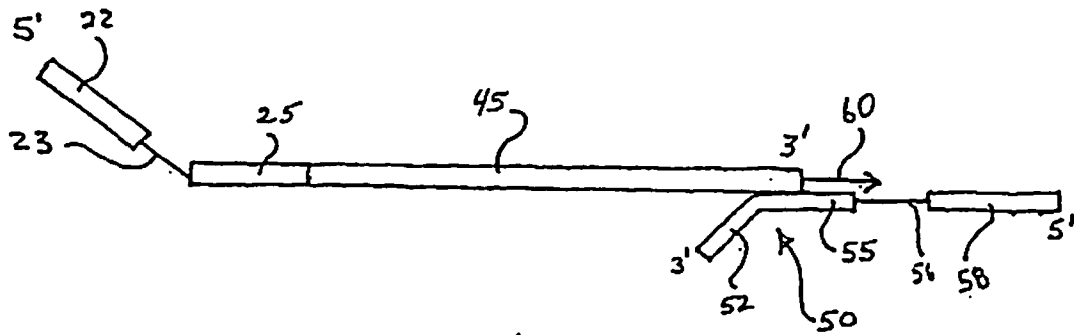
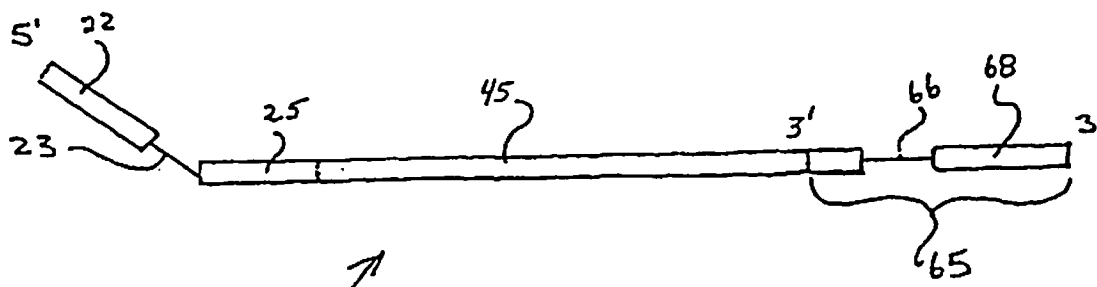


