

## Hübriidatsioonitehnikad ja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Kahe erineva päritoluga komplementaarse nukleiinhappe üksikahela kokkusegamisel toimub nende vaheline hübriidatsioon, mille käigus nende nukleiinhapete ahelad paarduvad moodustades hübriidse kaksikahela.

**Hübriidatsioonitehnika** on meetod uuritava nukleiinhappe molekuli eristamiseks heterogeenses nukleiinhappe molekulide populatsioonis proovi ja sihtmärgi (target'i) komplementaarsuse alusel.

**Proov** (teadaolev järjestus) koosneb tüüpiliselt identifitseeritud nukleiinhappe molekulide **homogeensest populatsioonist** (kloonitud DNA või keemiliselt sünteesitud oligonukleotiidid) ja **sihtmärgi** (otsitavad järjestused) moodustab nukleiinhapete segust koosnev **heterogeenne populatsioon**.

**Hübriidiseerimise eesmärgiks on proovi teadaolevaid järjestusi kasutades tuvastada homoloogilisi järjestusi sihtmärk DNA-s.**

Kui proov või sihtmärk on kaheahelalised, siis kõigepealt nad denatureeritakse, kas kuumutamisel või töötlemisel aluselises keskkonnas, seejärel segatakse proovi ja sihtmärgi üksikahelad kokku ja lastakse komplementaarsetel aluspaaridel reassoitsieeruda. Seejuures võivad moodustuda nii **homodupleksid** proovi ja sihtmärgi DNA ahelate vahel kui ka **heterodupleksid** proovi ja sihtmärgi DNA ahelate vahel.

### JOONIS 1

**Tekkivate hübriidide stabiilsust mõjutavad järgmised faktorid:**

- Sulamistemperatuur.** Kaksikahelalise DNA kuumutamisel katkevad DNA komplementaarseid ahelaid kooshoidvad vesiniksidemed. Kahe täiesti komplementaarse DNA ahela lahutamiseks vajalik energiahulk sõltub tervest hulgast faktoritest:
- DNA ahela pikkus:** mida pikem on homodupleks seda rohkem vesiniksidemeid see sisaldab ja seetõttu on vaja rohkem energiat nende lahutamiseks. Kui proovi pikkus on juba üle 500bp, siis DNA ahela pikkus enam rolli mängi.
- Nukleotiidne koostis:** GC paaride vahel on kolm vesiniksidet ja AT paaride vahel kaks vesiniksidet, seetõttu on suurema GC paaride osakaaluga DNA-d stabiilsemad võrreldes sellistega kus AT paaride % on kõrgem.
- Ioonne jõud:**  $T_m$  tõuseb  $16.6^{\circ}\text{C}$  võrra kui monovalentsete katioonide (näit.  $\text{Na}^+$ ) kontsentratsioon tõuseb 1 kord soola-

kontsentratsioonide vahemikus 0.01 kuni 0.40M NaCl.

- Destabiliseerivad ained:** Iga 1% formamiidi lisamine vähendab DNA-DNA hübriidi  $T_m$ -i umbes  $0.6^{\circ}\text{C}$  võrra. 6M urea vähendab  $T_m$ -i ca  $30^{\circ}\text{C}$  võrra.

Nukleiinhapete dupleksi stabiilsust hinnatakse **sulamistemperatuuri  $T_m$**  kaudu.

### JOONIS

See on keskpunkt mille juures kaheahelaline DNA läheb üle üheaahelaliseks.  $T_m$ -i mõõdetakse DNA optilise tiheduse kaudu. Nukleiinhappe lämmastikalused absorbeerivad tugevalt ultravioletvalgust 260nm juures, kusjuures kaheahelaline DNA absorbeerib vähem kui vabad nukleotiidid. Seda erinevust nimetatakse **hüpokroomseks efektiks** ja see tekib DNA ahelas olevate aluste elektronsüsteemide omavaheliste interaktsioonide tõttu. Kui kaheahelalist DNA-d tasapisi kuumutada, siis UV valguse absorptsioon 260nm juures tõuseb vabadele lämmastikalustele iseloomulike väärtuste suunas. Temperatuur, mille juures asub optilise tiheduse nihke keskpunkt ongi  $T_m$ .

