

ÖZET

GELİŞMİŞ NÜKLEİK ASİT DİZİLEME YÖNTEMLERİ

Burada, RNA moleküllerinin dizilenmesi yöntemlerini geliştirmek üzere transpozisyonu kullanmanın bir yöntemi sağlanır. Burada, DNA:RNA dubleksleri veya DNA:DNA dubleksleri gibi nükleik asit dublekslerinin etiketlenmesi yöntemi sağlanır. Yöntem, bir transposaz ve bir transpozon bileşiminin sağlanması, bir destek üzerinde immobilize bileşim nükleik asit dubleksinin sağlanması ve koşullar altında bir veya daha fazla nükleik asit dubleksi ile bir transposaz ve transpozon bileşiminin temas ettirilmesi adımlarını içerir, burada bir veya daha fazla nükleik asit dubleksi ve transpozon bileşimi, bir veya daha fazla etiketli nükleik asit dubleksini üretmek üzere bir transpozisyon reaksiyonu geçirir, burada transpozon bileşim, aktarılmış bir ipliği ve aktarılmamış bir ipliği içeren çift iplikli bir nükleik asit molekülünü içerir.

15

İSTEMLER

1. Bir veya daha fazla hedef nükleik asitleri saptamaya yönelik bir yöntemdir, aşağıdaki adımları içerir:
 - 5 (a) bir destek üzerinde bir veya daha fazla hedef nükleik asidin yakalanması;
 - (b) destek üzerinde immobilize bir veya daha fazla nükleik asit dubleksleri üretmek üzere bir şablon olarak bir veya daha fazla yakalanan hedef nükleik asitlerin kullanılması;
 - 10 (c) koşullar altında bir veya daha fazla nükleik asit dubleksi ile bir transpozazın ve transpozonun temas ettirilmesi, burada bir veya daha fazla nükleik asit dubleksi ve transpozon bileşimi, bir veya daha fazla etiketli nükleik asit dubleksini üretmek üzere transpozisyon reaksiyonu geçirir, burada transpozon bileşim, aktarılmış bir ipliği ve aktarılmamış bir ipliği
 - 15 içeren çift iplikli bir nükleik asit molekülünü içerir;
 - (d) şablon ipliğin 5' ucuna immobilize ipliğin 3' ucunu uzatmak üzere koşullar altında bir nükleik asit modifiye edici enzim ile bir veya daha fazla etiketli nükleik asit dubleksinin temas ettirilmesi;
 - (e) birçok etiketli nükleik asit ipliğini üretmek üzere etiketli nükleik asit
 - 20 ipliklerinin çoğaltılması;
 - (f) birçok nükleik asit ipliğinin saptanması.
2. İstem 1'in bir yöntemidir, burada hedef nükleik asitler, DNA molekülleri veya RNA molekülleridir.

25
3. İstem 1'in bir yöntemidir, burada hedef nükleik asitler, genomik DNA molekülleri veya mRNA molekülleridir.

30
4. Önceki herhangi bir istemin bir yöntemidir, burada bir veya daha fazla hedef nükleik asit, hedef nükleik asidin en az bir kısmına tamamlayıcı

olan, destek üzerinde immobilize bir veya daha fazla yakalama probuna melezleme yoluyla yakalanır.

- 5 5. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birinin bir yöntemidir, burada bir veya daha fazla hedef nükleik asidin her biri, destek üzerinde immobilize bir veya daha fazla yakalama probuna tamamlayıcı bir diziyi içeren bir 3' adaptörünü içerir ve burada yakalama adımı, immobilize yakalama problemlerine 3'-adaptörünü içeren bir veya daha fazla nükleik asidin melezlenmesini içerir.
- 10 6. Önceki istemlerden herhangi birinin bir yöntemidir, burada destek, bir boncuk veya birçok boncuktur.
- 15 7. İstemler 1 ila 5'ten herhangi birinin bir yöntemidir, burada destek düzlemsel bir destektir.
- 20 8. Önceki herhangi bir istemin bir yöntemidir, burada etiketlenen nükleik asit ipliklerinin amplifikasyonu, etiketlenen nükleik asidin en az bir kopyasını üretir.
- 25 9. İstemler 1 ila 7'den herhangi birinin yöntemidir, burada etiketlenen nükleik asit ipliklerinin amplifikasyonu, etiketlenen nükleik asidin birçok kopyasını üretir.
- 30 10. Önceki herhangi bir istemin bir yöntemidir, burada amplifikasyon yöntemi köprü amplifikasyonudur.
11. Önceki herhangi bir istemin bir yöntemidir, burada birçok nükleik asit ipliğinin saptanması, katı destek üzerinde meydana gelir.

12. İstem 11'in bir yöntemidir, burada saptama, nükleik asit ipliğinin en az bir kısmının dizilenmesini içerir.

TARİFNAME

GELİŞMİŞ NÜKLEİK ASİT DİZİLEME YÖNTEMLERİ

ALTYAPI

RNA'yı içeren nükleik asitleri dizilemeye yönelik dizileme teknikleri geliştirilmiştir. Dizileme teknikleri örneğin, sentez yoluyla dizilemeyi içerir. Sentez yoluyla dizileme veya döngü dizileme, örneğin U.S. Patent No. 7,427,673 ; U.S. Patent No. 7,414,116 ; WO 04/018497 ; WO 91/06678 ; WO 07/123744 ; ve U.S. Patent No. 7,057'De açıklandığı üzere örneğin bir parçalanabilir veya fotobeyazlatılabilir boya etiketi içeren nükleotitlerin adım adım eklenmesi yoluyla sağlanabilir. Alternatif olarak pirodizileme teknikleri kullanılabilir. Pirodizileme, belirli nükleotitler yeni doğan iplik içine dahil edildiğinde inorganik pirofosfatın (PPi) salınımını saptar (Ronaghi et al., (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Analytical Biochemistry 242(1), 84-9 ; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." Genome Res. 11(1), 3-11 ; Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." Science 281(5375), 363 ; U.S. Patent No. 6,210,891 ; U.S. Patent No. 6,258,568 ; ve U.S. Patent No. 6,274,320). Pirodizilemede salınan PPi, ATP sülfüridaz yoluyla adenosin trifosfata (ATP) hemen dönüştürülerek saptanabilir ve oluşturulan ATP düzeyi, lusiferaz ile üretilen fotonlar vasıtasıyla saptanır.

Dizileme teknikleri ayrıca, ligasyon teknikleri ile dizilemeyi içerir. Bu tür teknikler, oligonükleotitleri dahil etmek ve bu tür oligonükleotitlerin dahil edilmesini tanımlamak üzere DNA ligazı kullanır ve U.S. Patent No 6,969,488 ; U.S. Patent No. 6,172,218 ; ve U.S. Patent No. 6,306,597'de açıklanır. Diğer dizileme teknikleri örneğin, floresan in situ dizileme (FISSEQ) ve Büyük Ölçekte Paralel İmza Dizilemeyi (MPSS) içerir.

Dizilemeye yönelik DNA numunelerinin hazırlanması oldukça basit olabilir ve

parçaya transpozisyon reaksiyonlarının kullanılmasını içerebilir ve DNA parçalarına adaptör dizilerini ekleyebilir, bu durum numune hazırlama prosesini kolaylaştırır. Bakınız örneğin, bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilen Uluslararası Yayın No. WO 2010/048605. Bunun aksine RNA numunelerini dizilemeye yönelik mevcut protokoller, dizilemeden önce numune içindeki RNA'yı çift iplikli bir cDNA formatına dönüştüren bir numune hazırlama yöntemini kullanır. Dolayısıyla dizilemeye yönelik RNA numunelerinin hazırlanması daha yoğun işgücü gerektirir. Ek olarak mevcut protokoller, ipliğe spesifik bilgileri korumak üzere kabiliyet bakımından optimumdan daha düşüktür. Daha spesifik olarak çoğu yöntem, çift iplikli cDNA'ya dönüştürülmeden önce orijinal tek iplikli RNA molekülünün yönü etrafında iplik bilgilerini koruyamaz. İpliğe spesifik bilgilerin korunması, yeni genlerin açıklanmasına yönelik ve gen ifade düzeylerinin belirlenmesine yönelik önemlidir. Bazı yöntemler, tek iplikli RNA moleküllerinin uçlarına adaptörlerin bağlanması yoluyla ipliğe spesifik bilgileri korumaya çalışır. Adaptörler, RNA moleküllerinden oluşturulan çift iplikli cDNA'nın iki ucuna yönelik ayırt edilebilir bilgiler sağlayan diziye sahip olabilir. Ancak bu yöntem dezavantajlara sahiptir. Örneğin RNA moleküllerinin parçalanması halinde parçalanmadan sonra moleküllerin iç parçaları yönsel (diğer bir deyişle ipliğe spesifik) bilgilerini kaybeder.

WO 2010/048605, 5' ve 3'-etiketli DNA parçalarını oluşturmaya yönelik yöntemleri açıklarken Caruccio, N Methods in Molecular Biology, Vol 733, 1 January 2011, sonraki jenerasyon dizileme platformları ile uyumlu DNA kütüphaneleri oluşturmak üzere Nextera™ Transpozomları kullanan *in-vitro* transpozisyonu açıklar.

KISA AÇIKLAMA

Burada, aşağıdaki adımları içeren bir veya daha fazla nükleik asitleri saptamaya yönelik bir yöntem sağlanır:

- (a) bir destek üzerinde bir veya daha fazla hedef nükleik asidin yakalanması;
- (b) destek üzerinde immobilize bir veya daha fazla nükleik asit dubleksleri üretmek üzere bir şablon olarak bir veya daha fazla yakalanan hedef nükleik asitlerin kullanılması;
- (c) koşullar altında bir veya daha fazla nükleik asit dublexi ile bir transpozazın ve transpozonun temas ettirilmesi, burada bir veya daha fazla nükleik asit dublexi ve transpozon bileşimi, bir veya daha fazla etiketli nükleik asit dubleksini üretmek üzere transpozisyon reaksiyonu geçirir, burada transpozon bileşim, aktarılmış bir ipliği ve aktarılmamış bir ipliği içeren çift iplikli bir nükleik asit molekülünü içerir;
- (d) şablon ipliğin 5' ucuna immobilize ipliğin 3' ucunu uzatmak üzere koşullar altında bir nükleik asit modifiye edici enzim ile bir veya daha fazla etiketli nükleik asit dubleksinin temas ettirilmesi;
- (e) birçok etiketli nükleik asit ipliğini üretmek üzere etiketli nükleik asit ipliklerinin çoğaltılması;
- (f) birçok nükleik asit ipliğinin saptanması.

Bir veya daha fazla düzenlemenin detayları, aşağıdaki ekli şekiller ve açıklamada belirtilir. Diğer özellikler, amaçlar ve avantajlar, açıklama ve şekillerden ve istemlerden anlaşılır olacaktır.

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

Şekil 1, burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren şemadır. PoliA kuyruklu mRNA, bir desteğin yüzeyine bağlanan bir poliT DNA yakalama probu veya primerine melezleme vasıtasıyla bir destek üzerinde yakalanır. PoliT ipliği akabinde, bir DNA:RNA dubleksini içeren çift iplikli bir molekül yapmak üzere bir ters transkriptaz polimerazı ile uzatılır. Akabinde bir transpozom bileşiği (örneğin bir mozaik uçlu (ME) dizi ve yüzey amplifikasyon primerlerine tamamlayıcı diziler ile bağlanan

Tn5 transposaz), bir transpozisyon reaksiyonu geçiren ve RNA ipliğinin 5' ucuna bir DNA adaptör oligosunu bağlayan dubleksi etiketleyen desteğe eklenir. Bir iplik değiştirme polimerazı (örneğin Bst polimerazı) akabinde, transpozom bileşinin aktarılmamış ipliğinin yeri değiştirilerek ve 5' DNA kimerik ucuna RNA ipliği kopyalanarak DNA ipliğinin 3' ucunu uzatmak üzere kullanılabilir. Çift iplikli molekül akabinde güçlendirilebilir (örneğin küme amplifikasyonu) ve bir dizileme primeri ile dizilenebilir. Primer kısmen ME dizisini ve yukarı akım yönlü adaptör dizisini içerir. Alternatif olarak molekülün diğer ucu (poliT uç), poliT dizisinin yukarı akımını tanımlayan bir primer ile dizilenebilir ve sentez ile dizi (SBS) kimyasının döngüleri başlatılmadan önce doğal dATP nükleotitleri ile uzatılır.

Şekil 2, burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren şemadır. RNA parçalanır ve bir fosfat ile muamele edilir. Tek iplikli bir adaptör molekülü, bir yüzeye bağlı primerin tamamlayıcısını içeren her bir RNA parçasının 3' ucuna bağlanır. Parçalar akabinde, bir desteğe eklenir ve melezleme vasıtasıyla yakalanır. Melezlenen RNA molekülleri, bir ters transkriptaz polimerazı ile bir DNA:RNA dubleksine dönüştürülür. P5 ile bir ME'nin bir transposazını ve bir adaptör dubleksini (diğer bir deyişle transpozon) içeren bir transpozom bileşiği veya bileşimi, dubleksi etiketlemek üzere kullanılır. Bir iplik değiştirme polimerazı ile uca DNA ipliğinin uzatılmasından sonra moleküller güçlendirilebilir (örneğin küme amplifikasyonu) ve dizilenebilir.

Şekil 3, burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren şemadır. İki yüzey aşıllı primeri içeren bir destek kullanılır: standart bir aşılama primer (örneğin P5) ve aşağı akım yönlü (3') tarafına hedefe spesifik bir yakalama dizisine sahip modifiyeli bir aşılama primer (örneğin P7). Bir hedefe spesifik dizinin bir örneği, bir retroviral ters transkriptaza (örneğin HIV polimerazı) tamamlayıcı bir oligo dizisidir. Saflaştırılan viral RNA, desteğe eklenir, melezleme vasıtasıyla yakalanır, ters transkriptaz ile

kopyalanır ve etiketlenir. Dizileme, etiketlenen adaptöre tavlanan bir primer ile ve yakalama probunun diğer ucunda sağlanabilir.

Şekil 4, burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren şemadır. RNA transkriptler, yeşil floresan protein (GFP) transkript dizisini ve bir yüzeye bağlanan primere tamamlayıcı bir diziyi (örneğin P7' dizisi) içeren bir plazmitten üretilir. Transkriptler, örneğin bir P7 dizisini içeren primerleri içeren bir desteğe melezlenir. Melezlenen RNA molekülleri, bir ters transkriptaz polimerazı ile bir DNA:RNA dubleksine dönüştürülür. Bir transpozom bileşiği, dubleksi etiketlemek üzere kullanılır. Bir iplik değiştirme polimerazı ile uca DNA ipliğinin uzatılmasından ve RNA ipliğinin çıkarılmasından sonra moleküller güçlendirilebilir (örneğin küme amplifikasyonu) ve dizilenebilir.

Şekil 5, Yeşil Floresan Proteini (GFP) içeren bir plazmitten oluşturulan ve isteğe bağlı olarak DNA'yı (diğer bir deyişle plazmit) çıkarmak üzere DNaz ile muamele edilen RNA transkriptlerini gösteren bir jelin bir resmidir. Hiçbir kalıntı DNA (diğer bir deyişle plazmit), RNA transkriptinin DNaz muamelesinden sonra görünür olmamıştır.

Şekil 6, SYBR yeşil ile boyanan kümelerin resimlerini gösterir. Şeritler 1-4, Phix DNA'yı içermiştir ve Şeritler 5-8, GFP RNA'yı içermiştir. Şeritler 5 ve 6, DNA'yı çıkarmak üzere DNaz ile önceden muamele edilen RNA'yı içermiştir. Şeritler 7 ve 8, DNaz ile önceden muamele edilen ve bir ilave kontrol olarak RNaz ile muamele edilen RNA'yı içermiştir. Birinci uzatma, Kuş Miyeloblastoz Virüs Ters Transkriptazı (AMV-RT) (Şeritler 2, 4, 6 ve 8) veya Phusion DNA polimeraz (Şeritler 1, 3, 5 ve 7) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şeritler 3-8, P5 adaptörü ile etiketlenmiştir. İzotermal küme amplifikasyonu, standart ve SYBR yeşili ile boyanan kümeler olarak gerçekleştirilmiştir.

Şekiller 7A ve 7B, Şekil 6'ya yönelik açıklandığı üzere Şeritler 1-8'in dizilenmesinden hizalanan dizileme verilerinin kapsam planlarının grafiklerini gösterir.

Şekil 8, DNA:RNA dubleks etiketlemeye yönelik burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren bir şemadır. Tek iplikli DNA (ssDNA) parçalanır ve parçalar, terminal deoksinükleotidil transferaz yoluyla polinükleotitler ile etiketlenir. Parçalar akabinde, bir desteğe eklenir ve katı destek üzerinde immobilize tamamlayıcısı ile poliT kuyruğunun melezlenmesi vasıtasıyla yakalanır. Melezlenen ssDNA molekülleri, bir DNA polimerazı ile bir DNA:DNA dubleksine dönüştürülür. Bir P5-seq dizisinin, bir transpozaz ve bir adaptör dubleksini (diğer bir deyişle transpozon) içeren bir transpozom bileşiği veya bileşimi, dubleksi etiketlemek üzere kullanılır. Bir iplik değıştirme polimerazı ile uca DNA ipliğinin uzatılmasından sonra moleküller güçlendirilebilir (örneğin küme amplifikasyonu) ve dizilenebilir.