Fig. 4



120 ↗

Fig. 5

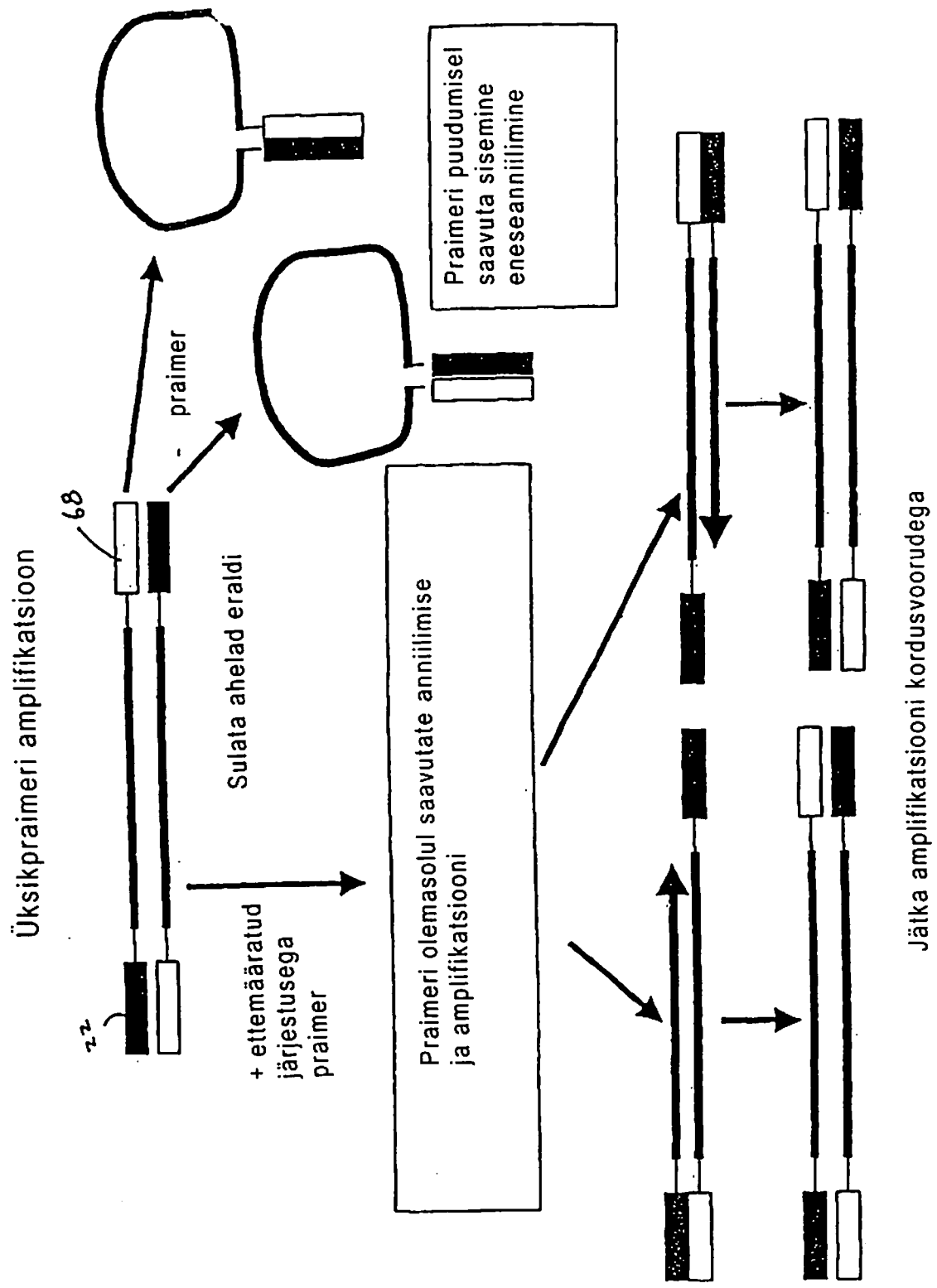


Fig. 6

5/14

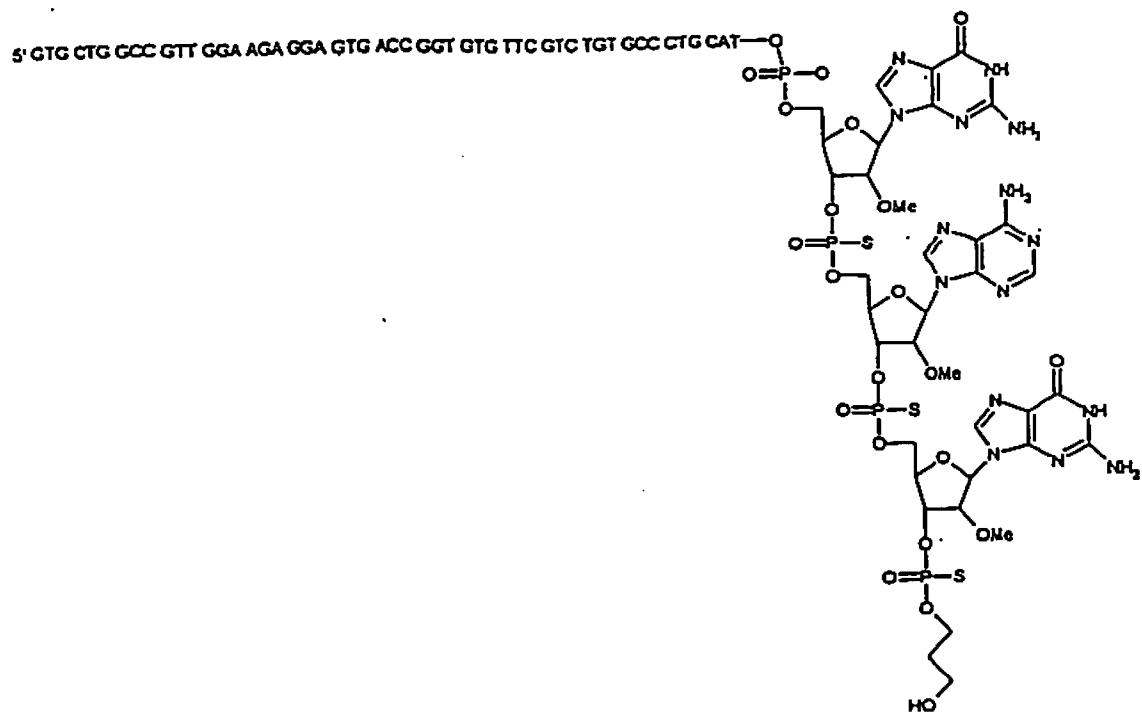


Fig. 7

IgG kappa kloonid  
Raske ahel

| Fab     | karkass 1                     | CDR1    | karkass 2                       | CDR3 |
|---------|-------------------------------|---------|---------------------------------|------|
| HBPAK1a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT | S--ITTH | WYQAPGKGLNHS YIST--TSSSTTTADSVK | VH3  |
| HBPAK1b | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1c | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1d | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1e | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT | S--ITTH | WYQAPGKGLNHS YIST--TSSSTTTADSVK | VH3  |
| HBPAK1f | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1g | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1h | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1i | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1j | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1k | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1l | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1m | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1n | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1o | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1p | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1q | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1r | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1s | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1t | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1u | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1v | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1w | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1x | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1y | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |
| HBPAK1z | Q...L...V...T...T...T...      | .....   | .....                           | VH3  |

| Fab     | karkass 3                  | CDR3                       | JH                    |
|---------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| HBPAK1a | RFSISRMAHSLTQMSLRDSTAVTCAR | VFFVDS9-----YNSFLMGRLTAVSS | JH2 (Seq. ID No. 83)  |
| HBPAK1b | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 84)  |
| HBPAK1c | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 85)  |
| HBPAK1d | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 86)  |
| HBPAK1e | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 87)  |
| HBPAK1f | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 88)  |
| HBPAK1g | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 89)  |
| HBPAK1h | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 90)  |
| HBPAK1i | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 91)  |
| HBPAK1j | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 92)  |
| HBPAK1k | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 93)  |
| HBPAK1l | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 94)  |
| HBPAK1m | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 95)  |
| HBPAK1n | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 96)  |
| HBPAK1o | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 97)  |
| HBPAK1p | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 98)  |
| HBPAK1q | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 99)  |
| HBPAK1r | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 100) |
| HBPAK1s | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 101) |
| HBPAK1t | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 102) |
| HBPAK1u | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 103) |
| HBPAK1v | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 104) |
| HBPAK1w | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 105) |
| HBPAK1x | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 106) |
| HBPAK1y | .....                      | .....                      | JH2 (Seq. ID No. 107) |