Imetaja genoomide puhul, mis sisaldavad keskmiselt 40% GC paare on DNA sulamistemperatuuriks füsioloogilistel tingimustel ca  $87^{\circ}\text{C}$ .

DNA, RNA ja oligonukleotiidide perfektsete hübriidide  $T_m$ -e saab välja arvutada vastava valemi alusel:

#### **DNA-DNA hübriidi jaoks**

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{form}) - 500/L$$

#### ja **RNA-DNA hübriidi jaoks**

$$T_m = 79.8^{\circ}\text{C} + 18.5 (\log M) + 0.58 (\%GC) - 11.8 (\%GC)^2 - 0.56 (\% \text{form}) - 820/L$$

Nendes valemities:

- M** on monovalentsete katioonide molaarsus
- %GC** on guanosiini ja tsütosiini protsent DNA-s
- %form** on formamiidi protsent hübriidatsiooni lahuses
- L** on dupleksi pikkus aluspaarides

Nukleiinhapete hübriidatsiooni stabiilsus sõltub hübriidiseeruvate molekulide liigist – stabiilsus väheneb reas:

**RNA:RNA, RNA:DNA, DNA:DNA.**

Selleks, et iseloomustada kiirust, mille jooksul DNA üksikahelad leiavad komplementaarse

paarilise ja moodustavad dupleksi kasutatakse **reassotsiatsiooni kineetikat**. See on määratud spetsiifilise DNA järjestuse alg või stardikontsentratsiooni poolt ( $C_0$ ) nukleotiidi moolides liitri kohta ja reaktsiooni ajaga sekundites ( $t$ ). Kuna reassotsiatsioon on proportsionaalne ( $C_0$ ) ja ( $t$ ) –ga siis on see väärtus ( $C_0t$ ) nimetatakse ka  $Cot$  väärtuseks. Standardtingimused on temperatuuril 65°C ja  $Na^+$  ionide kontsentratsioonil 300mM NaCl.

Proovi ja targeti vaheline heterodupleks on termodünaamiliselt kõige stabiilsem täieliku

paardumise (perfect match) korral. Kui on tegemist mittekorrektse paardumisega (mismatch) kahe ahela vahel, siis need vähendavad  $T_m$ -i. Keskmiselt vähendab 1% mismatch'ed (valepaardumisi) dupleksi  $T_m$ -i umbes 1°C võrra.

### Erinevad võimalused nukleiinhapete hübridisatsiooniks

Nukleiinhapete hübridisatsiooniks on palju võimalusi.

## Standard ja pööratud hübridisatsioonid

Standard	Märgitud proov lahuses	Märkimata sihtmärk tahkel kandjal
<b>Dot-blot</b>	Iga märgitud DNA või RNA sageli oligonukleotiid	DNA või RNA fraktsioneerimata kompleks, spotitud otse membraanile
<b>Southern blot</b>	Igasugune proov	Kompleksne genoomne DNA (või individuaalsed DNA kloonid) restrikteeritud ja foreesil fraktsioneeritud, kantuna membraanile
<b>Northern blot</b>	Igasugune proov	Kompleksne RNA populatsioon (näit. totaalne rakuline RNA või polüA <sup>+</sup> RNA) foreesil fraktsioneeritud kantuna membraanile
<b>Kromosoomide <i>In situ</i> hübridisatsioon</b>	Tavaliselt märgitud genoomne kloon	DNA (sageli metafaasi) kromosoomides lüüsitud rakkudes mikroskoobi klaasil
<b>Kudede <i>In situ</i> hübridisatsioon</b>	Tavaliselt märgitud antisense riboproov või oligonukleotiid	RNA rakkudes fikseeritud koelõikudest mikroskoobi klaasil
<b>Koloonia blot</b>	Igasugune proov	Rakukolooniad, mis on kasvatatud agarsöötmele ja kantud membraanile
<b>Faagi blot</b>	Igasugune proov	Faagiga infitseeritud bakterikolooniad eraldatud peale agarsöötmele kasvatamist ja kantud membraanile
<b>Kloonide hübridisatsiooni array</b>	Igasugune proov	Robotiga membraanile arrayformaadis spotitud kloonid
Pööratud	Märgitud sihtmärk lahuses	Märkimata proov tahkel kandjal
<b>Pööratud dot-blot</b>	Kompleks DNA	Membraanile spotitud oligonukleotiidid
<b>DNA mikroarray</b>	Kompleks DNA	Robotiga mikroskoobi klaasile spotitud DNA kloonid
<b>Oligonukleotiid mikroarray</b>	Kompleks DNA	Klaasile spotitud või <i>in situ</i> sünteesitud oligonukleotiidid