Şekil 9, bir bütün mRNA transkript numunesi kullanılarak veriler oluşturmak üzere tasarlanan bir deneyden SYBR Yeşili ile boyanan kümelerin resimlerini gösterir. Şerit 1, hiçbir etiketlemenin olmadığı bir PhiX standart kütüphanesidir. Şerit 2, hiçbir kuyruklamanın gerçekleştirilmediği bir negatif kontroldür ve Şerit 8, bir dsDNA negatif kontrolüdür. Şeritler 3 ve 4, primerlerin Şerit 4'e yönelik seyreltilmesi dışında aynı deneydir. Şeritler 5 ve 6, primerlerin Şerit 6'e yönelik seyreltilmesi dışında aynı deneydir. Şerit 7, rastgele DNA heksamerlerin yerine rastgele RNA heksamerlerini kullanır.

Şekil 10, Şekil 1'in yönteminden sonra GAPDH'ye yönelik hizalanan dizileme okuma kapsamının bir resmini gösterir. Üst 3' yakalama, bir kontrol poliA kuyruklu mRNA numunesinden yakalama, etiketleme, küme ve dizi hizalamasını gösterir. Taban bütün transkripti, bir bileşik toplam UHR RNA numunesinden güçlendirilen, enzimatik olarak parçalanan ve mevcut tarifnamenin yöntemleri kullanılarak bütün mRNA transkript kapsamını göstermek üzere polidenilatlanan bir mRNA numunesinden mRNA hizalamayı gösterir.

DETAYLI AÇIKLAMA

RNA numunelerini dizilemeye yönelik mevcut protokollerin tümü, dizilemeden önce numune içindeki RNA'yı çift iplikli bir cDNA formatına dönüştüren bir numune hazırlamayı kullanır. Burada, çift iplikli cDNA ara ürününün bir solüsyon fazı hazırlanmasını önleyen RNA numunelerini dizilemeye yönelik yöntemler sağlanır. Sağlanan yöntemler ayrıca, dizileme sırasında ipliklilik bilgilerinin korunması ile sonuçlanır. Ancak burada açıklanan yöntemler ayrıca, DNA'yı etiketlemeye ve dizilemeye yönelik olarak kullanılabilir.

Burada, DNA:RNA dublekslerini etiketlemenin bir yöntemi sağlanır. Yöntem, bir transposaz ve bir transpozon bileşiminin sağlanması, bir destek üzerinde immobilize bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksinin sağlanması ve koşullar altında bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksi ile bir transposaz ve transpozon bileşiminin temas ettirilmesi adımlarını içerir, burada bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksi ve transpozon bileşimi, bir veya daha fazla etiketli DNA:RNA dubleksini üretmek üzere bir transpozisyon reaksiyonu geçirir. Transpozon bileşimi, aktarılmış bir ipliği ve aktarılmamış bir ipliği içeren çift iplikli bir nükleik asit molekülünü içerir. Aşağıdaki örneklerin, DNA:RNA dubleksleri kullanılarak örneklendirilebilmesine rağmen bunlar ayrıca, uygun olduğunda DNA:DNA dublekslerine yönelik olarak uygun olabilir (bakınız Şekil 8).

İsteğe bağlı olarak bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksi, RNA ipliğinin 5' ucu üzerinde etiketlenir. İsteğe bağlı olarak aktarılan iplik, iplik bilgilerini korumak üzere bir etiketi içerir. Transpozisyon reaksiyonu, transpozon bileşiminin aktarılan ipliğini içeren bir 5' etiketli RNA ipliği ve DNA ipliğinin 3' ucu ile transpozon bileşiminin aktarılmayan ipliği arasında bir boşluk ile sonuçlanır. İsteğe bağlı olarak yöntem ayrıca, RNA ipliklerini 5' uçlarına kopyalamak üzere DNA ipliğinin 3' ucunu uzatmak için koşullar altında bir nükleik asit modifiye edici enzim ile bir veya daha fazla etiketli DNA:RNA dublekslerinin temas ettirilmesini içerir. Nükleik asit modifiye edici enzim, transpozon bileşiminin aktarılmayan ipliğinin yerine geçebilir.

Şekil 1, burada sağlanan örnek niteliğindeki bir yöntemi gösteren şemadır. Kısaca poliA kuyruklu mRNA, bir desteğin yüzeyine bağlanan bir poliT DNA yakalama probuna (veya primer) melezleme vasıtasıyla bir destek (örneğin akış hücresi) üzerinde yakalanır. PoliT ipliği akabinde, bir DNA:RNA dubleksini içeren çift iplikli bir molekül yapmak üzere bir ters transkriptaz polimerazı ile uzatılır. Akabinde bir transpozom bileşiği (örneğin bir transpozon (örneğin bir mozaik uçlu (ME)) dizi ve yüzey amplifikasyon primerlerine tamamlayıcı diziler) ile bağlanan Tn5), RNA ipliğinin 5' ucuna bir DNA adaptör oligosunun bağlanması yoluyla dubleksi 'etiketleyen" desteğe eklenir. Bir iplik değiştirme polimerazı (örneğin Bst polimerazı) akabinde, transpozomun 'aktarılmamış ipliğinin' yeri değiştirilerek ve 5' DNA kimerik ucuna RNA ipliği kopyalanarak DNA ipliğinin 3' ucunu uzatmak üzere kullanılabilir. Çift iplikli molekül akabinde güçlendirilebilir (örneğin kümelenmiştir) ve ME dizisini ve yukarı akım yönlü adaptör dizisini kısmen içeren bir dizileme primeri ile dizilenebilir. Alternatif olarak molekülün diğer ucu (poliT uç), poliT dizisinin yukarı akımını tavlaman bir primer ile dizilenebilir ve SBS kimyasının döngüleri başlatılmadan önce doğal dATP nükleotitleri ile uzatılır. Eşlenen uç dizileme ayrıca, bu yöntem ile sağlanır.

Dizilemeye yönelik ssDNA sağlandığında benzer bir yaklaşım kullanılabilir. Örneğin tek iplikli DNA polinükleotitlerin 3' ucu, termina deoksinnükleotidil transferaz (TdT) ve dATP veya dTTP gibi herhangi bir dNTP kullanılarak nükleotitler ile eklenebilir. Bir ssDNA molekülünün ucuna nükleotitlerin bir bağını eklemeye yönelik herhangi bir yöntem kullanılabilir. Şekil 8, yakalama problemlerini içeren poliA'nın destek yüzeyi üzerinde immobilize edildiği ve ssDNA-poliT kuyruklu molekülün yakalandığı bir örnektir. ssDNA ucunun dizisi dahil olmak üzere herhangi bir yakalama dizisi, tamamlayıcı diziler, melezlemenin meydana gelebileceği şekilde destek üzerinde yakalama probu ve ssDNA üzerinde nükleotitler ile sağlandığı sürece kullanılabilir. Bir DNA:DNA dubleksini oluşturmak üzere bir DNA polimerazı ile dsDNA'yı oluşturmak üzere yakalama probunun uzatılması, adaptör oligolarının transpozisyonel ligasyonu ve önceden

açıklandığı üzere iplik değişim amplifikasyonu, küme formasyonuna yönelik çift iplikli moleküller sağlamak için gerçekleştirilebilir. Çift iplikli molekül akabinde güçlendirilebilir (örneğin küme amplifikasyonu) ve dizilenebilir.

Bir diğer örnek (Şekil 2) yoluyla RNA (toplam veya poliA bakımından zenginleştirilmiş) parçalanır, bir fosfat ile muamele edilir ve akabinde tek iplikli bir adaptör molekül, P7 yüzeye bağlı primerin tamamlayıcısını içeren her bir parçanın 3' ucuna bağlanır. Parçalar akabinde, bir desteğe (örneğin akış hücresi) eklenir ve melezleme vasıtasıyla yakalanır. Melezlenen RNA molekülleri, bir ters transkriptaz polimerazı ile bir DNA:RNA dubleksine dönüştürülür. P5 primer dizisi ile bir ME dizisinin bir transposazını ve bir adaptör dubleksini (örneğin transpozon) içeren bir transpozom bileşiği, dubleksi etiketlemek üzere kullanılabilir. Bir iplik değiştirme polimerazı ile uca DNA ipliğinin uzatılmasından sonra moleküller güçlendirilebilir ve dizilenebilir.

Bir diğer örnek (Şekil 3) yoluyla iki yüzey aşılı primeri içeren bir destek (örneğin akış hücresi) kullanılır: standart bir aşılama primer (örneğin P5) ve aşağı akım yönlü (3') tarafına hedefe spesifik bir yakalama probuna sahip modifiyeli bir aşılama primer (örneğin P7). Bir hedefe spesifik probun bir örneği, bir retroviral ters transkriptaza (örneğin HIV polimerazı) tamamlayıcı bir oligo dizisidir. Safılaştırılan viral RNA, bir desteğe eklenir, melezleme vasıtasıyla yakalanır, ters transkriptaz ile kopyalanır ve etiketlenir. Dizileme, etiketlenen adaptöre tavlama bir primer ile ve yakalama probunun diğer ucunda sağlanabilir. İsteğe bağlı olarak özel destek, birçok farklı RNA hedefinin eş zamanlı yakalanmasına olanak sağlamak üzere birçok farklı hedefe spesifik yakalama probunu içerir.

Etiketlenen DNA:DNA veya DNA:RNA dublekslerini oluşturmak üzere hedef DNA:DNA veya DNA:RNA dublekslerini etiketlemek için bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunun kullanımı, bir transposaz, bir transpozon dizi bileşimi ve uygun reaksiyon koşullarını içerir.

Bu boyunca kullanıldığı üzere transpozon terimi, bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda işlevsel olan transposaz veya integras enzimi ile bileşiği oluşturmak üzere gereken nükleotid dizilerini içeren çift iplikli bir DNA'ya refere eder. Bir transpozon, bir bileşiği veya bir sinaptik bileşiği veya bir transpozom bileşiği oluşturur. Transpozon ayrıca, transpozon dizisini tanıyan ve buna bağlanan bir transposaz veya integras ile bir transpozom bileşimi oluşturabilir ve burada bileşik, bunun ile bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda inkübe edildiği hedef DNA içine transpozonu koyabilir veya transpoze edilebilir. Bir transpozon, aktarılmış bir transpozon dizisinden veya aktarılmış iplikten ve aktarılmamış bir transpozon dizisinden ve aktarılmamış iplikten oluşan iki tamamlayıcı diziyi sergiler. Örneğin, bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda aktif olan bir hiperaktif Tn5 transposazını (örneğin EZ-Tn5™ Transposaz, EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, ABD) oluşturan bir transpozon, aktarılmış bir 5' AGATGTGTATAAGAGACAG 3' transpozon dizisini (SEQ ID NO: 1) sergileyen aktarılmış bir ipliği ve aktarılmamış bir 5' CTGTCTCTTATACACATCT 3' transpozon dizisini (SEQ ID NO: 2) sergileyen aktarılmamış bir ipliği içerir. Aktarılmış bir ipliğin 3' ucu, bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda hedef nükleik aside birleştirilir veya aktarılır. Aktarılmış transpozon uç dizisine tamamlayıcı olan bir transpozon uç dizisini sergileyen aktarılmamış iplik, bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda hedef nükleik aside birleştirilmez veya aktarılmaz. Burada kullanıldığı üzere bir transpozon bileşimi, isteğe bağlı olarak ilave diziler dahil olmak üzere bir transpozonu (diğer bir deyişle bir transpozisyon reaksiyon geçirmek üzere bir transposaz ile hareket edebilen minimum çift iplikli DNA segmenti) içeren bir bileşime refere eder. Örneğin transpozon bileşimi, kombinasyon halinde transpozonun dizilerini sergileyen aktarılmış transpozon oligonükleotidi veya aktarılmış iplik ve aktarılmamış iplikli oligonükleotit veya aktarılmış ipliği içeren iki transpozon oligonükleotidini içerir. Bir veya iki iplik, ilave diziyi içerebilir. Transpozon doğal olarak meydana gelen ve/veya doğal olmayan yollardan meydana gelen nükleotitleri veya doğal veya doğal olmayan temel bağlantıları

içerebilir. İsteğe bağlı olarak transpozon ayrıca, transpozonu oluşturan bir veya daha fazla nükleotide yapışık bir veya daha fazla kısmı içerebilir. Örneğin transpozonun bir veya iki ipliği biyotinilatlanabilir veya bir etiketi örneğin bir floresan etiketini içerebilir.

Aktarılmış transpozon oligonükleotit ve aktarılmış iplik terimleri, değiştirilebilir şekilde kullanılır ve transpozonların ve transpozon bileşimlerinin aktarılmış kısmına, diğer bir deyişle transpozon ucunun, bir etikete veya diğer diziye veya kısma yapışık olup olmadığına bakılmaksızın refere eder. Benzer şekilde aktarılmamış transpozon oligonükleotit ve akabinde iplik terimleri değiştirilebilir şekilde kullanılır ve transpozonların ve transpozon bileşimlerinin aktarılmamış kısmına refere eder.

Bazı düzenlemelerde transpozon bileşimi, transpozon dizilerine ek olarak bir veya daha fazla diğer nükleotid dizisi ile en az bir transpozonu içerir veya bundan oluşur. Dolayısıyla bazı düzenlemelerde transpozon bileşimi, aktarılmış transpozon dizisinin, örneğin bir etiket dizisi, bir veya daha fazla diğer nükleotid dizisi 5' ile aktarılmış bir ipliği içerir. Aktarılmış transpozon dizisine ek olarak etiket, bir veya daha fazla diğer etiket kısmına veya etiket alanına sahip olabilir.

Burada kullanıldığı üzere bir “etiket”, bunun katıldığı bir nükleik asit parçasının tanımlanması veya ele alınmasının bir yolunu sağlayan bir nükleik asit bileşenine, genel olarak DNA’ya refere eder. Örneğin bir etiket, etiketin yapıştırıldığı (örneğin, bir DNA polimerazı ile uzatmaya yönelik bir primer gibi bşr oligonükleotidi tavlama yönelik bir yer sağlanarak, yakalamaya yönelik veya bir ligasyon reaksiyonuna yönelik bir oligonükleotit sağlanarak veya belirli bir kaynaktan oluştuğu üzere nükleik asidin saptanması sağlanarak) DNA’nın saptanmasına, tanımlanmasına ve/veya moleküler veya biyokimyasal manipülasyonuna olanak veren bir nükleotit dizisini içerir. Bir nükleik asit molekülüne etiketin birleştirilmesi prosesine bazen burada, “etiketleme” olarak

refere edilir ve etiketlemeye tabi tutulan veya bir etiketi içeren nükleik asitlere, “etiketli” (örneğin “etiket RNA”) olarak refere edilir.

Bu boyunca kullanıldığı üzere ipliklilik veya ipliğe spesifik bilgiler terimleri, orijinal tek iplikli molekülün yönü hakkında bilginin korunmasına refere eder. DNA ipliğinin, DNA:RNA dublekslerinde RNA ipliğine tamamlayıcı olduğunun bilinmesi nedeniyle bu, sağlanan yöntemlerde korunur. Dolayısıyla DNA ipliği dizilenirken dizi, ipliğe spesifik bilgileri koruyan ve RNA molekülünün ve/veya bunun ifade düzeyinin doğru saptanmasına olanak sağlayan RNA ipliğinin dizisi olacaktır. İpliğe spesifik bilgileri korumaya yönelik yöntemler ayrıca, bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilen WO 2011/003630’da açıklanır. Ancak WO 2011/003630’da açıklanan yöntem, burada açıklandığı üzere mevcut başvuruda sağlanan yöntemler kadar verimli olmayan çift iplikli cDNA molekülüne RNA moleküllerinin dönüştürülmesini gerektirir. Ayrıca WO 2011/003630’da açıklanan yöntem, iplik bilgilerini korumak amacıyla bir etiketi gerektirir. Burada sağlanan yöntemlerde bir etiket, ipliğe spesifik bilgileri veya iplikliliği korumak üzere gerekmez. DNA:RNA dublekslerinin DNA ipliğinin (diğer bir deyişle birinci DNA ipliği), birinci ve ikinci güçlendirilmiş DNA ipliklerini üretmek üzere güçlendirildiği düzenlemelerde ipliklilik, birinci DNA ipliğinin, orijinal RNA ipliğine tamamlayıcı olduğu ve ikinci DNA ipliğinin, orijinal RNA ipliği ile aynı dizi olduğu (Us yerine dizi içinde Ts hariç olmak üzere) bilgisi ile muhafaza edilir. Dolayısıyla bir etiket (örneğin bir etiket dizisi, transpozonun aktarılmış ipliğe dahil edilebilir), iplikliliği korumak üzere kullanılabildiğinde buna gerek duyulmaz.

Burada kullanıldığı üzere bir etiket kısmı veya bir etiket alanı, istenen hedeflenmiş bir amaca veya uygulamaya yönelik bir diziyi sergileyen bir etiketin bir kısmı veya alanı anlamına gelir. Bir etiket kısmı veya etiket alanı, etiket kısmının veya etiket alanının, aktarılmış transpozon dizisini sergilediği transpozon alanıdır. Aktarılmış ipliğin ayrıca bir veya daha fazla diğer nükleotid dizilerini sergilediği bazı düzenlemelerde etiket ayrıca, bir veya daha fazla diğer etiket

alanına sahiptir, etiket alanlarının her biri, istenen herhangi bir amaca yönelik olarak sağlanır. Örneğin bir transpozon bileşimi, bir sınırlama yer etiket alanı, bir yakalama etiket alanı, bir dizileme etiket alanı, bir amplifikasyon etiket alanı, bir saptama etiket alanı, bir adres etiket alanı ve bir transkripsiyon promotör alandan biri veya daha fazlası arasından seçilen bir etiket alanını içerebilen (i) bir veya daha fazla ilave diziyi (transpozon dizisine ek olarak) sergileyen aktarılmış bir ipliği; ve (ii) aktarılmış transpozon diziyi sergileyen aktarılmış bir ipliği içerebilir.