Fig 8a

| CDR1 | CDR2 | CDR3 | CDR4 | CDR5 | CDR6 | CDR7 | CDR8 | CDR9 | CDR10 | CDR11 | CDR12 | CDR13 | CDR14 | CDR15 | CDR16 | CDR17 | CDR18 | CDR19 | CDR20 | CDR21 | CDR22 | CDR23 | CDR24 | CDR25 | CDR26 | CDR27 | CDR28 | CDR29 | CDR30 | CDR31 | CDR32 | CDR33 | CDR34 | CDR35 | CDR36 | CDR37 | CDR38 | CDR39 | CDR40 | CDR41 | CDR42 | CDR43 | CDR44 | CDR45 | CDR46 | CDR47 | CDR48 | CDR49 | CDR50 | CDR51 | CDR52 | CDR53 | CDR54 | CDR55 | CDR56 | CDR57 | CDR58 | CDR59 | CDR60 | CDR61 | CDR62 | CDR63 | CDR64 | CDR65 | CDR66 | CDR67 | CDR68 | CDR69 | CDR70 | CDR71 | CDR72 | CDR73 | CDR74 | CDR75 | CDR76 | CDR77 | CDR78 | CDR79 | CDR80 | CDR81 | CDR82 | CDR83 | CDR84 | CDR85 | CDR86 | CDR87 | CDR88 | CDR89 | CDR90 | CDR91 | CDR92 | CDR93 | CDR94 | CDR95 | CDR96 | CDR97 | CDR98 | CDR99 | CDR100 | CDR101 | CDR102 | CDR103 | CDR104 | CDR105 | CDR106 | CDR107 | CDR108 | CDR109 | CDR110 | CDR111 | CDR112 | CDR113 | CDR114 | CDR115 | CDR116 | CDR117 | CDR118 | CDR119 | CDR120 | CDR121 | CDR122 | CDR123 | CDR124 | CDR125 | CDR126 | CDR127 | CDR128 | CDR129 | CDR130 | CDR131 | CDR132 | CDR133 | CDR134 | CDR135 | CDR136 | CDR137 | CDR138 | CDR139 | CDR140 | CDR141 | CDR142 | CDR143 | CDR144 | CDR145 | CDR146 | CDR147 | CDR148 | CDR149 | CDR150 | CDR151 | CDR152 | CDR153 | CDR154 | CDR155 | CDR156 | CDR157 | CDR158 | CDR159 | CDR160 | CDR161 | CDR162 | CDR163 | CDR164 | CDR165 | CDR166 | CDR167 | CDR168 | CDR169 | CDR170 | CDR171 | CDR172 | CDR173 | CDR174 | CDR175 | CDR176 | CDR177 | CDR178 | CDR179 | CDR180 | CDR181 | CDR182 | CDR183 | CDR184 | CDR185 | CDR186 | CDR187 | CDR188 | CDR189 | CDR190 | CDR191 | CDR192 | CDR193 | CDR194 | CDR195 | CDR196 | CDR197 | CDR198 | CDR199 | CDR200 | CDR201 | CDR202 | CDR203 | CDR204 | CDR205 | CDR206 | CDR207 | CDR208 | CDR209 | CDR210 | CDR211 | CDR212 | CDR213 | CDR214 | CDR215 | CDR216 | CDR217 | CDR218 | CDR219 | CDR220 | CDR221 | CDR222 | CDR223 | CDR224 | CDR225 | CDR226 | CDR227 | CDR228 | CDR229 | CDR230 | CDR231 | CDR232 | CDR233 | CDR234 | CDR235 | CDR236 | CDR237 | CDR238 | CDR239 | CDR240 | CDR241 | CDR242 | CDR243 | CDR244 | CDR245 | CDR246 | CDR247 | CDR248 | CDR249 | CDR250 | CDR251 | CDR252 | CDR253 | CDR254 | CDR255 | CDR256 | CDR257 | CDR258 | CDR259 | CDR260 | CDR261 | CDR262 | CDR263 | CDR264 | CDR265 | CDR266 | CDR267 | CDR268 | CDR269 | CDR270 | CDR271 | CDR272 | CDR273 | CDR274 | CDR275 | CDR276 | CDR277 | CDR278 | CDR279 | CDR280 | CDR281 | CDR282 | CDR283 | CDR284 | CDR285 | CDR286 | CDR287 | CDR288 | CDR289 | CDR290 | CDR291 | CDR292 | CDR293 | CDR294 | CDR295 | CDR296 | CDR297 | CDR298 | CDR299 | CDR300 | CDR301 | CDR302 | CDR303 | CDR304 | CDR305 | CDR306 | CDR307 | CDR308 | CDR309 | CDR310 | CDR311 | CDR312 | CDR313 | CDR314 | CDR315 | CDR316 | CDR317 | CDR318 | CDR319 | CDR320 | CDR321 | CDR322 | CDR323 | CDR324 | CDR325 | CDR326 | CDR327 | CDR328 | CDR329 | CDR330 | CDR331 | CDR332 | CDR333 | CDR334 | CDR335 | CDR336 | CDR337 | CDR338 | CDR339 | CDR340 | CDR341 | CDR342 | CDR343 | CDR344 | CDR345 | CDR346 | CDR347 | CDR348 | CDR349 | CDR350 | CDR351 | CDR352 | CDR353 | CDR354 | CDR355 | CDR356 | CDR357 | CDR358 | CDR359 | CDR360 | CDR361 | CDR362 | CDR363 | CDR364 | CDR365 | CDR366 | CDR367 | CDR368 | CDR369 | CDR370 | CDR371 | CDR372 | CDR373 | CDR374 | CDR375 | CDR376 | CDR377 | CDR378 | CDR379 | CDR380 | CDR381 | CDR382 | CDR383 | CDR384 | CDR385 | CDR386 | CDR387 | CDR388 | CDR389 | CDR390 | CDR391 | CDR392 | CDR393 | CDR394 | CDR395 | CDR396 | CDR397 | CDR398 | CDR399 | CDR400 | CDR401 | CDR402 | CDR403 | CDR404 | CDR405 | CDR406 | CDR407 | CDR408 | CDR409 | CDR410 | CDR411 | CDR412 | CDR413 | CDR414 | CDR415 | CDR416 | CDR417 | CDR418 | CDR419 |  |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|

