

ÖZET

BAKTERİ DNA'SI İZOLASYONUNDA ÖKARYOTİK DNA'NIN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN ANTİ-HİSTON ANTİKORLARI KULLANILMASI VE KROMATİN İMMÜNO-PRESİPİTASYONU METODU

- 5 Mevcut buluş, metagenom-mikrobiyom çalışmalarında tüm genom dizilemede kullanıma uygun bir kite ve söz konusu kitin kullanıldığı bir tüm genom dizileme yöntemine ilişkindir.

İSTEMLER

1. Ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanıma uygun bir metod olup özelliği;
 - a. Örneklerin lize edilmesi ve hücre içeriğinin toplanması
- 5 b. Hücre içeriğinin manyetik veya manyetik olmayan bead'lere bağlanmış veya kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları ile temas ettirilmesiyle ökaryotik gDNA'nın immobilize anti histon antikorlarına tutundurulması
- c. Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler üzerinde veya kolon üzerinde bulunan anti histon antikorlarına bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın hücre
10 içeriğinden uzaklaştırılması
adımlarını içermesidir.
2. İstem 1'e göre bir metod olup özelliği anti histon antikorlarının h2a, h2b, h3, h4 veya h1 antikorları içerisinde seçilmesidir.
3. İstem 1'e göre bir metod olup özelliği a) adımıdaki örneğin bitki, hayvan, insan
15 dokusundan, insan-hayvan dışkısından, insan-hayvan ağız florasından, insan-hayvan derisinden veya hava, su, toprak, deniz suyu, çamur, madenler, tuzlalar, volkanlar, jeotermal kaynaklar, her türlü cismin yüzeyinden elde edilmesidir.
4. İstem 1'e göre bir metod olup özelliği d) adımıda Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler üzerinde veya kolon üzerinde bulunan anti histon antikorlarına
20 bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın uzaklaştırılmasının santrifüj yoluyla çöktürülüp ayrılarak veya filtrasyon yoluyla gerçekleştirilmesi.
5. İstem 1-4'e göre bir metod olup özelliği manyetik bead'lerin demir oksit nanopartiküller veya çekirdeğinde demir oksit nanopartikül bulunan ve üzeri silan, altın, gümüş vb ile kaplanmış parçacıklar veya süperparamanyetik polistiren
25 bead'ler içerisinde seçilmesidir.
6. İstem 1-4'e göre bir metod olup özelliği manyetik olmayan bead'lerin zirkonyum, agaroz veya silikadan elde edilmiş olmasıdır.
7. Bir canlıya ait örnekten metagenomik kütüphanesi oluşturulmasında kullanılan bir yönteme ilişkin olup özelliği;
30 i. Örneklerden hücre eldesi

- ii. Hücrelerin lize edilmesi ve hücre içeriğinin toplanması
- iii. Hücre içeriğinin manyetik veya manyetik olmayan bead'lere bağlanmış veya kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları ile temas ettirilmesiyle ökaryotik gDNA'nın immobilize anti histon antikorlarına tutundurulması
- 5 iv. Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler üzerinde veya kolon üzerinde bulunan anti histon antikorlarına bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın hücre içeriğinden uzaklaştırılması
- v. Ökaryotik gDNA'nın uzaklaştırılması sonrası elde edilen hücre içeriğinden prokaryotik genomik DNA'nın izolasyonu
- 10 vi. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması için gerekli basamakların takip edilmesi adımlarını içermesidir.
- 8. Ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanıma uygun bir kit olup özelliği;
 - I. Örnek içerisindeki hücrelerin hücre zarının parçalanmasını (hücre lizisi)
 - 15 II. Proteaz ve DNaz inhibitörlerini içeren solüsyon (2. solüsyon)
 - III. Manyetik veya manyetik olmayan bead'lere (boncuklara) bağlanmış veya bir kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları içeren solüsyon (3. solüsyon) solüsyonlarını içermesidir.
- 20 9. İstem 8'e göre bir kit olup özelliği 1. solüsyonun deterjan bazlı hücre lizis ajanı veya lizis tamponu içermesidir.
- 10. İstem 9'a göre bir kit olup özelliği deterjan bazlı hücre lizis ajanının iyonik, non-iyonik veya zwitteriyonik deterjan olmasıdır.
- 11. İstem 1-6'ya göre bir yöntemin mikrobiyom çalışmalarında kullanılması.
- 25 12. İstem 11'e göre bir kullanım olup özelliği metagenom çalışmalarında kullanılmasıdır.
- 13. İstem 11-12'ye göre bir kullanım olup özelliği ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanılmasıdır.