Ajalooliselt tehti hübriidatsiooni eksperimente kõigepealt vesilahuses, kuid seal on genoomis väiksema koopiaarvuga geenide, eriti üksikut koopiat omavate geenide, järjestuste kontsentratsioon väga madal ja seetõttu võttis taoline reassotsatsioon väga kaua aega. Näiteks  $\beta$ -globiin, mis on genoomis esindatud ühe koopiaga, moodustab vaid 0,00005% inimese genoomsest DNA-st

Käesoleval ajal kasutatakse enamasti tahkele kandjale seotud nukleiinhappeid. Kandjamaterjaliks on tavaliselt nitrotselluloos või nailon.

Viimasel ajal on järjest enam populaarsust võitnud nn. **pööratud hübriidatsioonid**, mille puhul kandjale kinnitatakse märkimata proov ja hübriidiseeritakse lahuses oleva märgitud target DNA või RNA-ga.

**NB! Seega proov ei pea alati olema märgitud, pööratud hübriidatsiooni korral märgitakse target.**

#### **Dot-blot hübriidatsioon**

Siia kuulub ka slot-blot hübriidatsioon.

Võib kasutada alleelspetsiifilisi oligonukleotiidide, et eristada alleele ühe nukleotiidi positsiooni kaupa.

#### **JOONIS**

ASO (alleel-spetsiifilised oligonukleotiid) proovid on tavaliselt 15-20 nukleotiidi pikad ja neid kasutatakse sellistel tingimustel, et dupleks proovi ja targeti vahel oleks stabiilne vaid siis kui on tegemist täiesti perfektse komplementaarsusega nende vahel. ASO proovi puhul on muutuv (otsitav) nukleotiidi proovi keskel.

#### **Southern blot**

Restrikteeritud (genoomne) DNA lahutatakse geelelektrofooresil fragmentide pikkuse järgi, denatureeritakse, kantakse filtrile ning immobiliseeritakse seal. Filtrit hübriidiseeritakse uuritava geeni suhtes spetsiifilise märgitud prooviga.

#### **JOONIS**

Southern blot'i on võimalik kasutada näiteks mutatsioonanalüüsiks. Kui tekib patogeenne mutatsioon, siis selle tulemusel sageli kas kaob või tekib restriksioonisait. Näiteks sirprakulise aneemia korral põhjustab ühe nukleotiidi asendus ( $A \rightarrow T$ )  $\beta$ -globiini geeni kuuendas koodonis missense mutatsiooni ( $Glu \rightarrow Val$ ), mille tagajärjel kaob koodoneid 5 kuni 7 haarav *MstII* restriksioonisait. Lähim *MstII* sait asub 1.2 kb upstream 5' piirnevas regioonis ja 0.2 kb downstream esimese introni 3' lõpus. Mõlemad restriksiooni saidid on hästi konserveerunud. Seega, kui meil on inimese  $\beta$ -globiini DNA proov, siis on selle abil võimalik eristada normaalse  $\beta^A$ -globiini ja mutantse  $\beta^S$ -globiini alleele. Lõigates inimese

genoomset DNA-d *MstII*-ga saame normaalsel juhul 1.2 kb ja 0.2kb fragmendid samal ajal kui sirprakuline alleel annab meile ühe 1.4 kb fragmendi.

Lisaks mutatsioonanalüüsile saab Southern blot'i kasutada geenide struktuuri ja organsatsiooni uurimisel (näit. geeni koopiaarvu määramine), kloonimisel, geneetiliste kaartide koostamisel jne.

#### **Northern blot**

**Erinevalt eelpool kirjeldatud Southern blot'ist kasutatakse Northern blot'i puhul RNA-d.** Põhiliselt kasutatakse Northern bloti geenide eksperssiooni analüüsil.

#### **Western blot**

Tegelikult ei kuulu western blot nukleiinhapete hübriidatsiooni meetodite alla, kuid nimekirja täielikkuse huvides olgu ta siin ära toodud. Western bloti abil uuritakse valke, mis lahutatakse elektroforeetiliselt, kantakse filtrile ja tuvastatakse vastavate märgitud antikehade abil.