Bir açıklamanın, bir etiket alanına yönelik kullanılması halinde farklı etiket alanlarının isimleri ve açıklamaları, farklı düzenlemelerde etiketin farklı kısımlarının veya alanlarının hedeflenen amaçlarını ve uygulamalarını anlamayı ve tartışmayı daha kolay hale getirmek gibi kolaylık içindir. Ancak bu isimlerin ve açıklamaların, herhangi bir şekilde etiketin veya etiket alanlarından herhangi birinin kullanımını veya uygulamalarını kısıtlaması hedeflenmez. Dolayısıyla herhangi bir etiket veya etiket alanı, hedeflenen veya primer amaca veya uygulamaya ek olarak veya bunların yerine herhangi bir amaca yönelik olarak kullanılabilir. Ayrıca bir etiket alanı, iki veya daha fazla diğer etiket alanlarını içerebilir (örneğin bir dizileme etiket alanı, bir yakalama etiket alanını ve bir amplifikasyon etiket alanını içerebilir) veya bir etiket alanı, iki veya daha fazla farklı etiket alanının işlevlerini veya amaçlarını veya uygulamalarını sağlayabilir (örneğin bir yakalama etiket alanı ayrıca, belirli bir başvuruya yönelik bir dizileme etiket alanının ve/veya bir amplifikasyon etiket alanının işlevini veya amacını sağlayabilir). Ayrıca etiketin, belirli herhangi bir amaç veya uygulama veya işleve yönelik kullanmak amacıyla bir veya daha fazla farklı alan bakımından açıklanması gerekmez.

Bu boyunca kullanıldığı üzere transposaz terimi, bir transpozonu içeren bileşim (örneğin transpozonlar, transpozon bileşimleri) ile işlevsel bir bileşiği oluşturabilen ve bunun ile bir *in vitro* transpozisyon reaksiyonunda inkübe edildiği çift iplikli hedef nükleik aside transpozon içeren bileşimin insersiyonunu veya transpozisyonunu katalize edebilen bir enzime refere eder. Sağlanan

yöntemlerin bir transposazı ayrıca, retrotranspozonlar ve retrovirüslerden integrazları içerir. Sağlanan yöntemlerde kullanılabilen örnek niteliğindeki transposazlar, Tn5 transposazı ve MuA transposazın doğal suş veya mutant formlarını içerir.

Bir “transpozisyon reaksiyonu”, bir veya daha fazla transpozonun, rastgele yerlerde veya neredeyse rastgele yerlerde hedef nükleik asitler içine konulduğu bir reaksiyondur. Bir transpozisyon reaksiyonundaki temel bileşenler, bir transposaz ve aktarılmış transpozon dizisi ve bunun tamamlayıcısının (diğer bir deyişle aktarılmamış transpozon uç dizisi) yanı sıra bir işlevsel transpozisyon veya transpozom bileşiğini oluşturmak üzere gereken diğer bileşenler dahil olmak üzere bir transpozonun nükleotid dizilerini sergileyen DNA oligonükleotitleridir. Bu buluşun yöntemi, bir hiperaktif Tn5 transposazı ve bir Tn5-tipi transpozon ucu ile veya bir MuA veya HYPERMu transposazı ve R1 ve R2 uç dizilerini içeren bir Mu transpozon ucu ile oluşturulan bir transpozisyon bileşiği kullanılarak örneklendirilir (Bakınız örneğin, Goryshin, I. and Reznikoff, W. S., J. Biol. Chem., 273: 7367, 1998; and Mizuuchi, K., Cell, 35: 785, 1983; Savilahti, H, et al., EMBO J., 14: 4893, 1995; bunlar bütünüyle burada referans yoluyla dahili edilir). Ancak, hedeflenen amacına yönelik hedef nükleik asitleri etiketlemek üzere yeterli verim ile rastgele veya neredeyse tamamen rastgele bir şekilde bir transpozon ucunu yerleştirebilen herhangi bir transpozisyon sistemi, sağlanan yöntemlerde kullanılabilir. Sağlanan yöntemlerde kullanılabilen bilindik transpozisyon sistemlerin diğer özellikleri, bunlar ile sınırlı olmaksızın, *Staphylococcus aureus* Tn552, Tyl, Transpozon Tn7, Tn/O ve IS10, Mariner transposaz, Tc1, P Elemanı, Tn3, bakteriyel insersiyon dizileri, retrovirüsler ve mayanın retrotranspozonunu içerir (Bakınız örneğin, Colegio O R et al., J. Bacteriol., 183: 2384-8, 2001; Kirby C et al., Mol. Microbiol., 43: 173-86, 2002; Devine S E, and Boeke J D., Nucleic Acids Res., 22: 3765-72, 1994; International Patent Application No. WO 95/23875; Craig, N L, Science. 271: 1512, 1996; Craig, N L, Review in: Curr Top Microbiol Immunol., 204: 27-48, 1996; Kleckner N, et al., Curr Top Microbiol Immunol., 204: 49-82, 1996; Lampe

D J, et al., EMBO J., 15: 5470-9, 1996; Plasterk R H, Curr Top Microbiol Immunol, 204: 125-43, 1996; Gloor, G B, Methods Mol. Biol., 260: 97-114, 2004; Ichikawa H, and Ohtsubo E., J Biol. Chem. 265: 18829-32, 1990; Ohtsubo, F and Sekine, Y, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204: 1-26, 1996; Brown P O, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86: 2525-9, 1989; Boeke J D and Corces V G, Annu Rev Microbiol. 43: 403-34, 1989; bunlar bütünüyle referans yoluyla burada dahili edilir).

Bir hedef dizi içine bir transpozonu yerleştirmeye yönelik yöntem, uygun herhangi bir transpozon sistemi kullanılarak *in vitro* gerçekleştirilebilir, buna yönelik uygun bir *in vitro* transpozon sistemi mevcuttur veya teknikteki bilgiye bağlı olarak geliştirilebilir. Genel olarak mevcut buluşun yöntemlerinde kullanıma yönelik uygun bir *in vitro* transpozisyon sistemi, yeterli saflığa, yeterli konsantrasyona ve yeterli *in vitro* transpozisyon aktivitesine sahip bir transposaz enzimini ve bunun ile transposazın, transpozisyon reaksiyonunu katalize edebilen ilgili transposaz ile bir işlevsel bileşiği oluşturduğu bir transpozonu gerektirir. Buluşta kullanılabilen uygun transposaz transpozon dizileri, bunlar ile sınırlı olmaksızın, transposazın bir doğal suş, türev veya mutant formu arasından seçilen bir transposaz ile bir bileşiği oluşturan doğal suş, türev veya mutan transpozon dizilerini içerir.

Sağlanan yöntemlerde DNA:RNA dubleksleri, çeşitli yollarda sağlanabilir. Örnek yoluyla destek, birçok primeri içerebilir ve DNA:RNA dubleksleri, destek üzerinde immobilize primerlere bir veya daha fazla RNA molekülü melezlenerek ve bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksi üretmek üzere şablon olarak RNA moleküllerinin kullanılması yoluyla RNA moleküllerine melezlenen primerler uzatılarak sağlanır. İsteğe bağlı olarak birçok DNA:RNA dubleksi, destek üzerinde immobilize primerlere birçok RNA molekülü melezlenerek ve birçok DNA:RNA dubleksi üretmek üzere şablon olarak RNA moleküllerinin kullanılması yoluyla RNA moleküllerine melezlenen primerler uzatılarak sağlanır.

Yukarıda belirtildiği üzere yöntemler, birçok primer ile bir desteğin sağlanmasını içerebilir; primerler veya bunların bir alt kümesi, bir veya daha fazla RNA molekülüne bağlanabilen bir diziyi içerir. Örneğin immobilize primerler, bir poliT dizisini içerebilir ve RNA, poliT dizisine melezlenebilen bir poliA dizisini içerebilir. Alternatif olarak veya ek olarak birçok immobilize primer, birçok RNA molekülü içinde RNA moleküllerinden birine veya daha fazlasına melezlenebilen hedefe spesifik primerleri içerebilir. Dolayısıyla bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksinin RNA ipliği, immobilize primerlerden birinin veya daha fazlasının en az bir kısmına tamamlayıcı bir diziyi içerir. İsteğe bağlı olarak birçok immobilize primer, bir birinci dizinin primerlerinin bir birinci alt kümesini ve bir ikinci dizinin primerlerinin bir ikinci alt kümesini içerir. Primerlerin birinci veya ikinci alt kümesi, bir poliT dizisini içerebilir.

İsteğe bağlı olarak bir 3' adaptörü, birçok RNA molekülüne eklenebilir, 3' adaptörü, birçok immobilize primere veya bunların bir alt kümesine tamamlayıcı bir diziyi içerir. Bu tür 3' adaptöre bağlanan RNA molekülleri akabinde, immobilize primerlere melezlenebilir.

Dolayısıyla immobilize primerler veya bunların bir alt kümesi, bir poliT dizisini, bir RNA hedefe spesifik diziyi veya RNA molekülüne bağlanan bir adaptöre tamamlayıcı bir diziyi içerebilir. İsteğe bağlı olarak birçok primer, primerlerin en az iki alt kümesini içerir, birinci alt küme, bir poliT dizisi, bir RNA hedefe spesifik dizi veya RNA molekülüne bağlanan bir adaptöre tamamlayıcı bir diziyi içerir ve primerlerin ikinci alt kümesi, DNA:RNA dublekslerinin DNA ipliği üzerinde bir diziye bağlanabilen bir diziyi içerir. Bu tür bir dizi örneğin, transpozonun aktarılmış ipliğinin bir dizisi ile aynı dizi olabilir. Bu boyunca açıklandığı üzere transpozisyondan sonra DNA ipliğinin ucu ile transpozonun aktarılmamış ipliği arasında bir boşluk olacaktır. DNA ipliği akabinde, RNA ipliğini kopyalamak üzere uzatılabilir. Kopyalama, transpozonun aktarılmış ipliğinin dizilerinin kopyalanmasını içerecektir. DNA ipliği akabinde,

transpozonun aktarılmış ipliğinin dizilerine tamamlayıcı dizileri ve dolayısıyla desteğin yüzeyi üzerinde primerleri veya bunların alt kümesini içerecektir. Diğer bir deyişle primerlerden birinin veya daha fazlasının, transpozonun aktarılmış ipliği ile aynı veya buna benzer bir dizisini içermesi halinde DNA:RNA dublekslerindeki DNA ipliği akabinde, DNA ipliğinin primere tamamlayıcı bir diziyi içermesi nedeniyle primerlere melezlenebilecektir.

5' uçlarına RNA ipliklerini kopyalamak üzere DNA ipliklerinin 3' ucunu uzatabilen ve transpozonun aktarılmamış ipliğini değiştirebilen uygun nükleik asit modifiye edici enzimler bilinir. Kısaca bazı DNA polimerazları, yeni bir DNA ipliği, polimeraz tarafından sentezlendikçe şablon ipliğe tamamlayıcı ipliğin yerine geçebilir. Bu proses iplik yerdeğişimi olarak adlandırılır ve bu aktiviteye sahip DNA polimerazlarına burada, iplik değiştirici DNA polimerazları olarak refere edilir. Genel olarak sağlanan yöntemlere yönelik olarak kullanılan bir DNA şablonuna spesifik DNA polimerazı, enzimin işlenebilirliği olarak refere edilen şablondan bağlantısı kesilmeksizin (veya DNA sentezinin sonlandırılması) hedeflenen amaca yönelik uygun bir uzunluğa sahip DNA'yı verimli şekilde sentezler. İplik yer değişimi için bir DNA polimerazının kabiliyeti, bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilen Fire ve Xu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4641-4645, 1995) tarafından açıklandığı üzere bir dönen daire replikasyon analizinde polimeraz kullanılarak kolay bir şekilde belirlenebilir. İplik yerdeğişimi ve DNA polimeraz işlenebilirliği ayrıca, bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilen Kong vd. (J. Biol. Chem. 268: 1965-1975, 1993) içinde açıklanan yöntemler kullanılarak analiz edilebilir. Terminal transferaz ayrıca, burada bir DNA polimerazı olarak ifade edilir, burada DNA polimerazı, sağlanan yöntemlerin bazı düzenlemelerinde bir bileşim olarak kullanılır. Terminal transferaz, DNA'nın 3'-hidroksil terminallerine dNTP'lerin şablondan bağımsız eklenmesini katalize etmezi nedeniyle kullanılabilir.

Burada sağlanan yöntemlerde yöntem, DNA iplilerinin en az bir kısmının dizilenmesini ve/veya DNA ipliklerinin en az bir kısmının güçlendirilmesini

ayrıca içerebilir. İsteğe bağlı olarak DNA:RNA dublekslerinden RNA iplikleri, dizileme ve/veya amplifikasyondan önce çıkarılabilir. Örnek yoluyla yöntem ayrıca, DNA:RNA dublekslerinden RNA ipliklerinin çıkarılmasını ve DNA ipliklerinin (diğer bir deyişle birinci DNA iplikleri) en az bir kısmının dizilenmesini içerir. Yöntem ayrıca, DNA:RNA dublekslerinin DNA ipliğine (diğer bir deyişle birinci DNA ipliği) tamamlayıcı bir ikinci DNA ipliğini üretmek üzere DNA ipliklerinin en az bir kısmının kopyalanmasını içerebilir. İkinci tamamlayıcı DNA ipliği akabinde istenmesi halinde dizilenebilir. İsteğe bağlı olarak DNA:RNA dublekslerinin birinci DNA ipliği, ikinci tamamlayıcı DNA ipliğinin dizilenmesinden önce çıkarılabilir.

Sağlanan yöntemlerde isteğe bağlı olarak DNA:RNA dublekslerinden RNA ipliğinin çıkarılmasından sonra DNA iplikleri, birinci ve ikinci güçlendirilmiş iplikleri içeren birçok çift iplikli DNA molekülünü üretmek üzere güçlendirilebilir. İsteğe bağlı olarak amplifikasyon, aşağıda daha detaylı şekilde açıklanan bir kümeyi üretir.

Bazı düzenlemelerde DNA iplikleri, birçok çift iplikli DNA molekülünü üretmek üzere güçlendirilirken ipliklerden biri veya ikisi dizilenebilir. Örnek yoluyla yöntemler, ikinci güçlendirilen ipliklerin en az bir kısmının dizilenmesinden sonra birinci güçlendirilen ipliklerin çıkarılmasını içerebilir. İsteğe bağlı olarak birinci güçlendirilen iplikler, ikinci güçlendirilen ipliklerin en az bir kısmı kopyalanarak yeniden oluşturulabilir. İkinci güçlendirilen iplikler akabinde, birinci güçlendirilen ipliklerin en az bir kısmını dizilemek amacıyla çıkarılabilir. İsteğe bağlı olarak birinci ve ikinci güçlendirilen ipliklerden birini veya ikisinin bir kısmının veya tamamının dizi okuması, herhangi bir ipliğin tamamını veya bir kısmını çıkartmaksızın gerçekleştirilebilir.

Çeşitli protokoller, güçlendirilen nükleik asitleri örneğin bir destek üzerinde güçlendirilen nükleik asitleri oluşturmak üzere kullanılabilir. Örneğin nükleik asitler, emülsiyon PCR veya köprü PCR ile güçlendirilebilir (Mitra & Church

Nucleic Acids Res. 27, e34 (1999); Dressman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 8817-8822 (2003); Adessi, C. et al. Nucleic Acids Res. 28, e87 (2000); Fedurco et al. Nucleic Acids Res. 34, e22 (2006), bunların her biri, referans yoluyla burada dahil edilir).

Emülsiyon PCR'yi kullanan düzenlemelerde nükleik asitler, bir yağ içinde su emülsiyonunda güçlendirilen PCR olabilir. Bir düzenlemede tek bir primer çifti kullanılır. PCR primerlerinin biri, bir desteğin (örneğin mikron ölçekli boncuklar) yüzeyine (5' yapışık) bağlanır ve diğer primer, solüsyon içindedir. İsteğe bağlı olarak destek, bir veya daha fazla dizinin primerlerini içerir, primerler, bir veya daha fazla hedef RNA moleküllerini melezleyebilen hedefe spesifik primerlerdir ve solüsyon içindeki primer, aynı dizidir (örneğin 5' ucuna etiketlenen RNA ipliğinin kopyalanması yoluyla DNA ipliğine eklenen diziye tamamlayıcı bir dizi). Genel olarak düşük bir şablon konsantrasyonu, mevcut sıfır veya bir şablon molekülüne sahip çoğu boncuk içeren bölmeler ile sonuçlanır. Koruyucu emülsiyon bölmelerinde (burada bir boncuk ve şablon molekül mevcuttur) RNA molekülleri yakalanabilir ve/veya boncuğun yüzeyinde güçlendirilen RNA molekülünün karşılık gelen DNA tamamlayıcısı olabilir. Emülsiyon kırıldıktan sonra amplifikasyon ürünlerini taşıyan boncuklar selektif olarak zenginleştirilebilir. Her bir klonal olarak güçlendirilen boncuk, şablon kütüphanesinden tek bir molekülün amplifikasyonuna karşılık gelen yüzey PCR ürünleri üzerinde taşıyacaktır. Kullanışlı olan emülsiyon PCR yöntemlerinin çeşitli düzenlemeleri, her birinin referans yoluyla burada dahil edildiği U.S. Pat. App. Publ. Nos. 2005/0042648 A1; 2005/0079510 A1 and 2005/0130173 A1 ve WO 05/010145'te belirtilir.