**Fig 8b**

|         |      | CDR3                        |                                            |
|---------|------|-----------------------------|--------------------------------------------|
|         |      | JK                          |                                            |
|         |      | kalkass 3                   |                                            |
| Fab     |      |                             |                                            |
| HBPAK1b | 3A1  | GIPAFSGSGTFTLTISLSQSEDFVYVC | QQYNNP--ITFCQTRLR JK5 (Seq. ID No. 108)    |
| HBPAK1b | 3A2  | .....                       | .....K JK5 (Seq. ID No. 109)               |
| HBPAK1c | 3A3  | .....DY--S.....             | ..TTT--G...P...VDF JK3 (Seq. ID No. 110)   |
| HBPAK1c | 3A8  | ..L.....                    | ..DK...L...G...KV... JK4 (Seq. ID No. 111) |
| HBPAK1c | 3G6  | ..V.....                    | ..X...V...G...KVDL JK4 (Seq. ID No. 112)   |
| HBPAK1d | 3C11 | ..A.....                    | ..DK...P...N...K JK2 (Seq. ID No. 113)     |
| HBPAK1d | 3F4  | ..A.....                    | ..X...P...N...K JK2 (Seq. ID No. 114)      |
| HBPAK1d | 3F5  | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 115)               |
| HBPAK1d | 3F6  | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 116)               |
| HBPAK1d | 3F7  | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 117)               |
| HBPAK1d | 3F8  | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 118)               |
| HBPAK1d | 3F9  | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 119)               |
| HBPAK1d | 3F10 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 120)               |
| HBPAK1d | 3F11 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 121)               |
| HBPAK1d | 3F12 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 122)               |
| HBPAK1d | 3F13 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 123)               |
| HBPAK1d | 3F14 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 124)               |
| HBPAK1d | 3F15 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 125)               |
| HBPAK1d | 3F16 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 126)               |
| HBPAK1d | 3F17 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 127)               |
| HBPAK1d | 3F18 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 128)               |
| HBPAK1d | 3F19 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 129)               |
| HBPAK1d | 3F20 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 130)               |
| HBPAK1d | 3F21 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 131)               |
| HBPAK1d | 3F22 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 132)               |
| HBPAK1d | 3F23 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 133)               |
| HBPAK1d | 3F24 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 134)               |
| HBPAK1d | 3F25 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 135)               |
| HBPAK1d | 3F26 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 136)               |
| HBPAK1d | 3F27 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 137)               |
| HBPAK1d | 3F28 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 138)               |
| HBPAK1d | 3F29 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 139)               |
| HBPAK1d | 3F30 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 140)               |
| HBPAK1d | 3F31 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 141)               |
| HBPAK1d | 3F32 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 142)               |
| HBPAK1d | 3F33 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 143)               |
| HBPAK1d | 3F34 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 144)               |
| HBPAK1d | 3F35 | .....                       | .....K JK2 (Seq. ID No. 145)               |