14. İstem 8-9'a göre bir kit olup özelliği ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanılmasıdır.

5

10

15

20

25

TARİFNAME

BAKTERİ DNA'SI İZOLASYONUNDA ÖKARYOTİK DNA'NIN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN ANTİ-HİSTON ANTİKORLARI

5 KULLANILMASI VE KROMATİN İMMÜNO-PRESİPİTASYONU METODU

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, metagenom-mikrobiyom çalışmalarında tüm genom dizilemede kullanıma uygun bir kite ve söz konusu kitin kullanıldığı bir tüm genom dizileme
10 yöntemine ilişkindir.

TEKNİĞİN BİLİNER DURUMU

Ökaryotik DNA, ilk etapta histon proteinlerinin etrafına sarılmaktadır. Bu protein–DNA kompleksleri yan yana gelerek bir yapı meydana getirirler. Bu yapı yaklaşık 11
15 nm çapında olup nükleozom olarak adlandırılmaktadır. Nükleozomlar kendi aralarında linker (bağlayıcı) DNA iplikleri ile birbirlerine bağlıdır. Linker DNA'nın uzunluğu organizmaya göre değişim göstermekte olup, insan linker DNA'sı 38-53 bp (base pair) uzunluğundadır. Nükleozomların kendi çevresinde burgulu bir biçimde sarılı yapısı sayesinde kromatinler, kromatinlerin hücre bölünmesi sırasında kısalıp
20 kalınlaşması sonucunda ise kromozomlar oluşur. Nükleozomlar, bir histon oktameri çekirdeği etrafında paketlenmiş yaklaşık 147 DNA baz çifti içerirler. Histonlar, ökaryotik kromatinde ilk düzeyde DNA paketlenmesinden sorumludurlar. Yüksek oranda artı yüklü amino asitler (lizin ve arjinin) içeren histon proteinleri eksi yüklü DNA'ya sıkıca bağlanır. Histonun beş tipi (H2A, H2B, H3, H4 ve H1) vardır ve bir
25 ökaryottan diğerine histonların moleküler yapısı çok benzerdir. Her histon oktameri, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden iki kopya içerir.

Ökaryotik konak canlıının, kendi hücrelerinin sayısından en az 10 kat daha fazla bakteri hücresi ile birlikte yaşadığı düşünülmektedir. Mikrobiyota, kelimenin tam
30 anlamıyla vücut alanımızı paylaşan komünal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmaların ekolojik topluluğunu ifade etmektedir. Mikrobiyota, konağın

metabolizma ve beslenme homeostazı, enerji harcamaları ve bağışıklık gibi çoklu fizyolojik süreçlerine katkıda bulunmaktadır. Mikrobiyom ise mikrobiyotanın sahip olduğu genetik materyalin tümünü ifade etmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, mikrobiyomun konakçının metabolik durumunda olduğu kadar, bağışıklık gelişiminde ve fonksiyonlarında da önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu fonksiyon, bağırsak lümeni ve mukozal yüzeyleri arasında küçük moleküllerin değişimi yoluyla ve sistemik dolaşımla elde edilmektedir. Konağın genomu esasen statik olmasına rağmen, sahip olduğu mikrobiyom dinamik bir seyir göstermektedir. Konak organizmanın barındırdığı mikrobik topluluklar, gelişim süreciyle birlikte, beslenmedeki değişiklikler, yolculuklar, hastalıklar, tıbbi tedaviler gibi birçok faktör nedeniyle sürekli olarak değişmektedir. Son teknolojik gelişmeler sayesinde, hayvan modellerinin ve insan popülasyonlarının mikrobiyom dinamikleri hakkında oldukça ayrıntılı çalışmalar yapılması artık mümkün olmaktadır.