Ayrıca küme formasyonu olarak bilinen köprü PCR'yi kullanan düzenlemelerde bir şablon kütüphanesinden nükleik asitler, bir desteğin yüzeyi üzerinde kaplanan primerler kullanılarak güçlendirilebilir. Primerler, esnek bir bağlayıcı ile 5' uçlarında yapıştırılabilir. Şablon kütüphanesinin belirtilen herhangi bir üyesi kaynaklı amplifikasyon ürünleri, köken noktasına yakın lokal olarak bağlı kalır.

PCR'nin sonucunda her bir klonal küme, şablon kütüphanesinin tek bir üyesinin birçok kopyasını içerir. Sağlanan yöntemlerde her bir DNA:RNA dubleks, bir klonal kümenin kökenini oluşturur. RNA ipliğinin çıkarılması üzerine DNA ipliği, DNA ipliğinin güçlendirilmiş kopyalarını oluşturmak üzere ve klonal kümeyi üretmek üzere desteğe yapıştırılan primerler kullanılarak kopyalanabilir. Kullanışlı olan emülsiyon PCR yöntemlerinin çeşitli düzenlemeleri, her birinin referans yoluyla burada dahil edildiği U.S. Pat. App. Publ. No. 2007/0128624 A1, WO 07/010251, U.S. Pat. No. 6,090,592 ve U.S. Pat. No. 5,641,658'de belirtilir. Amplifikasyonu gerçekleştirmeye yönelik yöntemler ayrıca, U.S. Publication No. 2009/0226975; WO 98/44151; WO 00/18957; WO 02/46456; WO 06/064199; ve WO 07/010251'de açıklanır; bunlar bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilir.

Burada belirtilen yöntemler, örneğin en az yöntem 10 özellik/cm², 100 özellik/cm², 500 özellik/cm², 1,000 özellik/cm², 5,000 özellik/cm², 10,000 özellik/cm², 50,000 özellik/cm², 100,000 özellik/cm², 1,000,000 özellik/cm², 5,000,000 özellik/cm² veya daha yüksek dahil olmak üzere çeşitli yoğunluklardan herhangi birinde özelliklere sahip dizilimleri yapabilir veya kullanabilir.

Burada kullanıldığı üzere “nükleik asit” terimi, birbirine bağlanan en az iki nükleotit analog monomere refere etmek üzere kullanılabilir. Bir nükleik asit, fosfodiester bağlarını içerebilir ancak bazı düzenlemelerde bir nükleik asit, örneğin fosforamid, fosforotioat, fosforoditioat, peptit nükleik asit temelleri ve bağlantıları, pozitif temeller veya iyonik olmayan temelleri içeren diğer türden temellere sahip bir analog olabilir.

Bir nükleik asit, riboz (doğal olarak meydana gelen RNA içinde mevcuttur), deoksi-riboz (doğal olarak meydana gelen DNA içinde mevcuttur) veya dideoksi riboz gibi bir pentoz kısmı içerebilir. Bazı düzenlemelerde bir nükleik asit, pentoz olmayan bir kısma veya bir riboz yerine karboksilik şekere veya deoksiriboz kısmına sahip olabilir. Bir nükleik asit, bunlar ile sınırlı olmaksızın adenin (A),

guanin (G), timin (T), urasil (U), sitozin (C), inosin, ksantanin, hipoksantanin, izositosin, izoguanin, nitropirrol (3-nitropirrol dahil) ve/veya nitroindol (5-nitroindol dahil) dahil olmak üzere bir veya daha fazla farklı baz kısımlarına sahip olabilir. Burada kullanılan bir nükleik asit, natif veya natif olmayan bazıları içerebilir. Dolayısıyla bir nükleik asit, doğal olarak meydana gelen ve/veya doğal olmayan yollardan meydana gelen nükleotitleri veya doğal veya doğal olmayan temel bağlantıları içerebilir. Nükleik asitler, belirtildiği üzere tek iplikli veya çift iplikli olabilir veya çift iplikli ve tek iplikli dizil kısımlarını içerebilir. Nükleik asit, DNA (örneğin genomik DNA veya cDNA), RNA veya bir hibrit olabilir.

Burada kullanıldığı üzere “dizilim” terimi, farklı moleküllerin, nispi konumlarına göre birbirinden ayırt edilebileceği şekilde bir veya daha fazla desteğe yapıştırılan farklı moleküllerin bir popülasyonu anlamına gelir. Bir dizilim, her birinin bir destek üzerinde farklı adreslenebilir bir konumda (örneğin bir özellik) konumlandırıldığı farklı molekülleri içerebilir. Alternatif olarak bir dizilim, her birinin farklı bir molekül taşıdığı ayrı destekleri içerebilir, burada farklı prob molekülleri, desteğin yapıştırıldığı bir yüzey üzerindeki desteklerin konumlarına göre veya bir sıvı akım gibi bir likit içinde desteklerin konumlarına göre tanımlanabilir. Dizilimin molekülleri örneğin, nükleik asit primerleri, nükleik asit problemleri, nükleik asit şablonları veya polimerazlar gibi nükleik asit enzimleri olabilir. Örneğin belirli düzenlemelerde hedef nükleik asitler, bir detektörün bir yüzeyine veya desteğin yüzeyinde mevcut olan bir katmana (örneğin bir akrilamid katman) yapıştırılabilir. Hidrojeller özellikle, referans burada dahil edilen US Pat. Pub. No. 2011/0059865 A1’da belirtilenler gibi kullanışlıdır.

Burada kullanıldığı üzere “nükleik asitlerin dizilimi” terimi, bunun üzerinde veya bunun içinde yerleştirilen mekansal olarak ayırt edilebilir birçok nükleik aside sahip katı bir katı anlamına gelir. Nükleik asitler, özelliklerin sıralı veya rastgele bir modeli halinde yerleştirilebilir. Bir ayrı özellik örneğin, mekansal olarak izole bir nükleik asit molekülü veya bir küme gibi nükleik asit moleküllerinin bir takımı olabilir. Bir dizilim, birçok numunenin işlenmesine olanak sağlamak üzere

konfigüre edilen birçok ayrı dizilimi içeren bir kompozit dizilim olabilir. Burada “alt dizilimler” olarak refere edilen ayrı dizilim, nükleik asit özelliklerinin gruplarını içerir. Alt dizilimler, büyük bir dizilim ile ayrı bölgelerde görülür. Alt dizilimlerin kendileri, sıralı veya sırasız olabilir. Bu tür alt dizilimler isteğe bağlı olarak mekansal olarak adreslenebilir olabilir. Alt dizilimler, özdeş nükleik asitlerin kümelerini içerebilir. Ayrı alt dizilimlerden oluşan bir kompozit dizilimin bir örneği, gözlere sahip bir mikrotitre plakasıdır, burada bir bütün olarak plaka, her bir ayrı göz, daha büyük kompozit dizilim içinde bir alt dizilimi temsil ederken nükleik asitlerin bir dizilimidir (veya kompozit dizilim).

Burada kullanıldığı üzere “destek” terimi, nükleik asitlerin bir dizilimini immobilize etmeye yönelik bir alt tabakaya refere eder. Bir “destek”, bir nükleik asit diziliminin yapıştırıldığı veya üzerine nükleik asitlerin sentezlendiği ve/veya modifiye edildiği sert veya yarı sert bir yüzeye sahip bir materyaldir. Destekler, herhangi bir reçine, mikroboncuk, cam, kontrollü gözenekli cam (CPG), polimer destek, membran kağıt, plastik, plastik tüp veya tablet, plastik boncuk, cam boncuk, sürgü, seramik, silikon çip, çok gözlü plaka, naylon membran, fiber optik ve PVDF membranını içerebilir.

Bir destek, herhangi bir düz yonga benzeri alt tabakalar ve 96 gözlü plakalar dahil olmak üzere bir mikrotitre plaka gibi gözlere sahip düz alt tabakaları içerebilir. Örnek niteliğindeki düz alt tabakalar, çipler, sürgüler, dalgalanmış alt tabakalar, mikrotitre plakalar ve cBot dizileme atölyesinde (Illumina, Inc., San Diego, CA) kullanılan sekiz kanal akış hücresi gibi birçok mikroakışkan kanallara sahip çok şeritli akış hücre reaktörleri dahil olmak üzere akış hücre reaktörlerini içerir. Kullanılabilen örnek niteliğindeki akış hücreleri ayrıca, bütünüyle referans burada yoluyla dahil edilen WO 2007/123744’te açıklanır.

Bir destek ayrıca, manyetik boncuklar, içi boş boncuklar ve katı boncuklar dahil olmak üzere boncukları içerebilir. Boncuklar, isteğe bağlı olarak ayrıca gözleri içeren düz destekler gibi düz destekler ile bağlantılı olarak kullanılabilir.

Boncuklar veya alternatif olarak mikroküreler genel olarak, sert veya yarı sert bir materyalden yapılan küçük bir gövdeye refere eder. Gövde, örneğin bir küre, oval, mikroküre veya düzenli veya düzensiz boyutlara sahip diğer tanımlanmış partikül boyutu gibi karakterize edilen bir şekle sahip olabilir. Boncukların boyutları ayrıca sınırlama olmaksızın çap bakımından yaklaşık 1 µm, yaklaşık 2 µm, yaklaşık 3 µm, yaklaşık 5 µm, yaklaşık 10 µm, yaklaşık 20 µm, yaklaşık 30 µm, yaklaşık 40 µm, yaklaşık 60 µm, yaklaşık 100 µm, yaklaşık 150 µm veya yaklaşık 200 µm'yi içerebilir. Diğer partiküller, boncuklara ve mikrokürelere yönelik burada açıklananlara benzer şekillerde kullanılabilir.

Bir desteğin bileşimi, örneğin format, kimya ve/veya yapışma yöntemi ve/veya nükleik asit sentezinin yöntemine bağlı olarak değişebilir. Mevcut tarifname ile uygun olarak kullanılabilen destek materyalleri, bunlar ile sınırlı olmaksızın polipropilen, polietilen, polibütlen, poliüretanlar, naylon, metaller ve diğer uygun materyalleri içerir. Örnek niteliğindeki bileşimler, polipeptit, polinükleotit ve/veya organik kısım sentezinde kullanılan destekleri ve bunlara verilen kimyasal işlevleri içerir. Bu tür bileşimler örneğin, plastik, seramikler, cam, polistiren, melamin, metilstiren, akrilik polimerler, paramanyetik malzemeler, toria sol, karbon grafit, titanyum dioksit, lateks veya Sepharose™, selüloz, naylon, çapraz bağlı miseller ve Teflon™ gibi çapraz bağlı dekstranların yanı sıra örneğin referans yoluyla burada dahil edilen Bangs Laboratories, Fishers IN'den *Microsphere Detection Guide*" içinde bulunabilen diğer herhangi bir materyali içerir. Bir destek partikülü, çapraz bağlı nişasta, dekstranlar, selüloz, proteinler, polistireni ve metilstirenin yanı sıra diğer stiren ko-polimerler dahil olmak üzere stiren polimerleri içeren organik polimerler, plastikler, cam, seramikler, akrilik polimerler, manyetik olarak yanıt veren materyaller, kolloidler, toriazol, karbon grafit, titanyum dioksit, naylon, lateks veya TEFLON®'dan yapılabilir. Bütünüyle referans yoluyla burada dahil edilen Bangs Laboratories, Fishers, Inc. tarafından "Microsphere Detection Guide" faydalı bir kılavuzdur. Ayrıca mevcut tarifnamenin kapsamı dahilinde örnek niteliğindeki destekler örneğin, ikisinin

bütünüyle referans yoluyla burada dahil edildiği US Application Publication No. 2002/0102578 ve U.S. Pat. No. 6,429,027’De açıklananları içerir.

Sert veya yarı sert bir desteğe bir nükleik asidin yapıştırılması, eşdeğerli veya eşdeğerli olmayan bağlantı(lar) vasıtasıyla meydana gelebilir. Örnek niteliğindeki bağlantılar, her birinin referans yoluyla burada dahil edildiği US Pat. Nos. 6,737,236; 7,259,258; 7,375,234 and 7,427,678; ve US Pat. Pub. No. 2011/0059865 A1’de belirtilir. Bazı düzenlemelerde bir nükleik asit veya diğer reaksiyon bileşeni, bu şekilde bir katı faz desteğine yapıştırılan veya bağlanan bir jel veya diğer yarı katı desteğe yapıştırılabilir. Bu tür düzenlemelerde nükleik asit veya diğer reaksiyon bileşeninin katı faz olacağı anlaşılabacaktır.

İsteğe bağlı olarak destek, bir boncuk veya birçok boncuktur. İsteğe bağlı olarak destek düzlemsel bir destektir. İsteğe bağlı olarak birçok boncuk sağlanır, her bir boncuk, bir veya daha fazla DNA:RNA dubleksini içerir. Bir boncuğun, birden fazla DNA:RNA dubleksini içermesi halinde dubleksler, aynı diziden veya farklı diziden olabilir. İsteğe bağlı olarak birçok boncuk sağlanır, her bir boncuk, bir DNA:RNA dubleksini içerir. Birçok boncuk içindeki boncuklar, aynı veya farklı bir DNA:RNA dubleksini içerebilir. Örneğin birçok boncuk içindeki boncukların bir birinci alt kümesi, bir birinci dizinin bir DNA:RNA dubleksini içerebilirken birçok boncuk içindeki boncukların bir ikinci alt kümesi, bir ikinci dizinin bir DNA:RNA dubleksini içerebilir.

Çeşitli dizileme protokollerinden ve ilgili reaktiflerden herhangi biri, burada belirtilen herhangi bir yöntemde veya cihazda kullanılabilir. Sentez ile dizileme (SBS) teknikleri genel olarak, bir şablon ipliğine karşı nükleotitlerin yinelemeli eklenmesi aracılığıyla yeni doğan bir nükleik asit ipliğinin enzimatik uzatılmasını içerir. SBS, sonlandırıcı bir kısma sahip nükleotit monomerlerini veya herhangi bir sonlandırıcı kısmı eksik olanları kullanabilir. Sonlandırıcılara sahip monomerleri kullanan yöntemler örneğin, açıklamalarının bütünüyle referans yoluyla burada dahil edildiği WO 04/018497, US 7,057,026, WO 91/106678, WO

07/123744,U.S. US 2007/0166705, US 2006/0188901, US 2006/0240439, US 2006/0281109, WO 05/065814, US 2005/0100900, WO 06/064199 veya WO 07010251'de açıklananları içerir. Ayrıca Illumina, Inc., San Diego CA tarafından ticari olarak mevcut olan SBS yöntemleri kullanışlıdır.

SBS teknikleri, bir etiket kısmına sahip nükleotit monomerlerini veya bir etiket kısmı eksik olanları kullanabilir. Buna uygun olarak birleştirme olayları, etiketin floresanı gibi etiketin bir özelliği; moleküler ağırlık veya yük gibi nükleotit monomerin bir özelliği; pirofosfatın veya protonların serbest bırakılması gibi nükleotidin birleştirilmesinin bir yan ürünü; veya benzerine bağlı olarak saptanabilir. Farklı nükleotitler, birbirinden ayırt edilebilir olabilir ve alternatif olarak iki veya daha fazla farklı etiket, kullanılan saptama teknikleri altında ayırt edilemez olabilir. Örneğin bir dizileme reaktifinde mevcut farklı nükleotitler, farklı etiketlere sahip olabilir ve bunlar, Solexa (günümüzde Illumina, Inc.) tarafından geliştirilen dizileme yöntemleri yoluyla örneklendiği üzere uygun optikler kullanılarak ayırt edilebilir. Ancak bir dizileme reaktifinde mevcut iki veya daha fazla farklı nükleotitlere yönelik aynı etiketi kullanmak veya farklı etiketleri zorunlu olarak ayırt etmeyen saptama optiklerini kullanmak ayrıca mümkündür.

Sonlandırıcıları eksik olan nükleotit monomerleri kullanan yöntemler ayrıca örneğin pirodizileme dahil olmak üzere kullanışlıdır. Pirodizileme, belirli nükleotitler yeni doğan ipliğe dahil edildikçe inorganik pirofosfaton (PPi) salınımı saptanır Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Analytical Biochemistry 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." Genome Res. 11(1),3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." Science 281(5375), 363; US Patent No. 6,210,891; US Patent No. 6,258,568 ve US Patent No. 6,274,320, açıklamaları, bütünüyle referans yoluyla burada dahil edilir). Pirodizilemede salınan PPi, ATP sülfürilaz yoluyla adenozin

trifosfata (ATP) dönüştürülerek saptanabilir ve oluşturulan ATP düzeyi, lusiferaz ile üretilen fotonlar vasıtasıyla saptanır.

Bazı düzenlemeler, ligasyon teknikleri yoluyla dizilemeyi kullanabilir. Bu tür teknikler, oligonükleotitleri dahil etmek üzere DNA ligazını kullanır. Burada açıklanan yöntemler ve sistemler ile kullanılabilen örnek niteliğindeki SBS sistemleri ve yöntemleri, açıklamalarının bütünüyle referans yoluyla burada dahil edildiği U.S. Patent No 6,969,488, U.S. Patent No. 6,172,218 ve U.S. Patent No. 6,306,597’de açıklanır.