Fig 8c

**Raske ahal**

| Fab  | arkass 3 | DH                              | JH                                          |
|------|----------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| HBL1 | 3011     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 146) |
|      | 3012     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 147) |
|      | 309      | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 148) |
|      | 3013     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 149) |
|      | 3014     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 150) |
|      | 3015     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 151) |
|      | 3016     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 152) |
|      | 3017     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 153) |
|      | 3018     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 154) |
|      | 3019     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 155) |
|      | 3020     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 156) |
|      | 3021     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 157) |
|      | 3022     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 158) |
|      | 3023     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 159) |
|      | 3024     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 160) |
|      | 3025     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 161) |
|      | 3026     | RFTISKSSRNTLFLQINSRLVDDTAVTYCAK | GSIFGTAKYVG VDYNGGALTUVSS (Seq. ID No. 162) |

**Fig 8d**

10/14

Kerge ahel

| Fab   | karkass 1                 |             |               | CDR1    | karkass 2                 |             |               | CDR2    |
|-------|---------------------------|-------------|---------------|---------|---------------------------|-------------|---------------|---------|
|       | 3D11                      | 3C12        | 3D9           |         | 3D11                      | 3C12        | 3D9           |         |
| HBL1  | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
|       | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTASIAIC | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDTDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTASIAIC | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDTDRPS |
|       | SRSYELTQPPSVSVAPRTDQITC   | GEKIESKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPRTDQITC   | GEKIESKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL2a | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL2b | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL2c | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL2d | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYELTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNTIGSQSVH | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL3  | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL4a | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL4b | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL4c | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL4d | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL5  | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL6  | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |
| HBL7  | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS | SRSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC  | GGNIGSKSVH  | WYQKPGQAPLVVY | DDSDRPS |

CDR3

karkass 3

3L

Fab

|       |      |                                 |               |              |                   |
|-------|------|---------------------------------|---------------|--------------|-------------------|
| HBL1  | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSDH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 163) |
|       | 3C12 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDASSDQPY-- | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 164) |
|       | 3D9  | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 165) |
| HBL2a | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 166) |
| HBL2b | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 167) |
| HBL2c | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 168) |
| HBL2d | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 169) |
| HBL3  | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 170) |
| HBL4a | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 171) |
| HBL4b | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 172) |
| HBL4c | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 173) |
| HBL4d | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 174) |
| HBL5  | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 175) |
| HBL6  | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 176) |
| HBL7  | 3D11 | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 177) |
|       | 3C5  | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYIC | QVWDSSSH---   | VVFGGTRLTIVL | (Seq. ID No. 178) |

HBL2d 3C4 omas "lga" stopp-koodonit CDR1-s, mis on tähistatud "J"-ga.