#### **Kromosoomide *in situ* hübriidatsioon**

Geenide ja teiste DNA fragmentide kaardistamiseks hübriidiseeritakse märgitud DNA proov *in situ* denatureeritud kromosomaalse DNA-ga. Valmistatakse kromosoomide metafaasi või prometafaasi preparaat, töödeldakse RNAasi ja proteinaasK-ga, mille tulemusel saab osaliselt puhastatud kromosomaalse DNA, mis denatureeritakse formamiidiga. Erinevate fluorestseeruvate märke kasutuselevõtuga on see tehnoloogia muutunud väga laialt kasutatavaks fluorestsents *in situ* hübriidatsioon ehk **FISH**.

#### **Koe *in situ* hübriidatsioon**

mRNA ekspressiooni uurimiseks kudedes. Märgitud prooviga hübriidiseeritakse koelõikude RNAd, mis on tehtud kas parafiin plokkidest või külmutatud kudedest. Eelistatult kasutatakse üheaheelalist komplementaarset RNA proovi e. riboproovi kuna üheaheelalise proovi tundlikkus on suurem, sest ei teki probleeme homodupleksitega. Riboproovid, mis on komplementaarsed mRNA-le on tuntud kui antisense riboproovid. Kasutatakse nii radioaktiivseid märegeid kui ka fluorestsentsi, mida saab siis vastavalt jälgida fluorestsentsmikroskoobi abil.

#### **Koloonia hübriidatsioonid**

Vt. Kloonimise loeng

#### **Pööratud hübriidatsioonid**

Kasutatakse robotiga (microarrayer) tehtud filtreid ja DNA mikroarray'sid (DNA kiipe), mille puhul märkimata proov kantakse tahkele

kandjale ja hübridiseeritakse lahuses oleva märgitud target DNA-ga.  
Vaata DNA chipi loeng.

## Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Polümeraasi ahelreaktsioon on tänapäeva molekulaarbioloogide üks põhilisi meetodeid, leides rakendamist mitte ainult fundamentaal-uuringute juures vaid ka kliinilises- ja näiteks kohtupraktikas.

**Kary Mullis** sai PCR-i meetodi eest **1993.** aastal **Nobeli** keemia preemia.

Enne kui asuda PCR-i tegema on meil vaja teada vastavaid DNA järjestusi, mille alusel disainida praimerid, mis on tavaliselt 15-25 meersed sünteetiliselt oligonukleotiidid.

PCR ise koosneb kolmest etapist:

### JOONIS

1. Denaturatsioon. inimese genoomse DNA puhul tüüpiliselt 93-95°C
2. Annealing e. praimerite seostumine DNA-le toimub tavaliselt temperatuuril 50-70°C sõltuvalt praimerite  $T_m$ -ist. Tavaliselt võetakse see ca 5°C alla arvutatud  $T_m$ -i.
3. DNA süntees. Tavaliselt 70-75°C juures.

### Mida arvestada praimerite disainimisel?

1. Selleks, et saaks kasutada mõistlikke kinnitumistemperatuure (annealing temp.) tuleks praimerid teha 20–30 aluse pikkused ja sulamistemperatuuriga ( $T_m$ ) 50–70°C. Kui võimalik võiks paaris kasutatavad praimerid olla sarnase  $T_m$ -iga. Sulamistemperatuuride arvutamise kohta leiab arvukalt informatsiooni kirjandusest.
2. Praimerite GC sisaldus peaks olema 50–55%. 50%-st palju väiksema GC sisaldusega primereid tuleks pikendada üle 20 aluse, et saavutada vajalik sulamistemperatuur üle 50°C.
3. Vältida tuleks üksikute (või kahe) nukleotiidi kordusi, eriti praimeris 3'otsas. Viimane võib põhjustada sekundaarseid hübridisatsioone.
4. Kui võimalik, siis võiks praimeris 3'otsa stabiliseerimiseks asuda seal G või C nukleotiid.

Disainimisel tuleks vältida sekundaarstruktuure ning di- ja oligomeere moodustavaid primereid. Selleks on hea kasutada praimerite disainimise arvutiprogramme.