Bazı düzenlemeler, DNA polimeraz aktivitesinin gerçek zamanlı izlenmesini içeren yöntemleri kullanabilir. Nükleotit birleştirmeleri, örneğin U.S. Patent No. 7,329,492 ve U.S. Patent No. 7,211,414’te (her biri, referans yoluyla burada dahil edilir) açıklandığı üzere bir florofor taşıyan polimeraz ile y-fosfat Etiketli nükleotitler arasındaki floresan rezonans enerji aktarım (FRET) etkileşimleri aracılığıyla saptanabilir veya nükleotit birleştirmeleri örneğin U.S. Patent No. 7,315,019’da (referans yoluyla burada dahil edilir) açıklandığı üzere sıfır-modlu dalga kılavuzları ile ve U.S. Patent No. 7,405,281 and U.S. Patent Application Publication No. 2008/0108082’de (her biri, referans yoluyla burada dahil edilir) açıklandığı üzere floresan nükleotit analogları ve düzenlenen polimerazlar kullanılarak saptanabilir. Aydınlatma, floresanlı şekilde etiketlenen nükleotitlerin birleştirilmesinin, düşük arka plan ile gözlemlenebileceği şekilde bir yüzeye bağlı polimeraz etrafında bir zeptolitre-ölçek hacmi ile sınırlandırılabilir (Levene, M.I. et al. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations." Science 299, 682-686 (2003); Lundquist, P.M. et al. "Parallel confocal detection of single molecules in real time." Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008); Korlach, J. et al. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures." Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008), bunların açıklamaları, bütünüyle referans yoluyla burada dahil edilir.

Açıklanan yöntemler ve bileşimlere yönelik kullanılabilen, bunlar ile bağlantılı olarak kullanılabilen, bunları hazırlamada kullanılabilen veya bunların ürünleri olan materyaller, bileşimler ve bileşenler açıklanır. Bu ve diğer materyaller burada açıklanır ve her bir çeşitli ayrı ve kolektif kombinasyonların spesifik referansı ve permütasyonu belirgin şekilde açıklanamazken bu materyallerin kombinasyonları, alt kümeleri, etkileşimleri, grupları, vb.'nin açıklanması durumunda her birinin spesifik burada tasarlandığı ve açıklandığı anlaşılır. Örneğin bir yöntemin açıklanması ve tartışılması ve yöntem adımlarına yapılabilen birçok modifikasyonun tartışılması halinde yöntem adımlarının her biri ve her kombinasyon ve permütasyonu, spesifik olarak aksi belirtilmedikçe spesifik olarak tasarlanır. Benzer şekilde bunların herhangi bir alt kümesi veya kombinasyonu ayrıca spesifik olarak tasarlanır ve açıklanır. Bu bağlam, bu tarifnamenin tüm açıları için geçerlidir. Dolayısıyla, gerçekleştirilebilen çeşitli ilave adımların var olması halinde bu ilave adımların her birinin, herhangi bir spesifik yöntem adımı ile veya açıklanan yöntemlerin yöntem adımlarının kombinasyonu ile gerçekleştirilebildiği ve bu tür her bir kombinasyonun veya kombinasyonların alt kümesinin spesifik olarak tasarlandığı ve açıklanmış olarak düşünülmesi gerektiği anlaşılır.

Bu başvuru boyunca çeşitli yayımlar referans alınır. Bütünüyle bu yayımların açıklamaları burada, bu başvuruya referans yoluyla dahil edilir.

Birçok düzenleme açıklanmıştır. Buna rağmen çeşitli modifikasyonların yapılabildiği anlaşılacaktır. Buna uygun olarak diğer düzenlemeler, aşağıdaki istemlerin kapsamı dahilindedir.

ÖRNEKLER

Örnek 1. Bir DNA:RNA dubleksinin bir etiketlenme reaksiyonunu kullanan RNA dizilemesi

Bir P7' uyarlı RNA transkripti ile örnek niteliğindeki bir deney gerçekleştirilmiştir, bunun şeması Şekil 4'te ana hatlarıyla çizilir. RNA transkriptleri, imalatçının protokolü takip edilerek Promega (Madison, WI) tarafından Riboprobe® *In vitro* Transkripsiyon Sistem kiti konteyner Yeşil Floresan Proteinini (GFP) içeren bir plazmitten oluşturulmuştur.

GFP ifade kaset dizisi, aşağıda (SEQ ID NO:3) gösterilir.

[illegible]

pMA-T bazlı plazmit, P5 (altı çizili), bir T7 polimeraz promotör (kalın yazı tipi halinde), bir başlangıç kodonu (kalın yazı tipi ve italik halinde), bir His etiketi (italik halde ve altı çizili), bir FLAG etiketi (büyük harfler halinde), GFP dizisi, bir TAA durdurma kodonu (altı çizili ve koyu yazı tipi halinde), bir T7 sonlandırıcısı (koyu yazı tipi, italik halinde ve altı çizili) ve P7''yi (büyük harfler ve koyu yazı tipi halinde) içerir.

RNA transkripti, promotör diziden T7 sonlandırma dizisine doğru uzanmalıdır. Ancak T7 sonlandırıcısı, transkripsiyonu tamamen durdurmaz ve böylece ortaya çıkan RNA transkriptlerinden bazıları His FLAG GFP P7' olur. RNA

transkripti, aksi takdirde kümeleri oluşturacak DNA'yı çıkarmak üzere DNaz ile muamele edilmiştir. DNaz muamelesinin etkili olduğunu kontrol etmek amacıyla bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir ve DNaz muamelesinin DNA'yı çıkarmada etkili olduğunu kanıtlamak üzere bir jel üzerinde analiz edilmiştir. Hiçbir kalıntı DNA (diğer bir deyişle plazmit), RNA transkriptinin DNaz muamelesinden sonra görünür olmamıştır (Şekil 5).

Bir PhiX DNA kütüphanesi ve DNaz muameleli GFP-P7' RNA transkriptleri, şablon melezlemeye yönelik standart küme protokolü takip edilecek bir akış hücresinin farklı şeritleri üzerine melezlenmiştir. Şeritler 1-4, Phix DNA'yı içermiştir ve şeritler 5-8, GFP RNA'yı içermiştir. Şeritler 5 ve 6, DNA'yı çıkarmak üzere DNaz ile önceden muamele edilen RNA'yı içermiştir. Şeritler 7 ve 8, DNaz ile önceden muamele edilen ve bir ilave kontrol olarak akış hücresi üzerinde RNaz ile muamele edilen RNA'yı içermiştir. PhiX DNA kütüphanesi, iki dizi olarak P5 veya P7 vasıtasıyla melezlenebilir ve bunların tamamlayıcıları, şablonda mevcuttur. Bunun aksine GFP-P7' RNA şablonları, 'sadece iplikliliklerinden' ve bir P5 dizinin eksikliğinden dolayı P7 yüzey primerlerine melezlenir.

Birinci uzatma, Kuş Miyeloblastoz Virüs Ters Transkriptazı (AMV-RT) (Şeritler 2, 4, 6 ve 8) veya Phusion DNA polimeraz (Şeritler 1, 3, 5 ve 7) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Phusion sadece, bir DNA şablonundan bir DNA ipliğini oluşturabilirken AMV-RT, bir RNA veya DNA şablonundan bir cDNA ipliğini oluşturabilir.

Bazı şeritler, transpozon dizi P5 adaptör dizisini (Şeritler 3-8) içeren bir transpozom bileşiği kullanılarak transpoze edilmiştir. Transpozisyon olayından sonra bırakılan DNA dizisindeki boşluklar, Bst DNA polimerazını içeren bir iplik yerdeğişim uzatma reaksiyonu kullanılarak doldurulmuştur. Transpozisyon olayına, kümeleri yapabilen bir şablonu oluşturmak üzere P5 adaptörü eklemek için GFP_P7' RNA'yı içeren şeritlerde gerek duyulur. İzotermal küme

amplifikasyonu, standart ve SYBR Yeşili ile boyanan kümeler olarak gerçekleştirilmiştir. Kümelerin resimleri, Şekil 6'da gösterilir.

Şerit 1, PHUSION DNA Polimerazı ile uzatılan standart formatlı bir DNA numunesini içermesi nedeniyle küme oluşturmaya yönelik bir kontrol olmuştur. Başarılı küme oluşturma, Şekil 6'da gösterildiği üzere sonuçlanmıştır.

Şerit 2, DNA şablonlarının, bir ters transkriptaz (bir DNA:DNA dubleksini oluşturularak) yoluyla başarılı şekilde uzatılabildiğini ve standart koşullar altında kümeleri yapabildiğini göstermiştir (Şekil 6).

Şeritler 3 ve 4, DNA:DNA dublekslerinin (PHUSION DNA Polimeraz veya AMV-RT ile uzatılmıştır), bir Tn5 adaptörü ile etiketlenebildiğini ve kümeler oluşturabildiğini göstermiştir (Şekil 6).

Şerit 5'in, PHUSION DNA Polimerazının karşıt bir RNA ipliğini uzatmadığının rapor edilmesi nedeniyle kümeleri oluşturma beklenmeyecektir. Küçük miktarda küme, DNaz muamelesine rağmen RNA'yı oluşturmak üzere kullanılan kalıntı DNA şablonundan veya RNA'ya karşı DNA'nın PHUSION DNA Polimerazı ile bir dereceye kadar uzatmadan olayı gözlemlenebilir (Şekil 6).

Şeritler 7 ve 8'in, şablonların muamele edilen RNaz ve DNaz olması nedeniyle herhangi bir küme oluşumu sergilemesi beklenmeyecektir. Şerit 5'te görüldüğü üzere küçük miktarda küme, DNaz muamelesine rağmen RNA'yı oluşturmak üzere kullanılan kalıntı DNA şablonundan dolayı gözlemlenebilir (Şekil 6).

Şekil 6'daki şerit 6, beklendiği üzere bir RNA şablonuna karşı bir DNA ipliğinin uzatılmasını gösterir. Bu uzatılan şablonların, bir P5 dizisine sahip olmamaları nedeniyle kümeler oluşturma beklenmemiştir. Ancak bir P5 adaptörü (şerit 6'da gösterilen) ile etiketlemeden sonra bunlar kümeleri oluşturur. Şeritler 5, 7 ve 8'de küçük miktarda küme, RNA numunesi içinde düşük düzeyde bir DNA

kontaminasyonu olduğunu önerir ancak şerit 6'daki kümelerin çoğunluğunun RNA'dan oluşturulduğunu gösterir.

Akış hücresi üzerindeki kümeler akabinde dizilenmiştir. Tablo 1, dizilemenin sonuçlarını gösterir.

01370-P-0004

Tablo 1. Dizileme Kısa Açıklaması

	Şerit	Şerit	Kümeler	Kümeler	1. Döngü	20	döngüden	%PF	%Hiza	Hiza	Skoru	%Hata
		Verimi	(ham)	(PF)	Int(PF)	sonra	%yoğunluk (PF)	Kümeler	(PF)	(PF)		Oranı
												(PF)
PhiX	1	116	177455+/- 11971	161186+/- 10237	289+/-9	86.80+/-	0.97	90388+/- 1.64	98.28+/- 0.22	166.43+/- 0.00		0.04+/- 0.00
PhiX	2	78	116338+/- 3547	108649+/- 3484	282+/-8	86.4+/-	0.75	93.39+/- 0.37	98.11+/- 0.07	166.03+/- 0.11		0.05+/- 0.01
PhiX+ Tn	3	40	63725+/- 1557	55752+/- 1477	289+/-4	87.78+/-	1.13	87.49+/- 0,34	58.26+/- 0.25	96.55+0.39		0.28+/- 0.00
PhiX+ Tn	4	23	42441+/- 1497	32075+/- 1307	267+/-16	88.48+/-	1.77	75.56+/- 0.76	35.54+/- 0.63	57.81+/- 0.99		0.49+/- 0.02
RNA+ Tn	5	3	13608+/- 731	4332+/- 510	295+/-54	121.18+/-	17.78	32.00+/- 4.62	55.95+/- 15.91	49.00+/- 24.03		2.76+/- 0.37
RNA+ Tn	6	4	20916+/- 1519	5701+/- 1642	179+/-35	219.02+/-	82.12	26.98+/- 6.47	25.45+/- 8.27	19.48+/- 13.01		2.77+/- 0.70

01370-P-0004

	Şerit	Şerit	Kümeler	Kümeler	1. Döngü	20	döngüden	%PF	%Hiza	Hiza	Skoru	%Hata
		Verimi	(ham)	(PF)	Int(PF)	sonra	%yoğunluk (PF)	Kümeler	(PF)	(PF)		Oranı
												(PF)
RNA+	7	1	22597+/-	1627+/-	190+/-65	104.24+/-	35.64	7.43+/-	12.12+/-	3.69+/-2.40		3.45+/-
Tn+R			4274	317				1.99	6.14			0.83
NAz												
RNA+	8	1	45904+/-	1033+/-	178+/-22	108.42+/-	12.14	2.26+/-	41.32+/-	46.18+/-		1.47+/-
Tn+R			10022	156				0.35	9.19	19.94		0.72
NAz												

Şeritler 1, 3, 5 ve 7, RNA'yı güçlendirdiği varsayılmaksızın Phusion ile güçlendirilmiştir.

Şeritler 2, 4, 6 , ve 8, RNA'yı ve DNA'yı güçlendiren AMV- RT ile güçlendirilmiştir. Nx R1 primeri ile transpoze şeritler 3-8 için SBS3+T ile transpoze edilmeyen şeritler 1 ve 2'ye yönelik dizileme. Matriks ve ayarlanan fazlama, GFP'ye hizalanan şeritler 5-8.

Beklendiği üzere %90'dan fazla küme, şerit 1 ve 2'ye yönelik saflık filtrelerini geçmiştir ve bunların %98'den fazlası, beklendiği üzere PhiX'e hizalanmıştır (Tablo 1). Etiketli DNA:DNA dublekslerini içeren şeritler 3 ve 4, filtreyi geçen kümelerde %10-20'lik bir azalma sergilemiştir, bunların %75-87 arasındaki kümeleri, PhiX'e hizalanmıştır. Etiketlemenin, bir şablonun uzunluğunu azaltabildiği göz önünde bulundurulduğunda etkili bir şekilde hizalamak üzere çok kısa bir uzunluğa kadar filtreleri geçen ve hizalanan küme içindeki bir azalma beklenmez. Şeritler 7 ve 8'de kümeler, mevcut herhangi bir şablonunun (DNA şablonlarının veya sindirilmemiş RNA köklerinin kontamine edilmesi hariç olmak üzere) bulunmaması gerektiği için dizilenmemelidir. Beklendiği üzere oldukça az miktarda küme filtrelerden geçmiştir: kümelerin %7'sinden daha azı, sadece %12'sinin PHUSION DNA Polimeraz uzatılmış şablonlara yönelik hizalandı ve %41'nin AMV-RT uzatılmış şablonlara yönelik hizalandığı filtrelerden geçmiştir. Hiçbir RNAz muamelesi yapılmadığında sadece DNaz ve kümelerin Phusion %32'si ile uzatılan RNA, %56+/-16'sının hizalandığı filtreleri geçmiştir (Şerit 5, Tablo 1). Bu, kalıntı DNA şablonlarının ve PHUSION DNA Polimerazı ile RNA'ya karşı DNA'nın bir miktar uzantısının bir kombinasyonundan kaynaklanabilir. Bunun aksine yaklaşık olarak %50 daha fazla küme, şerit 6'da gözlemlenmiştir, burada DNaz muameleli RNA şablonu, AMV-RT ile uzatılmıştır ve bunun benzer bir %'si (~%27), %25 hizalama ile şerit 6'ya kadar fitreden geçirilmiştir.

Hizalanan veri, kapsam grafiklerini oluşturmak üzere kullanılmıştır (Şekil 7). Şeritler 1-4, beklendiği üzere PhiX'in tam genom kapsamını vermiştir.

Etiketlenen DNA'yı içeren şeritler (şeritler 3 ve 4), daha eşit olmayan kapsamı vermiştir. Etiketli RNA numunelerini içeren şeritler 5-8'in hepsi, şablonun etiketlenmesinin kümeleri oluşturduğunu göstererek GFP'nin kısmi kapsamını göstermiştir. Bunun bir miktarının, kalıntı DNA şablonundan türeyebildiği göz önünde bulundurulduğunda şerit 6, AMV-RT uzatılmış RNA moleküllerinin başarılı şekilde etiketlendiğini göstererek GFP şablonunun en geniş kapsamını gösterir.

Örnek 2. İnsan numunelerinin bir etiketleme reaksiyonunu kullanan RNA dizilemesi.

Aşağıdaki gibi bir poliA kuyruğunu içeren RNA moleküllerini melezleyebilen primerleri içeren sekiz şerit ile bir akış hücresi hazırlanmıştır. Şerit 1, sadece P5 ve P7 oligolarını içeren standart bir oligo karışımı ile aşılanmıştır ve şeritler 2-8, standart karışım (P5 ve P7 oligoları) artı yakalama oligoları (diğer bir deyişle, bir poliA kuyruğunu içeren RNA moleküllerine bağlanmaya yönelik bir poliT dizisini içeren primer) ile aşılanmıştır. Primer aşılama sonrası akış hücresi, kullanılabilecek kadar 4°C'de saklanmıştır.

Şeritler 1 ve 2'ye yönelik 5 pM PhiX kontrol kütüphane numuneleri hazırlanmıştır ve melezlemeye yönelik akış hücresine eklenmiştir. Her bir şerit 3-8'e yönelik 400ng RNA numunesi hazırlanmıştır ve melezlemeye yönelik akış hücresine eklenmiştir. Şeritler 3 ve 4, Clontech tarafından (Mountain View, CA) insan RNA'sını içermiştir. Şeritler 5 ve 6, beyinden insan RNA'sını içermiştir. Şeritler 7 ve 8, evrensel insan referans (UHR) RNA'sını içermiştir. Şablon melezlemeden sonra yıkama tamponu, melezlenmeyen şablonun çıkarılmasına yönelik akış hücresi aracılığıyla uygulanmıştır. Melezlenen şablonlar, şeritler 3-8'de DNA:RNA dublekslerini üreten tüm şeritlerde AMV-RT (NEB, Ipswich, MA) kullanılarak uzatılmıştır.