Metagenomik, mikrobiyal toplulukların kültürden bağımsız genomik analizine verilen isimdir. Bu isim, istatistiksel meta-analiz kavramından (istatistiksel olarak ayrı analizleri birleştiren süreç) ve genomikten (bir organizmanın genetik materyalinin kapsamlı analizi) türetilmiştir. Metagenomik, kültüre edilemeyen ve bazı ortamlarda bulunan mikroorganizmaların % 99'undan fazlasını temsil etmesi dolayısıyla çok güçlü bir yöntemdir. Bu yaklaşım temelde iki ayrı prensibe dayanmaktadır: a) Mikrobiyal genomik DNA'da dizi benzerliğini paylaşan genlerin (Örn; 16S rRNA) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu sonrası analizi; b) Bütün genom dizi analizi yöntemi ile alınan örnek içindeki bütün canlı materyaline ait genomik DNA'ların bir bütün olarak analiz edilmesi. Burada bahsedilen a) yöntemi analiz edilen örneklerde yalnızca bakteri türlerinin ne olduğuna dair bilgi vermektedir. Bakteri türlerinin sahip olduğu genom DNA bilgisi ve genom DNA değişimlerini bu metotla analiz etmek mümkün değildir. Bir başka deyişle, bu yöntem ile bakterilerin türünü tanımlamak mümkünken, bakterilerin sahip olduğu gen havuzunu ve bu havuzdaki değişimleri incelemek mümkün değildir. Bu sebeple bakterilerin sahip olduğu genomdaki fonksiyonel analizlerin yapılması mümkün olmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, 16S rRNA dizilemesi fonksiyonel mikrobiyom araştırmalarına olanak tanımamaktadır. Burada bahsi geçen b) yöntemi ise 16s rRNA dizilemesine göre çok yüksek bir maliyete sahip olması ve yalnızca bakteri genomları değil, örneğin alındığı konak canlıının genomunun da sekanslanmasıyla üretilen verinin

%90'ından fazlasının bakteriye değil, konak canlıya ait olması ve metagenom dizilemesi sonucu konağın (yani ökaryotik canlının) genom verisinin prokaryotların genom verisinden biyoinformatik (in-siliko) metotlarla ayrıştırılmasıyla özellikle genomu bilinmeyen ökaryotik canlıların da bulunduğu örneklerden yapılan

5 çalışmalarında sorun teşkil etmesi dezavantajlarına sahiptir.

Tekniğin bilinen durumunda var olan bu yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlar metagenomik alanında bakteri genomu dizilemede kullanıma uygun yeni metotların geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

10 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş, manyetik veya manyetik olmayan bead'lere (boncuklara) bağlanmış yahut bir kolonda immobilize edilmiş antihiston antikorları içeren bir solüsyonu içeren bir kite ve söz konusu solüsyonun kullanıldığı ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılması metoduna ilişkindir.

15

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Buluş, ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanıma uygun bir metoda ilişkin olup özelliği;

- a. Örneklerin lize edilmesi ve hücre içeriğinin toplanması
- 20 b. Hücre içeriğinin manyetik veya manyetik olmayan bead'lere (boncuklara) bağlanmış veya kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları ile temas ettirilmesiyle ökaryotik gDNA'nın immobilize anti histon antikorlarına tutundurulması
- c. Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler (boncuklar) üzerinde veya kolon
- 25 üzerinde bulunan anti histon antikorlarına bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın hücre içeriğinden uzaklaştırılması

adımlarını içermektedir.

Buluşa konu olan yöntem; ökaryotik canlıların kromatin iplikçiklerinin oluşmasını sağlayan histon proteinlerinin, ökaryotik ve prokaryotik DNA'ları deneysel aşamada

30 birbirinden ayırma yöntemi olarak kullanılmasına dayanmaktadır. Buluşa konu olan yöntemde örneklerden elde edilen hücrelerin (ökaryotik ve prokaryotik)

patlatılmasından (lize edilmesinden) sonra histon proteinlerine yüksek afinite ile bağlanacak antikorlar (yani anti histon antikorları) kullanılacak ve ökaryotik hücre gDNA'larının bu immobilize edilmiş antikorlara bağlanması sağlanacaktır. İmmobilize edilmiş anti histon antikorlarına bağlanan çöktürülmesi ya da

5 ayrıştırılması ile ökaryotik DNA prokaryotik DNA'dan uzaklaştırılmış olacaktır. Böylece geride kalan prokaryotik DNA'nın dizileme analizlerinde kullanılması mümkün olacaktır.