### Erinevad PCR-i võimalused:

**Nested PCR:** esimese amplifikatsiooni produkti kasutatakse teise amplifikatsiooni template'na, kasutades uut komplekti primereid, mis asuvad seespool esimesi.

**Hot-start PCR:** Lisatakse ensüüm ja puhver eraldi ja hoitakse neid lahus kuni reaktsiooni

alguseni. Selleks kasutatakse näit. vaha, mille peale pipeteeritakse ensüüm või spetsiifilise antikehaga *Taq* polümeraasi. Ensüüm satub reaktsioonisegusse alles kuumutamisel, mille käigus vaha sulab või ensüüm vabaneb antikehast.

**Touch-down PCR:** Reaktsiooni spetsiifilisuse tõstmiseks tehakse esimesed tsüklid kõrgemal temperatuuril ja siis alandatakse annealing temperatuuri.

### PCR-i eelised ja puudused

1. Kiire ja lihtne kasutada. Tavaliselt kulub fragmendi amplifitseerimiseks 2-3 tundi.
2. Väga tundlik meetod. Võimaldab näiteks kasutada vaid ühes raku sisalduvat DNA-d. Kuid väga suure tundlikkuse tõttu on alati oht amplifitseerida üles ebasoovitavaid järjestusi ja seetõttu tuleb väga suurt tähelepanu pöörata võimalike saastusallikate vältimisele.
3. Robustne meetod. PCR-i saab teha kasutades algmaterjalina väga erinevaid asju ja aineid.

### Puudused

1. PCR-i põhiliseks puuduseks on vajadus teada eelnevalt DNA järjestust mille alusel saab disainida PCR-i primereid.
2. PCR-i fragmendid jäävad suhteliselt lühikeseks, pikki fragmente on väga raske saada.
3. DNA replikatsiooni käigus tekivad vead, sest tavaline DNA polümeraase ei sisalda "proof-reading" mehhanismi.

PCR-il kasutatava DNA polümeraasipuhul on olulised:

1. Termostabiilsus
2. Ekstensioonireaktsiooni kiirus (ühes sekundis ühe molekuli ensüümi poolt polümeriseeritud dNTP-de arv)
3. Protsessiivsus (vt. ensüümide loeng)
4. Reaktsiooni täpsus (fidelity) mis näitab valesi lülitatud dNTP-de arvu täpselt lülitatud nukleotiidide suhtes.

### PCR-i kasutusvõimalused

#### Mutatsioonanalüüs: Alleel-spetsiifiline PCR ARMS (Amplification refractory mutation test).

Praimerid disainitakse niimoodi, et oleks võimalik eristada allelele. Kui ASO proovide puhul asub mismatch nukleotiid järjestuse keskel, siis PCR-i puhul asub see 3'otsas, kuna polümeraasi töö on otseselt sõltuv täpselt paardumisest 3'otsas.

### JOONIS

### Geeni süntees PCR-iga

Geeni süntees PCR-iga on kiirem ja odavam kui osaliselt kattuvate oligonukleotiidide vahede täitmine DNA polümeraasiga ja katkestuste sulgemine T4 DNA ligaasiga.

Kasutatakse osaliselt kattuvaid oligonukleotiidide A ja B, mis täidetakse kasutades 3'OH rühmasid PCR-i DNA sünteesi faasis. Lisatakse uus paar oligonukleotiidide (C ja D), mis kattuvad osaliselt esimese PCR-i produkti lõppudega ja tehakse teine PCR. Peale teist PCR-i võetakse uus praimerpaar (E ja F), mis on kattuvad osaliselt eelmise produkti otstega ja tehakse järgmine tsükkel. Jne. Nii tehakse kuni geen on valmis.

### JOONIS

#### PCR-i kasutamine DNA sekveneerimisel

##### Ehk tsükliline sekveneerimine

Sekveneerimiseks võib kasutada loomulikult PCR-iga üles amplifitseeritud DNA fragmente, kuigi kaheaheelalise DNA sekveneerimisel saadav tulemus pole alati kõige parem. Sellest probleemist ülesaamiseks kasutatakse nn. tsüklilist sekveneerimist. (Nimetatakse ka lineaarseks amplifikatsiooniks). Nagu tavalise PCR-i reaktsiooni puhul kasutatakse ensüümina termostabiilset DNA polümeraasi ja temperatuuri tsükleid: denaturatsioon, annealing ja DNA süntees. Kuid erinevalt tavalisest PCR-ist **kasutatakse vaid üht praimerit** ja lülitatakse ahelasse ddNTP terminaatoreid. Erinevalt produkti eksponentsiaalsest kogunemisest, tekib produkt lineaarselt. Nii saab sekveneerida kaheaheelalisi plasmide, cosmiide,  $\lambda$ -DNA-d ja PCR-i produkte ilma, et oleks vaja eraldada DNA ahelaid denatureerimisel.