Şeritler 3-8, bir transpozom bileşiği ile temas ettirildiğinde şeritler 1 ve 2, yıkama

tamponunun eşdeğer hacmi ile temas ettirilmiştir. İki farklı konsantrasyonun transpozom bileşik karışımları hazırlanmıştır. Şeritler 3, 5 ve 7'nin karışımı, 1.25µl transpozom bileşiği, 100µl tampon ve 400µl su ile hazırlanmıştır. Şeritler 4, 6 ve 8'in karışımı, 0.625µl transpozom bileşiği, 100µl tampon ve 400µl su ile hazırlanmıştır. 95µl transpozom bileşik karışımları, etiketlemeye yönelik akış hücresinin şeritleri 3-8'e eklenmiştir. Etiketlemeden sonra transposazı çıkarmak üzere kaotropik tampon, akış hücresinin şeritleri 3-8'e eklenmiştir ve 2 dakika inkübe edilmiştir. Akış hücresinin şeritleri akabinde iki kez yıkanmıştır. Yıkamadan sonra Bst enzimleri, transpozonun aktarılmamış ipliğini çıkarmak ve kümelemeye yönelik DNA:RNA dubleksleri tam uzunluğuna sahip DNA ipliğini oluşturmak üzere etiketlenen DNA:RNA dublekslerinin iplik yerdeğişim uzatmasına yönelik olarak kullanılmıştır. RNA ipliği çıkarılmıştır ve kümeler akabide, izotermal amplifikasyon kullanılarak oluşturulmuştur. Kümeler akabinde dizilenmiştir. Tablo 2, dizilemenin sonuçlarını gösterir.

Tablo 2. Dizileme Kısa Açıklaması

Şerit	Numune	Kümeler (ham)	Kümeler (PF)	1. Döngü 20 Int (PF)	gözden 20 % sonra (PF)	%PF Kümeler	% (PF)	Hiza Oranı	% (PF)	Hata
1	PhiX DNA 2 primeri	73569+/- 8007	68422+/- 7981	284+/-13	87.51+/-2.89	92.94+/- 0.77	97.99+/- 0.23	0.06+/-0.00		
2	PhiX DNA 3 primeri	18553+/- 2932	11200+/- 2451	206+/-10	99.83+/-6.39	60.00+/- 4.34	1.55+/- 1.36	8.78+/-1.60		
3	Clontech 1x Tn5	187046+/- 29545	164971+/- 26054	209+/-13	85.35+/-2.94	88.23+/- 1.30	73.27+/- 0.46	0.30+/-0.00		
4	Clontech 0.5x Tn5	109889+/- 13109	99558+/- 13108	211+/-10	87.58+/-4.32	90.49+/- 1.19	73.91+/- 0.56	0.27+/-0.02		
5	Beyin 1x Tn5	226164+/- 31941	198031+/- 28192	218+/-6	84.55+/-2.36	87.55+/- 0.97	75.27+/- 0.36	0.36+/-0.20		

Şerit	Numune	Kümeler (ham)	Kümeler (PF)	1. Döngü 20 Int (PF)	gözden sonra (PF)	%PF % int Kümeler	% (PF)	Hiza Oranı	% (PF)	Hata
6	Beyin Tn5	0.5x 125939+/- 21818	113273+/- 18279	212+/-12	86.85+/-3.09	90.06+/- 1.20	75.91+/- 0.13	0.24+/-0.00		
7	UHR 1x Tn5	310276+/- 21976	269047+/- 17778	195+/-7	86.77+/-2.14	86.75+/- 1.68	67.70+/- 0.38	0.27+/-0.04		
8	UHR Tn5	0.5x 195323+/- 16530	172838+/- 15327	211+/-16	86.70+/-1.77	86.47+/- 0.67	68.14+/- 0.52	0.36+/-0.30		

Dizileme sonuçları, standart Illumina dizilime reaktifleri kullanılarak standart Illumina dizileme yöntemlerine göre gerçekleştirilen insan beyin RNA'sı ve evrensel insan referans RNA'sının standart RNA dizilemesine yönelik elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bu tür yöntemler, TruSeq RNA Numune Hazırlama Kılavuzunda ve HiSeq2000 Kullanıcı Kılavuzunda açıklanır. Kılavuzlar ve reaktifler, Illumina, Inc. (San Diego, CA) tarafından elde edilebilir. Sonuçlar Tablo 3'te gösterilir.

01370-P-0004

Tablo 3. Standart RNA Dizileme Yöntemi ile Etiketleme Yönteminin Karşılaştırılması

	Clontech RNA'sı			UHR RNA'sı			Beyin RNA'sı			Standart RNA Dizileme			
	Okuma1		Okuma2	Okuma1		Okuma2	Okuma1		Okuma2	UHR	UHR	Beyin	Beyin
Toplam Kümeler	16,000,000			16,000,000			16,000,000						
PFKümleri	14,113,235	%100	%100	14,008,505	%100	%100	13,957,990	%100	%100	78,895,928	%100	80,670,795	%100
kullanılabilirKümler	9,005,973	%63.8	%62.6	8,756,482	%62.5	%60.9	8,956,350	%64.2	%61.1	59,010,700	%74.8	59,821,123	%74.2
Eşlemesiz	622,294	%4.4	%2.2	600,138	%4.3	%2.7	484,158	%3.5	3.1	1,352,439	%1.7	1,503,346	%1.9
Maskeliterekrar	4,484,041	%31.8	%35.1	4,651,421	%33.2	%36.4	4,517,061	%32.4	%35.7	18,525,758	%23.5	19,342,556	%24
Kullanılabilirrekteri	9,058	%0.1	%4.9	6,427	%0	%3.3	22,719	%0.2	%7.0	9,357,715	%11.9	6,959,693	%8.6
Kullanılabilirgenom	8,996,915	%63.7	%57.8	8,750,055	%62.5	%57.6	8,933,631	%64	%54.1	49,652,985	%62.9	52,861,430	%65.5
chrM.fa	2,045,187	%14.5	%14.1	2,570,314	%18.3	%17.9	737,706	%5.3	%5.3	5,710,330	%7.2	10,414,460	%12.9
humRibosomal.fa	9,409	%0.1	%0.1	7,248	%0.1	%0.1	8,839	%0.1	%0.1	1,789,882	%2.3	2,349,250	%2.9

Sonuçlar, burada sağlanan etiketleme yöntemi kullanılarak dizilenen RNA numunelerine yönelik normal hizalama dağılımını gösterir. Sonuçlar, muhtemelen etiketleme yöntemi ile analiz edilen RNA numunelerinin 3' UTR bölgelerinde daha yüksek sayıda poliA dizisi ve daha fazla tekrardan dolayı daha yüksek tekrar maskeli kümeleri göstermiştir. Kullanılabilir okumalar, tekrar muhtemelen analiz edilen RNA'da daha fazla tekrardan dolayı standart RNA dizileme protokolüne yönelik yaklaşık %10 daha düşük olmuştur. Ribozomal RNA'nın miktarı, mRNA'nın izole edilmesi ve burada sağlanan etiketleme yönteminde dizilenmesi nedeniyle beklendiğinden düşüktür. Mitokondriyal RNA, normal sınırlar dahilindedir.

Örnek 3. Bir etiketleme reaksiyonu ve bir hücre lizatını kullanan RNA dizileme

Bu örnek, nükleik asit şablonlarının ham bir hücre lizatı kullanılarak katı bir destek üzerinde yakalanabildiği, etiketlenebildiği ve dizilenebildiğini gösterir. Kısaca fare hücreleri, bir Triton-X ve Proteinaz K solüsyonu kullanılarak çözünmüştür. Lizat, bir akış hücresine uygulanmıştır, mRNA yakalanmıştır ve etiketlenmiştir ve kümeler oluşturulmuştur ve dizilenmiştir. Bir kontrol olarak ve karşılaştırmaya yönelik Evrensel İnsan Referans toplam RNA (UHR) ayrıca yakalanmıştır, etiketlenmiştir, kümelenmiştir ve dizilenmiştir. Tablo 4, her bir numune türüne yönelik kopya okumaların sonuçlarını özetler.

Tablo 4. UHR ile lizat mRNA arasında veri karşılaştırmasının dizilenmesi

	UHR		fare hücre lizatı	
	R1	R2	R1	R2
Toplam okumalar	4,726,081		1.905.434	
%PF	%86.89	%84.59	%83.94	%84.79

	UHR		fare hücre lizatı	
	R1	R2	R1	R2
hizalanan (%PH okumalarının)	%61.14	%73.97	%49.17	%68.16
hizalanmayan (%PH okumalarının)	%28.42	%12.00	%34.01	%8.45
çok miktarda (%PH okumalarının)	%10.44	%14.03	%16.82	%23.39
birleştirilmiş hizalamalar (hizalanan bazların %'si)	%0.80	%11.14	%0.62	%10.73
birleştirilmiş hizalamalar (% PF okumalarının)	0.4893	8.2435	0.3054	7.3138
insan Ribozomal	%0.21	%0.04	%3.98	%4.88
insan 5Sr	%0.01	%0.01	%0.02	%0.17
orta eklenti	135		129	
SD eklenti	67.99		66.97	
kopyalar	%41.66		%45.54	

Tablo 4, dizinin, bir ham fare hücre lizatından yakalanan mRNA'dan doğrudan elde edildiğini gösterir. Hizalanan okumaların yüzdesi, mRNA, UHR RNA numunesine (% PF okumalarından hizalanmıştır) kıyasla ham hücre lizatlarından doğrudan yakalandığında yaklaşık sadece %10 düşmüştür. Fare lizat türevli mRNA ile UHR kontrolünü karşılaştıran diğer dizileme verisi, doğru ipliğin yakalandığında ve fare lizatından UHR ve mRNA'ya yönelik olarak >%97'de hizalandığını rapor etmiştir. Ayrıca kapsam, lizattan UHR kontrolü ile mRNA arasında karşılaştırılabilir olmuştur; yaklaşık olarak %65 çevrilmemiş bölge (UTR), yaklaşık olarak %16 kodlama bölgesi; yaklaşık olarak %13 intergenik bölge ve küçük yüzdede intronik okumalar. Bu şekilde mevcut yöntemler, ham lizatlardan mRNA'yı yakalamak, etiketlemek, kümelemek ve dizilemek üzere kullanılabilir.

Örnek 4: Bütün mRNA transkriptinden bir etiketleme reaksiyonunu kullanan RNA dizileme

Bu deney, bir bütün transkripti temsil eden bir mRNA numunesinin, burada açıklanan yöntemler takip edilerek dizi bilgisini sağlamak üzere bir katı destek üzerinde yakalanabildiği ve etiketlenebildiğini göstermek için gerçekleştirilmiştir. Kısaca poliA RNA bakımından zenginleştirme, PoliA Purist Kit (Ambion) kullanılarak 50ug UHR toplam RNA'dan (Agilent) gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirilen poliA mRNA'nın RNA parçalanması, 100ng poliA RNA ile 25 ul 1X T4 PNK Tamponu (Epicentre) içinde gerçekleştirilmiştir, burada numune, 5 dakika 95°C'de ısıtılmıştır ve buz üzerinde soğutulmuştur. Parçalanmış RNA, T4 PNK ile fosforilatlanmıştır ve parçalar, 2 mM ATP'yi (Epicentre) içeren 50ul 2X PoliA polimeraz tamponu içinde E. Coli PoliA polimerazın 4 birimi kullanılarak kuyruklu poliA olmuştur. Polidenile parçalanmış mRNA, RNA Clean and Concentration kiti (Zymo Research) kullanılarak saflaştırılmıştır. Kontroller, dizileme kimya performansını ve karmaşık toplam RNA UHR havuzundan yakalanan mRNA bütün transkripti ile karşılaştırmak üzere yakalanan ve etiketlenen poliadenile numuneden türetilen toplam olmayan bir mRNA'yı onaylamak üzere bir PhiX kontrolünü içermiştir.

2'sinden kopya 1'inden (R1) dizileme verisi, PhiC kontrol (ctrl), kontrol mRNA numunesi (3' yakalama) ve toplam RNA numunesinden (bütün transkript) türetilen mRNA'ya yönelik Tablo 5'te rapor edilmiştir.

01370-P-0004

Tablo 5. Bütün mRNA transkriptine yönelik dizi özeti nin kopyalanması

R1	Numune Verimi (Mb)	Kümeler (ham)	Kümeler (PF)	1. Döngü Int (PF)	20 döngüden sonra yoğunluk (PF)	% Kümeleri	PF	% Hiza (PF)	Hiza Skoru (PF)	% Hata Oranı (PF)	% >=Q30 bazlar (PF)	Ortalama Kalite Skoru (PF)
ctrl	317	7,079,810	6,343,692	268	86.78	89.6		97.89	251.82	0.15	98.35	39.12
3' yakalama	1,077	28,753,789	21,543,617	290	85.17	74.92		57.15	75.08	0.74	92.34	36.58
bütün transkript	752	19,474,750	15,040,807	323	83.03	77.23		49.85	70.27	1.63	91.89	36.51

Tablo 5, hizalanan okumaların yüzdesinin, yüksek küme oluşumu ile mRNA kaynağına (% hiza (PF)) bakılmaksızın karşılaştırılabilir olduğunu rapor eder. Ek olarak dizi verisi, kontrol mRNA'nın (3' yakalama) transkript kapsamının, yaklaşık olarak %70 UTR, %19 kodlama bölgesi akabinde intergenik ve intronik bölge kapsamı olduğunu göstermiştir. Karmaşık toplam RNA'dan türetilen mRNA'nın transkript kapsamı yaklaşık olarak %43 UTR bölgeleridir, %37 kodlama bölgeleridir ve intergenik ve intronik bölgelere oldukça benzer olmuştur. Şekil 10, temsili bir gene (GAPDH) yönelik hizalanan transkript kapsamını gösterir; kontrol mRNA (3' yakalama), beklendiği üzere ağırlıklı olarak genin 3' bölgesinde kapsamı gösterirken mRNA'dan (bütün transkript) türetilen toplam RNA'dan kapsam, egzonik ve UTR bölgelerinin daha tam kapsamını gösterir. Bu şekilde kontrol mRNA dizileri, bir transkriptin 3' ucu (poliA kuyruk bölgesi) ile ilişkilendirilen bölgelere hizalandığında toplam RNA'dan türetilen mRNA'dan kapsam, bir numuneden bütün transkript bilgisini elde etmeye yönelik yöntemlerin kullanımını göstererek daha tam bütün transkript okumalarını göstermiştir.

Alternatif bir iş akışı ayrıca, bütün transkript dizilemesine yönelik bir UHR toplam RNA numunesinden mRNA'yı zenginleştirmek üzere gerçekleştirilmiştir. Çift iplikli cDNA, 500ng UHR toplam RNA ve 50 ng rastgele DNA heksamerlerden hazırlanmıştır. Fazla primerler, Eksonükleaz I'in (Epicentre) 20 birimi eklenerek, 30 dakika 37°C'de inkübe edilerek akabinde enzim ısı inaktivasyonu yoluyla bozunmuştur. RNA, 10 dakika 55°C'de 1U RNaz I/10 U Hibridazın (RNaz H, Epicentre) bir enzim karışımı ile çıkarılmıştır. Reaksiyon, AMPure boncuklarının (Agencourt) eşit hacimleri kullanılarak saflaştırılmıştır ve DNA, bir 10mM Tris HCl (pH8.0) tamponu içinde ayrıştırılmıştır. cDNA, 20 U Terminal Transferaz (New England Biolabs), 1mM ATP ve 1X Transferaz tamponu kullanılarak, 10 dakika 37°C'de inkübe edilerek akabinde ısı inaktivasyonu yoluyla kuyruklanmış poliA olmuştur. Numunelerin bazılarına yönelik olarak rastgele DNA heksamerlerin bir 1:10 seyreltisi kullanılmıştır.

Ayrıca numunelerin bazılarına yönelik Eksonükleaz I adımı çıkarılmıştır. Numuneler akabinde, bir akış hücresine uygulanmıştır, yakalanmıştır, etiketlenmiştir, kümelenmiştir ve dizilenmiştir. Kontroller, PhiX kontrolü (ctrl), kuyruksız cDNA (kuyruksuz ctrl), bir dsDNA negatif kontrol ve rastgele RNA heksamerlerin kullanılması ve Eksonükleaz I adımının çıkarılması haricinde yukarıda açıklandığı üzere aynı yöntemi takip eden saflaştırılmış bir mRNA numunesini içermiştir.

Tablo 6, iki kopta dizileme çalışmasının birincisini kısaca açıklar.