Buluş sahiplerinin önerdiği metot ve bu metoda dayanarak hazırlanacak kit içeriği, ökaryotik genomik DNA'nın deneysel basamaklarda elimine edilmesi prensibine

10 dayanmaktadır. Bu sayede metagenom analizlerindeki mevcut uygulamaların sebep olduğu %90 civarındaki ökaryotik genomik DNA kontaminasyonunun sıfıra ya da sıfıra yakın değerlere düşürülmesi öngörülmektedir.

Burada c) adımıyla gerçekleştirilen ökaryotik gDNA'nın immobilize anti-histon antikorlarına tutundurulması işlemi inkübasyon ile gerçekleştirilmektedir.

15 Burada bahsi geçen anti histon antikorları; h2a, h2b, h3, h4 veya h1 antikorları içerisinden seçilebilir.

Bu başvuru kapsamında kullanılan "örnek" her türlü bitki ve hayvan dokusundan, insan dokusundan, insan-hayvan dışkısından, insan-hayvan ağız florasından, insan-hayvan derisinden veya hava, su, toprak, deniz suyu, çamur, madenler, tuzlalar,

20 volkanlar, jeotermal kaynaklar, her türlü cismin yüzeyinden elde edilebilir.

Başvuru kapsamından yukarıda belirtilen kaynaklardan alınan örnekler tüm dokunun izolasyonu, doku parçası izolasyonu, yüzey swabı, doku swabı, doku biyopsisi, dışkı toplama, fekal swabı, tuvalet kağıdı, rektal swab, mukozal biyopsi, intestinal mukozal lava j örnekleri ile elde edilebilir.

25 Buluşa uygun ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılması yönteminin d) adımıyla yer alan "uzaklaştırma" ifadesi Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler (boncuklar) üzerinde veya kolon üzerinde bulunan anti histon antikorlarına bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın santrifüj yoluyla çöktürülüp ayrılarak uzaklaştırılması veya filtrasyon yoluyla uzaklaştırılması

30 v.b. gibi yöntemleri ifade etmektedir.

Buluş kapsamında bahsedilen "manyetik bead" ifadesi demir oksit nanopartikülleri veya çekirdeğinde demir oksit nanopartikül bulunan ve üzeri silan, altın, gümüş vb bir

katmanla kaplanmış bead'leri veya superparamagnetik polistiren bead'leri (boncukları); örneğin Dynabead™, ifade etmektedir.

Buluş kapsamında bahsedilen “manyetik olmayan bead” ifadesi zirkonyum, agaroz, silikadan elde edilen bead'leri (boncukları) ifade etmektedir.

5 Buluş bir diğer açıdan bir canlıya ait örnekten metagenomik kütüphanesi oluşturulmasında kullanılan bir yöntemle ilişkin olup özelliği;

i. Örneklerin lize edilmesi ve hücre içeriğinin toplanması

10 ii. Hücre içeriğinin manyetik veya manyetik olmayan bead'lere (boncuklara) bağlanmış veya kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları ile temas ettirilmesiyle ökaryotik gDNA'nın immobilize anti histon antikorlarına tutundurulması

iii. Manyetik veya manyetik olmayan bead'ler (boncuklar) üzerinde veya kolon üzerinde bulunan anti histon antikorlarına bağlanarak immobilize edilen ökaryotik gDNA'nın hücre içeriğinden uzaklaştırılması

15 iv. Ökaryotik gDNA'nın uzaklaştırılması sonrası elde edilen hücre içeriğinden prokaryotik genomik DNA'nın izolasyonu

v. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması için gerekli basamakların takip edilmesi adımlarını içermesidir.

20 Burada iii) adımımda gerçekleştirilen ökaryotik gDNA'nın immobilize anti-histon antikorlarına tutundurulması işlemi inkübasyon ile gerçekleştirilmektedir.

Burada v. adımımda gerçekleştirilen hücre içeriğinden prokaryotik genomik DNA izolasyonu tekniğin bilinen durumunda var olan geleneksel yöntemlerle, örneğin fenol-kloroformun kullanıldığı organik ekstraksiyon yöntemi ya da chelex ekstraksiyonu veya ticari olarak var olan kitler aracılığıyla gerçekleştirilebilir.