#### PCR-i kasutamist mutageneesil

Vt.mutageneesi loeng

#### Reaalaja kvantitatiivne PCR (Real-time PCR)

Paljude PCR-i rakenduste puhul on vaja teada algmaterjali kogust. Selleks on üritatud kasutada erinevaid meetodeid, näit. amplifitseerides koos meid huvitava produktiga mingit meile teada oleva kogusega markerjärjestust, kuid rahuldavat tulemust on raske saavutada.

Reaalaja kvantitatiivse PCR-i puhul kasutatakse lisaks tavalistele DNA sense ja antisense ahela spetsiifilistele PCR-i praimeritele veel kolmandat praimerit (proovi), mis seondub spetsiifiliselt amplifitseeritavale DNA-le. Selle praimeriga ühes otsas on fluorestsentsmärgis ja teises nn. "summutaja" (quencher). Kui see praimer on terve siis kustutatakse tekkiv fluorestsents signaal

"summutaja" poolt, mis asub füüsiliselt fluorestsentsmärgise lähedal. PCR-i reaktsiooni korral lagundatakse see praimer *Taq* DNA polümeraasi 5'-3' eksonukleaaesse aktiivsuse poolt tükkideks, fluorestsents märgis vabaneb ja annab ergastamisel fluorestsents signaali. Fluorestsents signaali kasv reaktsiooni segus on proportsionaalne tekkiva amplifikatsiooni produkti hulgaga.

Reaalaja kvantitatiivse PCR-i tegemiseks on spetsiaalne aparaat, mis võimaldab vahetult mõõta amplifitseerimise jooksul tekkiva fluorestsents signaali hulka. Tegelikult ei mõõdata tavaliselt tekkiva produkti hulka vaid tsüklite arvu, mille järel tekib esimest korda signaal. (Mida suurem on target geeni koopia arv, seda varem tekib signaal). Konstrueerides standardkõvera saab selle abil vastavate praimerite olemasolu korral mõõta suvalise target järjestuse hulka amplifitseeritavas materjalis.

#### TaqMan süsteem

Kasutatakse nii mutatsioonanalüüsil kui ka genotüpiseerimisel. Põhineb samuti *Taq* DNA polümeraasi 5'-3' eksonukleaaassel aktiivsusel

## PCR kasutamise võimalusi

<b>Genotüpiseerimine</b>	RFLP-d; STR-id
<b>Mutatsioonide uurimine</b>	Genoomsete mutatsioonide uurimine ja RT-PCR
<b>Punktmutatsioonide detekteerimine</b>	Mutatsioonid, mis muudavad restriktiooni saiti. Teised mutatsioonid alleel-spetsiifilise amplifikatsiooniga (ARMS)
<b>cDNA kloneerimine</b>	Aminohappelisest järjestusest DOP-PCRiga; cDNA lõppude kloneerimisest RACE abil; vähesest materjalist cDNA raamatukogude tegemine
<b>Genoomse DNA kloneerimine</b>	DNA perekonna uute liigete kloneerimine DOP-PCRiga; ühe-raku PCR ja kogu genoomi amplifikatsioon, subgenoomne amplifikatsioon DOP-PCRi või linker praimereitud PCRiga
<b>Genoomi walking</b>	Pööratud (inverse) PCR; bubble linker (vektorett) PCR, Alu-PCR
<b>DNA sekveneerimine</b>	Kaheahelalise DNA sekveneerimiseks (otse) või kloneerimiseks, millele järgneb sekveneerimine; tsükliline sekveneerimine
<b><i>In vitro</i> mutagenees</b>	Kasutades 5' add-on mutageneesi rekombinantse PCRi produkti genereerimiseks; kasutades mismatch praimereid muutmaks kindlaksmääratud nukleotiidi
<b>Geeniexpressiooni uuringud</b>	RT-PCR; differential display r