Fig 8e

## Hiire IgG kappa kloonid IgE-Fc-le

## Raske ahel

| Fab              | karkass 1               | CDR1  | karkass 2      | CDR2               |
|------------------|-------------------------|-------|----------------|--------------------|
| m2G1R2A8         | QSGAELMKPGASVKISCAIDYTF | NYWIE | WVKQRPQGHLEWIG | EILPGSGSTNFKFKG    |
| m2G1R2B9         | .....I.....RT.....      | ..... | .....R.....    | .....T.....R       |
| m2G1R2B11, C5    | .....V.....S.....       | ..... | .....I.....    | .....D.....R       |
| m2G1R2C2, F9, c3 | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....V.....  |
| m2G1R2C8         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....V.....  |
| m2G1R2F12        | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....        |
| m2G1R2G1, C11    | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....T.....R       |
| m2G1R2H8         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....        |
| m2G1R2F7         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....V.....  |
| m2G1R2D10        | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....        |
| m2G1R2F10        | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....        |
| m2G1R2H3         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....DA.....       |
| m2G1R2H7         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....VS..... |
| m2G1R2a9         | .....V.....S.....       | ..... | .....          | .....D.....        |

| Fab              | karkass 3                | CDR3    | FR4            |
|------------------|--------------------------|---------|----------------|
| m2G1R2A8         | KATFTADTSSNTAYNQLSLTSEDS | AVYTCAR | AYFTFS         |
| m2G1R2B9         | .....                    | .....   | LDYWGQGTTLTVSS |
| m2G1R2B11, C5    | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2C2, F9, c3 | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2C8         | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2F12        | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2G1, C11    | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2H8         | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2F7         | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2D10        | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2F10        | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2H3         | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2H3         | .....                    | .....   | .....          |
| m2G1R2a9         | .....                    | .....   | .....          |

Fig. 9a

12/14

## Hiire IgG lambda kloonid IgE-Fc-le

## Raske ahel

| Fab        | karkass 1                 | CDR1         | karkass 2      | CDR2                 |
|------------|---------------------------|--------------|----------------|----------------------|
| m3G1R3A11  | GAELMKPGASVKISKATGYFN     | TYWIE        | WVKQRPBGHLEWIG | EILPGTDNTNNYNEKFKG   |
| m3G1R3A12  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3D12  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3G8   | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3E9   | .....                     | .....        | .....R.....    | .....                |
| m3G1R3B10  | GAELMKPGASVKISKATGYFTLS   | SYWIE        | WVKQRPBGHLEWIG | EILPGSDNTNNYNEKFKG   |
| m3G1R3B11  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3F11  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3F12  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3F9   | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3E7   | LVDPGGLVQPGSLRLSCETSGFTFT | DYLS         | WVRQPPGKALEWLG | FIRNKANGYTTTEYSASVKG |
| m3G1R3E10  | .....                     | .....MT..... | .....          | .....                |
| m3G1R3F8   | .....                     | .....LS..... | .....          | .....                |
| m3G1R3G9   | .....                     | .....LS..... | .....          | .....                |
| m3G1R3B7   | GAELMKPGASVKISKATGYFTLS   | SYWIE        | WVKQRPBGHLEWIG | EILPGSDNTNNYNEKFKG   |
| m3G1R3C7   | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G1R3G12  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G2aR3C8  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G2aR3C7  | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G2aR3B10 | GGGLVQPGNSLRLSCATSGFTFT   | DYLS         | WVRQPPGKALEWLG | FIRNKANGYTTTEYSASVKG |
| m3G2aR3E10 | .....                     | .....        | .....          | .....                |
| m3G2aR3D8  | .....                     | .....S.....  | .....          | .....A.....          |
| m3G2aR3D4  | GAELMKPGASVKISKATGYFTLS   | SYWIE        | WVKQRPBGHLEWIG | EILPGSDNTNNYNEKFKG   |
| m3G2aR3B4  | .....                     | .....        | .....          | .....                |