01370-P-0004

Tablo 6. Alternatif bütün mRNA transkriptine yönelik dizi özetinin kopyalanması

R1		Verim (Mb)	Kümeler (ham)	Kümeler (PF)	1.	20	% Kümeleri	PF	% Hiza (PF)	Hiza Skoru (PF)	%	%	Ortalama
					Döngü Int (PF)	döngüden sonra yoğunluk (PF)					Hata Oranı (PF)	>=Q30 bazlar (PF)	
Şerit PhiX ctrl	1-	227	7,040,939	6,480,317	317	89.58	92.04	98.16	165.52	0.08	98.25	38.88	
Şerit Kuyruksuz ctrl	2-	3	773,384	76,281	246	84.82	9.86	0.15	0.05	5.04	42.11	20.13	
Şerit RNaz, AMP, kuyruk	3-	62	3,504,536	1,783,482	420	75.32	50.89	20.14	13.65	1.29	85.96	34.57	

01370-P-0004

Şerit 4-1:10	15	1,353,520	429,352	339	91.53	31.72	8.37	6.38	1	62.02	27.88
Şerit 5-Ekso, RNaz, AMP, kuyruk	97	4,922,187	2,774,812	373	83.4	56.37	40.74	27.62	1.47	86.68	34.8
Şerit 6-1:10	7	844,731	198,052	317	79.07	23.45	13.09	6.81	1.38	42.76	21.15
Şerit7-RNA primerleri	29	2,164,633	840,373	377	92.34	38.82	17.28	13.89	0.7	79.14	32.88
Şerit 8-ds cDNA	8	852,450	219,356	311	97.61	25.73	1.3	0.32	2.61	48.15	23.6

- Tablo 6, nükleazlar, Ekso I ve RNazlar H ve I ile akabinde boncuk saflaştırması ve poliA kuyruklama (Ekso, RNaz, AMP, kuyruk) yoluyla bir numunenin muamele edilmesinin hazırlanması yönteminin, dizilemeye yönelik bir bütün mRNA transkript numunesini sağlamak üzere kullanılabildiğini gösterir. Şekil 9, Tablo 6'da tanımlanan farklı koşullara göre akış hücresi üzerinde kümelemenin resimlerini gösterir. Tablo 1'de Şeritler 1-8, Şekil 9'daki Şeritler 1-8'e karşılık gelir. PhiX pozitif kontrol, dizileme verisinde en yüksek verime ve küme sayısına karşılık gelen çok sayıda kümeyi gösterir. Düşük sayıda kümeleri gösteren negatif kontrol şeritleri 3 ve 8) ayrıca, dizileme verisinde en düşük verimin ve küme sayımlarının üçte ikisine karşılık gelir. Hazırlama yönteminde ekzonükleaz sindirimine bakılmaksızın rastgele DNA heksamer primerlerin 1:10 oranında seyreltilmesi, Şekil 9'da görülen daha az küme ile desteklenen Tablo 6'daki düşük küme sayılarını göstererek dizilemeye yönelik optimal olmuştur. Bütün mRNA transkriptlerinin numune hazırlaması sırasında Eksonükleaz I ile RNaz H ve I kullanan yöntem, oluşturulan kümelerin en büyük sayısının yanı sıra PhiX pozitif kontrol akabinde Eksonükleaz I sindiriminin gerçekleştirilmediği hazırlama yönteminden sonra hizalanma ile sonuçlanmıştır. Ayrıca hizalanan okumaların yüzdesi (% hiza (PF), test Şeritleri arasında sırasıyla Şerit 5 ve Şerit 3'e yönelik en yüksektir. Sonuçlar, cDNA'yı oluşturmaya yönelik bu örnekte açıklanan alternatif yöntemin, bu başvuruda açıklanan yakalama ve etiketleme yöntemleri kullanılarak dizileme yoluyla bütün mRNA transkript bilgisini sağlamak üzere kullanılabildiğini gösterir.
- Numune hazırlamaya yönelik ilave opsiyonlar, bunlar ile sınırlı olmaksızın, bakteriyel mRNA gibi poliadenile RNA'ya sahip olmayan türlerden RNA'yı dizilemeye yönelik açıklanan yöntemlerin kullanılmasını içerir. Bu durumda ribozomal RNA ilk önce çıkarılabilir ve geriye kalan mRNA parçalanabilir ve önceden açıklandığı üzere kuyruklanmış poliA olabilir. mRNA akabinde, yukarıda açıklandığı üzere yakalanabilir, etiketlenebilir, kümelenebilir, güçlendirilebilir ve dizilenebilir.

Bu sonuçlar, RNA numunelerinden türetilen çeşitli farklı türden RNA numunelerinin ve DNA numunelerinin, burada sağlanan yöntemler kullanılarak dizilenebildiğini ve burada sağlanan yöntemlerin, mevcut standart RNA dizileme protokollerine yaklaşık olarak eşdeğer dizi sonuçları sağladığını gösterir.

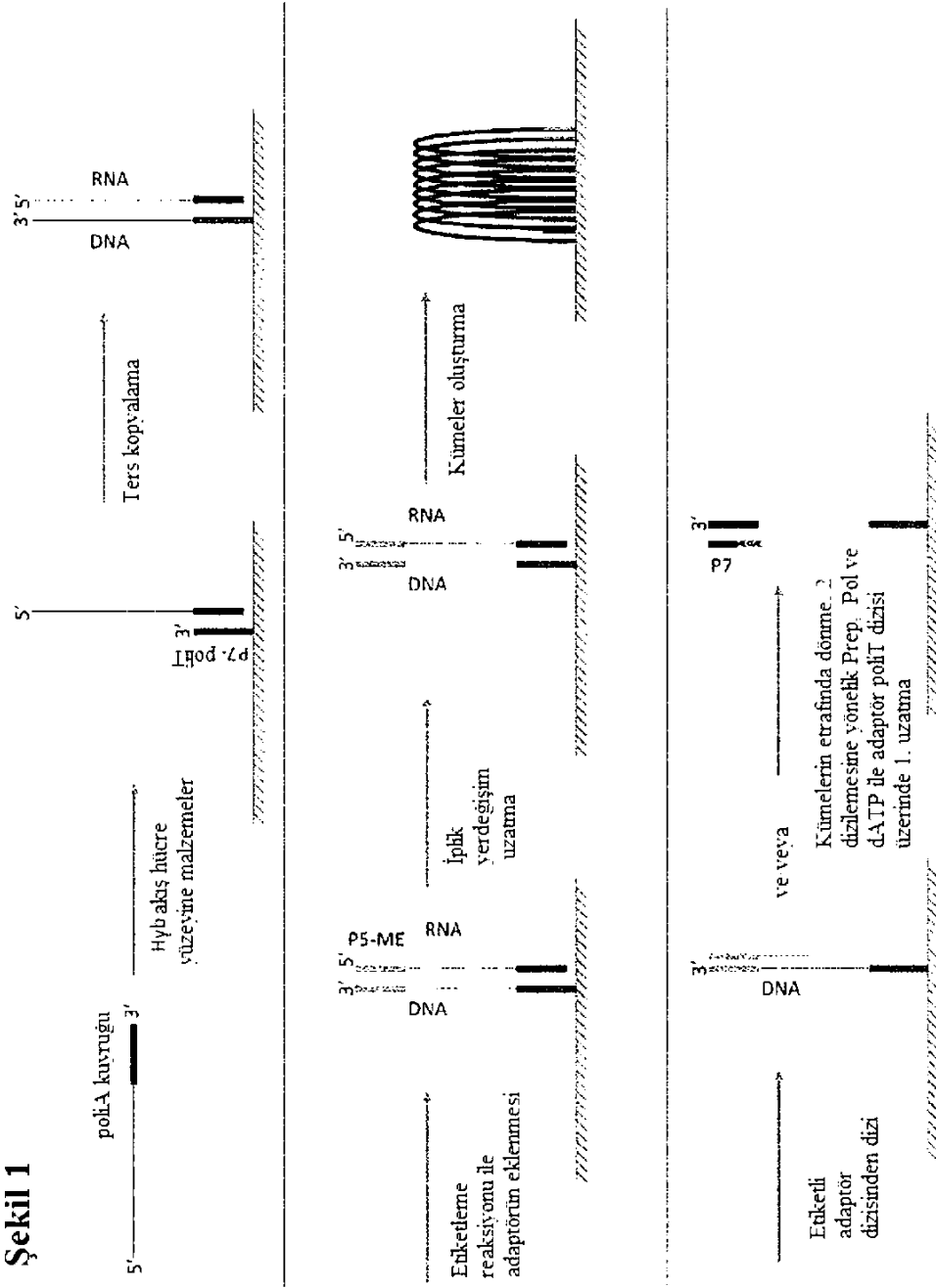
DİZİ LİSTESİ

10	<110> Illumina Cambridge Limited
	<120> Gelişmiş Nükleik Asit Dizileme Yöntemleri
	<130> TXH/74023EP2
15	<150> US61/607418
	<151> 2012-03-06
	<160> 3
20	<170> BiSSAP 1.0
	<210> 1
	<211> 19
	<212> DNA
25	<213> yapay diziler
	<220>
	<221> kaynak
	<222> 1..19
30	<223> /mol_türü="DNA" /not="transfer edilen transpozon dizisi "
	/organizma="yapay diziler"

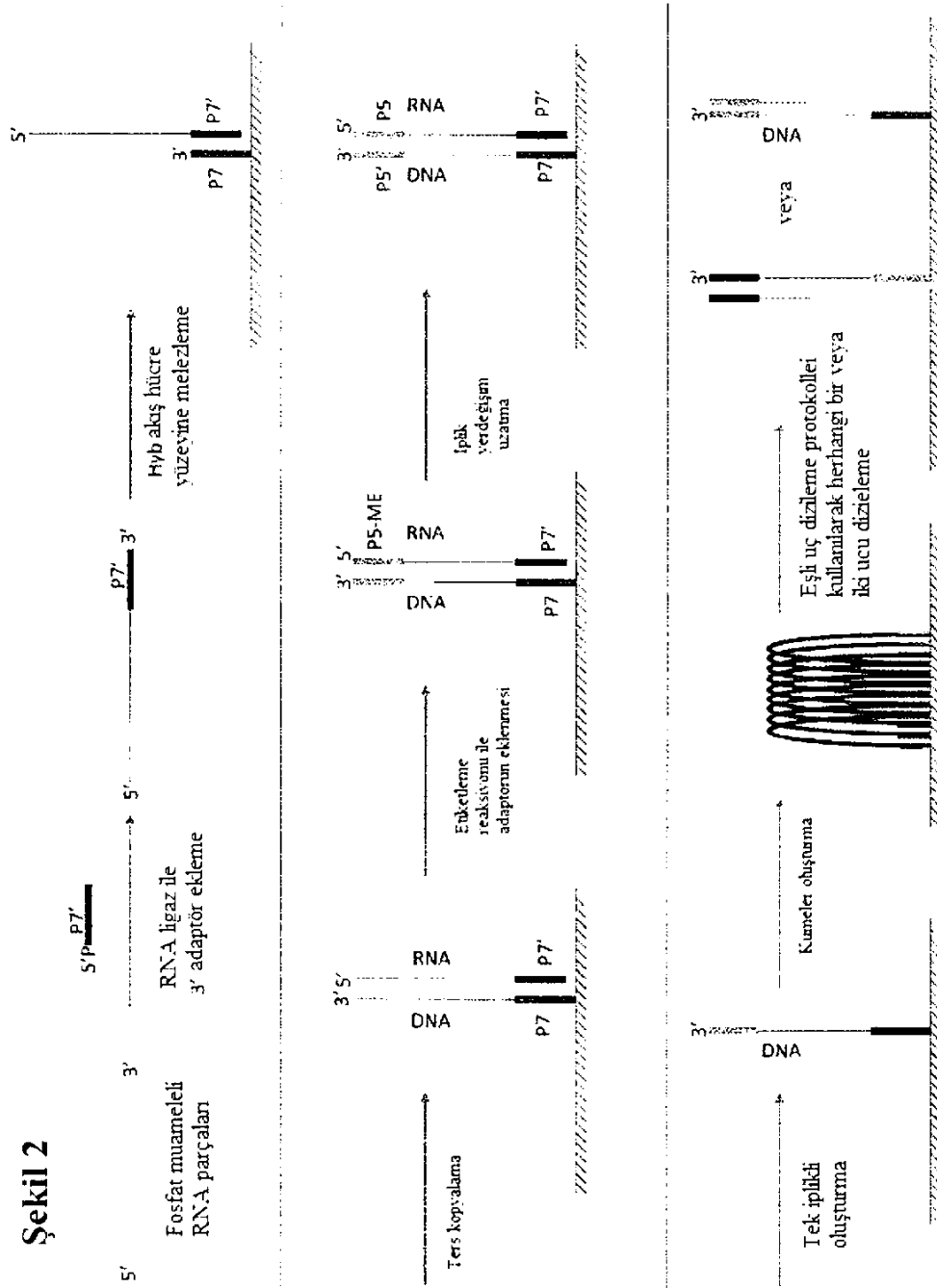
	<400> 1	
	agatgtgtat aagagacag	19
5	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> yapay diziler	
10	<220>	
	<221> kaynak	
	<222> 1..19	
	<223> /mol_türü="DNA" /not="transfer edilmeyen transpozon dizisi "	
	/organizma="yapay diziler"	
15	<400> 2	
	ctgtctctta tacacatct	19
20	<210> 3	
	<211> 1003	
	<212> DNA	
	<213> yapay diziler	
25	<220>	
	<221> kaynak	
	<222> 1..1003	
	<223> /mol_türü="DNA" /not="GFP ifade kaseti" /organizma="yapay diziler"	
	<400> 3	

aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttccctac acgacgctct tccgatctta	60
atacgantca ctataggcaa ttttaacttt actaaggaga attcaccatg aaacatcacc	120
atcaccacac gactacaaag acgatgacga caaggcgatc gtgagcaagg gcgaggagct	180
gttcaacggg gtggtgccca tcttggctga gctggaggga gacgtaaaag gccacaagtt	240
cagcgtgtcc ggcggggcga ggcgcatgcc acctacggca agctgacct gaagtctctc	300
tgcaccaccc gcaagctgcc cgtgccctgg ccacccctcg tgaccacct gaactacggc	360
gtgcagtgct taagcggcta ccgacacaa tgaagcagca cgactttctc aagtcggcga	420
tgcacgaagg ctacgtccag gacgcaccca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga	480
cccgcccgca ggtgaagttc gagggcgaa cctgggtgaac cgcacggagc tgaagggnat	540
cgacttcaag gaggacggca acctcttggg gccacaagctg gactcacact acacacgcca	600
caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacgcacca aggtgaactt caagatccgc	660
cacaacatcg aggaaggcag cgtgcagctc gccgacacat accagcagaa caacccctac	720
ggcgaacgca cctgtctct gcccgacaa cactacctga gccccagtc gccctgagca	780
aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcttcttgga gttcgtgacc gccgcgggga	840
tcaactctgg catggagag ctgtacaaat aactgctgac accgtgaga ataatagaa	900
taaccccttg ggcctctaa acqqtcttg aqqqtcttt tgaqatcga aqacqcttc	960
aggaggaatg ccgagacaga tctcgtatgc cgtctctgc ttg	1003