25 Buluş bir diğer açıdan; ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanıma uygun bir kite ilişkin olup özelliği;

I. Örnek içerisindeki hücrelerin hücre zarının parçalanmasını (hücre lizisi) sağlayan solüsyon (1. solüsyon);

II. Proteaz ve DNaz inhibitörlerini içeren solüsyon (2. solüsyon)

30 III. Manyetik veya manyetik olmayan bead'lere (boncuklara) bağlanmış veya bir kolonda immobilize edilmiş anti histon antikorları içeren solüsyon (3. solüsyon)

solüsyonlarını içermesidir.

1. solüsyonun kullanılması ile hücre içeriği ortaya çıkacak, 2. solüsyonun kullanılması ile hücre içeriğindeki histon proteinlerinin ve prokaryotik genomik DNA'nın yapısı korunmuş olacak, üçüncü solüsyonun kullanılması ile de ökaryotik genomik DNA prokaryotik genomik DNA'dan uzaklaştırılmış olacaktır

Buluşa uygun kit içerisinde yer alan 1. solüsyonda bulunan hücre zarının parçalanmasını, yani hücre lizisini, sağlayan solüsyon deterjan bazlı hücre lizis ajanı veya lizis tamponu olabilir. Deterjan bazlı hücre lizis ajanı iyonik, non-iyonik veya zwitteriyonik deterjan olabilir. Tercihen zwitteriyonik veya non-iyonik deterjan bazlı ajanlar kullanılır. Zwitteriyonik deterjanlara örnek olarak CHAPSTM, non-iyonik deterjanlara örnek olarak Triton-XTM serisinde bulunan deterjanlar veya Tween-20TM örnek verilebilir.

Bu ürün içinde metagenom analizi için 3. solüsyonun kullanılması buluşun ana yenilik noktasını oluştururken, 2. solüsyondaki proteaz ve DNaz inhibitörlerinin bir kokteyl olarak metagenomik dizilemede kullanılacak olması da buluşa yenilik katan yönlerdendir.

Buluşa uygun 3. solüsyon içerisinde bulunan manyetik bead'ler demir oksit nanopartiküller veya çekirdeğinde demir oksit nanopartikül bulunan ve üzeri silan, altın, gümüş vb bir katmanla kaplanmış bead'ler veya superparamagnetik polistiren bead'lerden (boncukları); örneğin DynabeadTM, oluşan bir grubun içerisinde seçilir.

Buluşa uygun 3. solüsyon içerisinde bulunan manyetik olmayan bead'ler zirkonyum, agaroz veya silikadan elde edilen bead'lerden oluşan bir grubun içerisinde seçilir.

Buluşa uygun 3. solüsyon içerisinde anti histon antikorları; h2a, h2b, h3, h4 veya h1 antikorları içerisinde seçilebilir.

Buluş bir diğer açıdan, buluşa uygun kitin ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanılmasına ilişkindir.

Buluş ayrıca, buluşa uygun yöntemin mikrobiyom çalışmalarında kullanılmasına ilişkindir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun yöntem metagenom çalışmalarında kullanılır. Buluşun özellikle tercih edilen bir uygulamasında, buluşa uygun yöntem ökaryotik genomik DNA'nın prokaryotik genomik DNA'dan ayrıştırılmasında kullanılır.

Bu tarifname bağlamında içerir ifadesinin kapsar ifadesini belirtmesi amaçlanmıştır.

Teknik açıdan uygun olan yerlerde, buluşun uygulamaları birleştirilebilir.

Uygulamalar burada belirli özellikler/elemanlar içerecek şekilde açıklanmıştır.

Tarifname ayrıca esas olarak bahsi geçen özellikleri/elemanları içeren ya da bunlardan

5 meydana gelen diğer uygulamaları da kapsamaktadır.

Patentler ve başvurular ve benzeri teknik referanslar referans yolu ile bu dokümana dahil edilmiştir.

Burada spesifik olarak ve açıkça anlatılan uygulamalar tek başına ya da bir veya birkaç diğer uygulama ile birlikte bir feragatnameye esas teşkil edebilir.

10

15

20

25