Fig. 9b

13/14

| Fab        | karkass 3                         | CDR3                 | FR4                              |
|------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| m3G1R3A11  | KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  | QVGLRWF              | FDYWGQGTLLTVSS (Seq. ID No. 247) |
| m3G1R3A12  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 248)                |
| m3G1R3D12  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 249)                |
| m3G1R3G8   | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 250)                |
| m3G1R3E9   | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 251)                |
| m3G1R3B10  | KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  | QVGLRWF              | FDYWGQGTLLTVSS (Seq. ID No. 252) |
| m3G1R3E11  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 253)                |
| m3G1R3F11  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 254)                |
| m3G1R3E2   | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 255)                |
| m3G1R3E7   | RFTISRDDSSQILYLQMNLTIRAEDSATYYCLR | NGRPYYALDYWGQTSVSVSS | (Seq. ID No. 256)                |
| m3G1R3E10  | .....S                            | .....                | (Seq. ID No. 257)                |
| m3G1R3F8   | .....S                            | .....                | (Seq. ID No. 258)                |
| m3G1R3G9   | .....L                            | .....                | (Seq. ID No. 259)                |
| m3G1R3B7   | KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  | QVGLRWF              | FDYWGQGTLLTVSS (Seq. ID No. 260) |
| m3G1R3C7   | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 261)                |
| m3G1R3C12  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 262)                |
| m3G2aR3C2  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 263)                |
| m3G2aR3D7  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 264)                |
| m3G2aR3B10 | RFTISRDDSSQILYLQMNLTIRAEDSATYYCAR | HGRPYYALDYWGQTSVTVSS | (Seq. ID No. 265)                |
| m3G2aR3E10 | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 266)                |
| m3G2aR3D8  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 267)                |
| m3G2aR3D4  | KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  | QVGLRWF              | FDYWGQGTLLTVSS (Seq. ID No. 268) |
| m3G2aR3B4  | .....                             | .....                | (Seq. ID No. 269)                |

Fig. 9c

Kappa kerge ahel

| Fab        | karkass 1                           |                  | karkass 2 |  |
|------------|-------------------------------------|------------------|-----------|--|
|            | CDR1                                | CDR2             |           |  |
| m3G1R3B10  | SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMH | WYQKSSSTSPKLMYIY | DTSKLAS   |  |
| m3G1R3H9   | .....                               | .....            | .....     |  |
| m3G1R3D7   | SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMH | WYQKSSSTSPKLMYIY | DTSKLAS   |  |
| m3G1R3D12  | .....                               | .....            | .....     |  |
| m3G1R3E9   | SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMH | WYQKSSSTSPKLMYIY | DTSKLAS   |  |
| m3G1R3D7   | .....                               | .....            | .....     |  |
| m3G2aR3D8  | SRQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMH | WYQKSSSTSPKLMYIY | DTSKLAS   |  |
| m3G2aR3D10 | .....                               | .....            | .....     |  |

| Fab        | karkass 3                    |        | FR4            |                   |
|------------|------------------------------|--------|----------------|-------------------|
|            | CDR3                         | LT     | Seq.           | ID No.            |
| m3G1R3B10  | GVPGRFSGSGNSYSLTISSMEDVATYIC | FQSGYP | LT FGAGTKLELKR | (Seq. ID No. 270) |
| m3G1R3H9   | .....                        | .....  | .....          | (Seq. ID No. 271) |
| m3G1R3D7   | GVPGRFSGSGNSYSLTISSMEDVATYIC | FQSGYP | LT FGAGTKLELKR | (Seq. ID No. 272) |
| m3G1R3D12  | .....                        | .....  | .....          | (Seq. ID No. 273) |
| m3G1R3E9   | GVPGRFSGSGNSYSLTISSMEDVATYIC | FQSGYP | LT FGAGTKLELKR | (Seq. ID No. 274) |
| m3G1R3D7   | .....                        | .....  | .....          | (Seq. ID No. 275) |
| m3G2aR3D8  | GVPGRFSGSGNSYSLTISSMEDVATYIC | FQSGYP | LT FGAGTKLELKR | (Seq. ID No. 276) |
| m3G2aR3D10 | .....                        | .....  | .....          | (Seq. ID No. 277) |

Fig. 9d