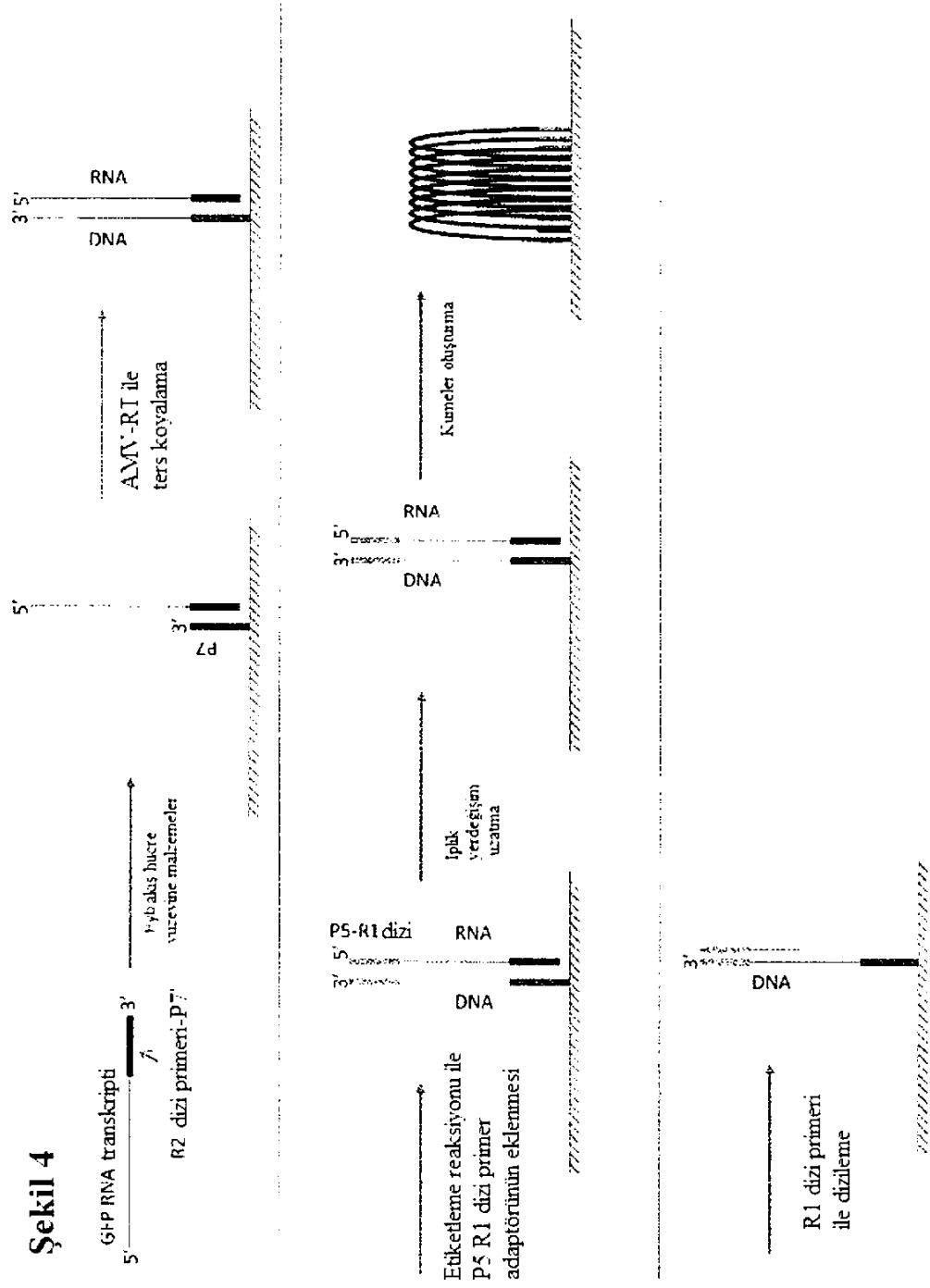
Şekil 1

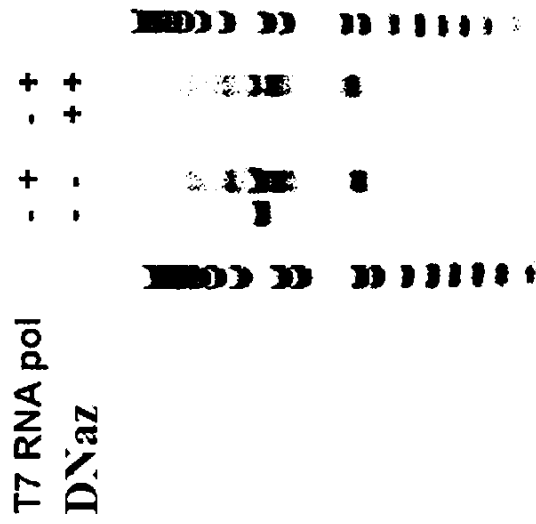


Şekil 2



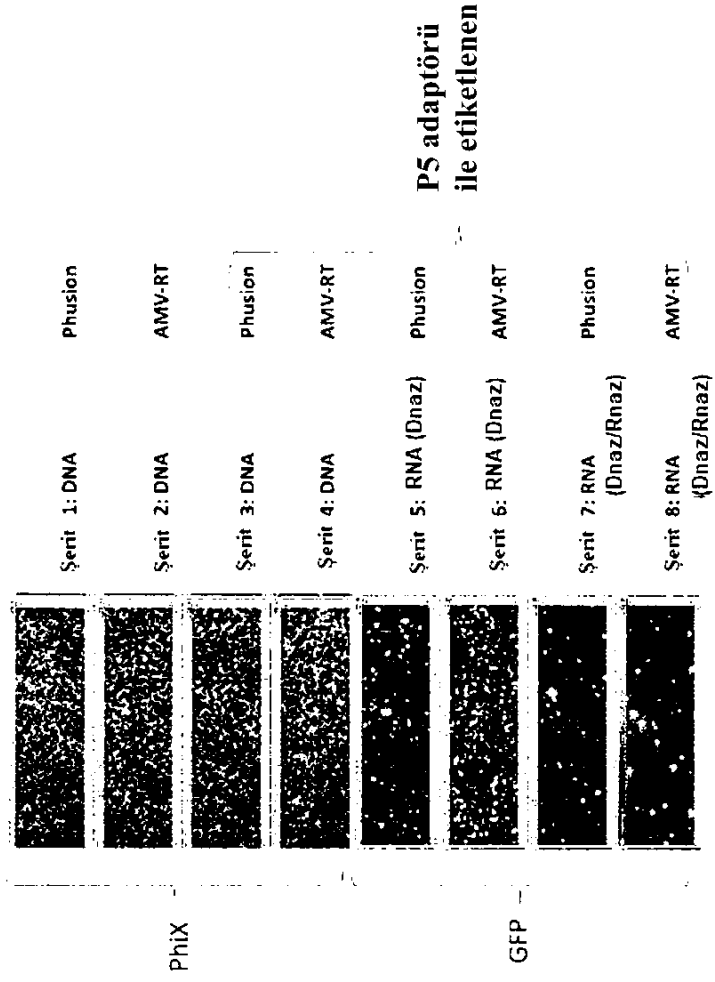
Şekil 4



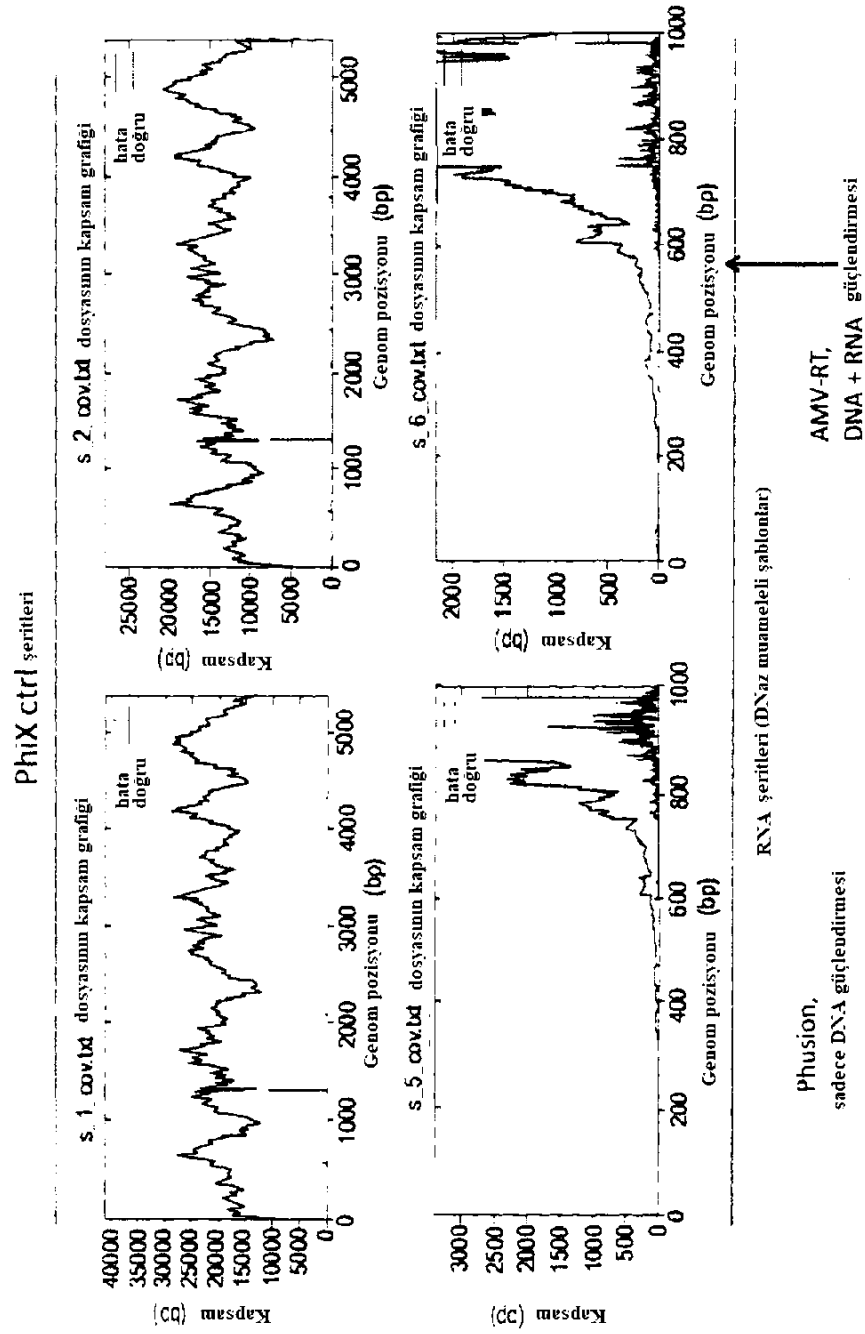


Şekil 5

Şekil 6

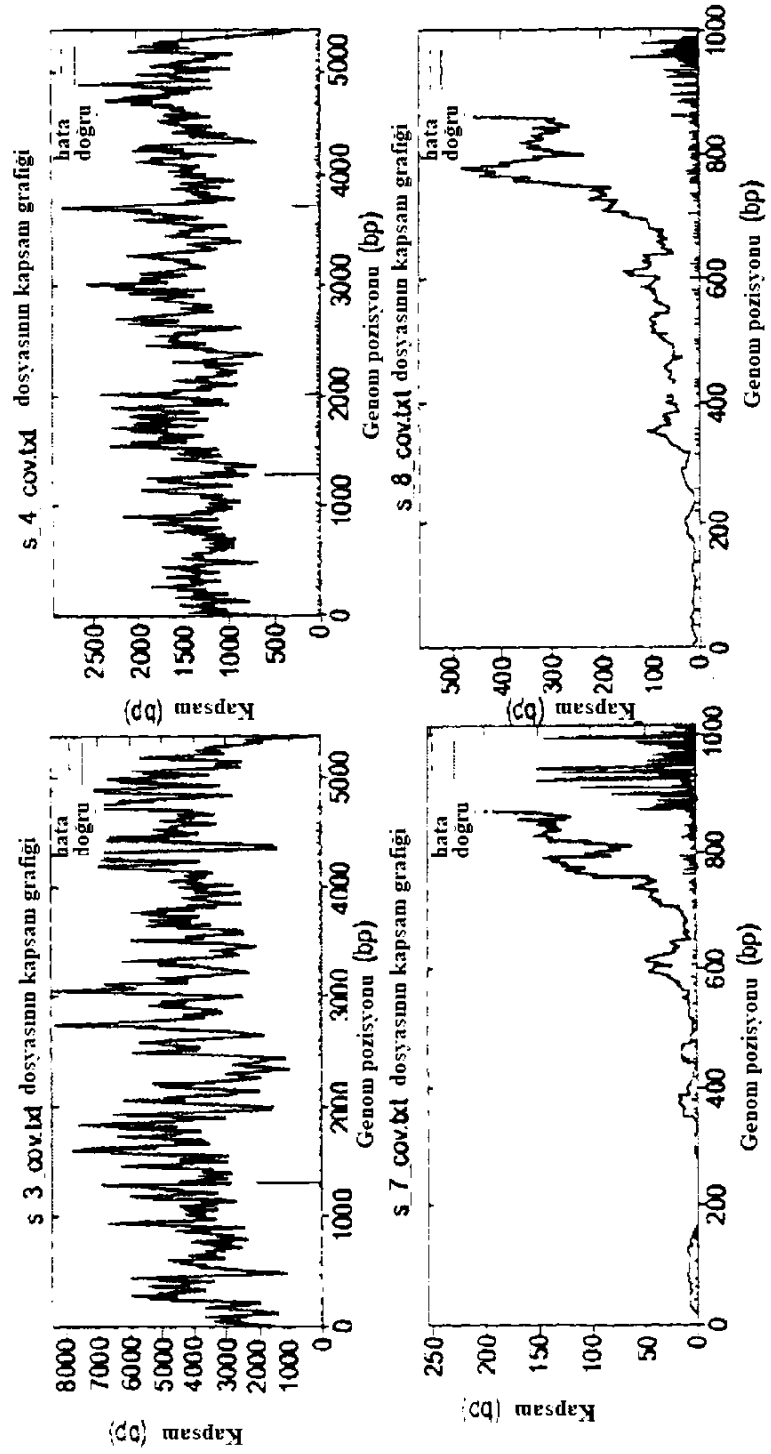


Şekil 7A



Şekil 7B

PhiX + transpozom



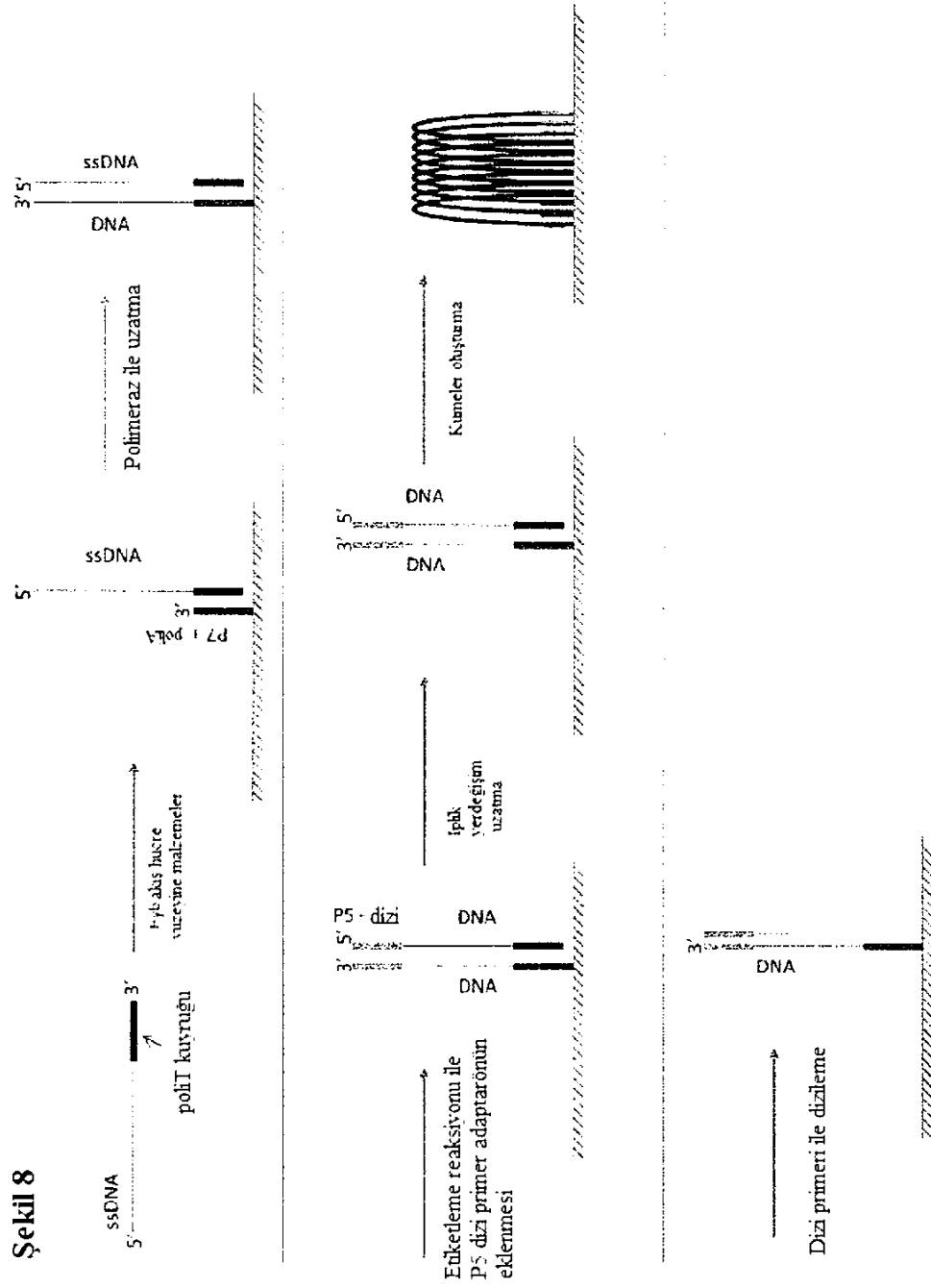
RNA şeriteleri (DNaz/Rnaz muameleli şblonlar)

Phusion

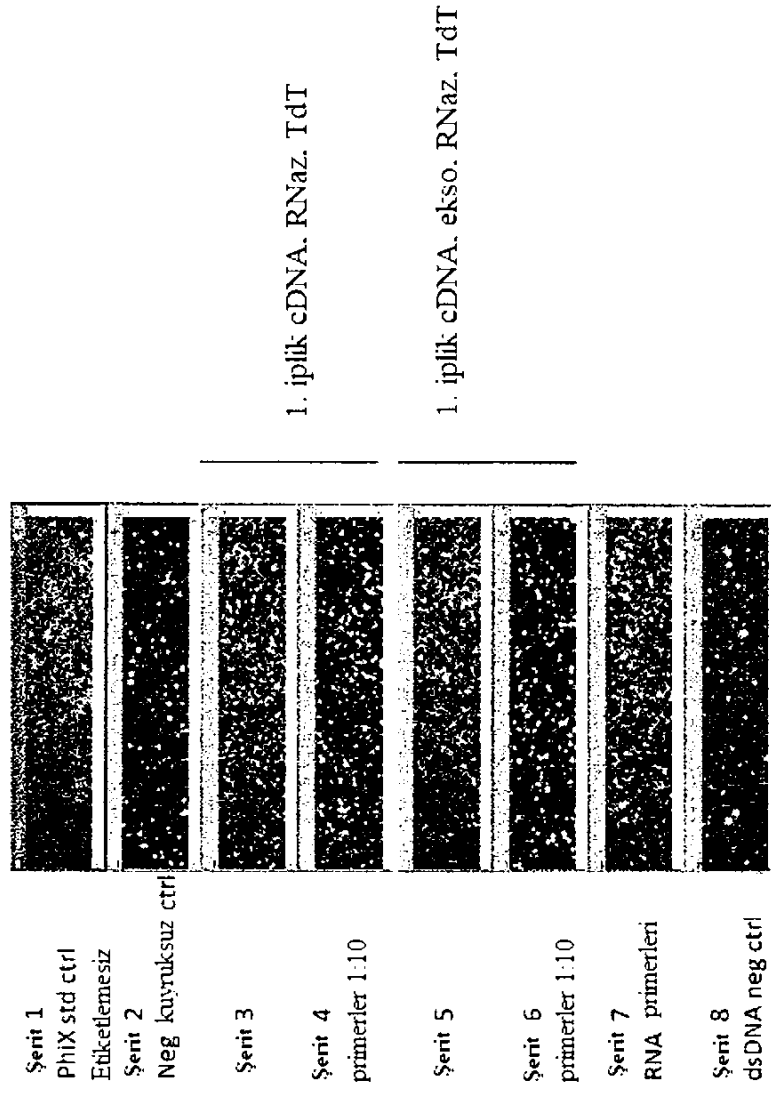
sadece geriye kalan DNA güçlendirilmesi

AMV-RT

Şekil 8



Şekil 9



Şekil 10

