

ÖZET

**YABANIL TİP VE/VEYA MUTASYONA UĞRAMIŞ BİR HEDEF DNA DİZİSİNİ TESPİT
ETMEYE YÖNELİK YÖNTEM VE KİT**

5

Mevcut buluş; (a) DNA dizilerinin her birinin, bir birinci dizi segmenti, restriksiyon endonükleaz ile kesildiği üzere genomik DNA'nın bir ikinci dizi segmenti, söz konusu birinci dizi ile, eğer mevcut ise restriksiyon endonükleazın 5' çıkıntısı birleşimini ters tamamlayıcı bir üçüncü dizi segmenti içerdiği DNA kütüphanesini sağlama; (b) birinci veya

10 ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci geri primer; birinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci ileri primer; ikinci hedef dizi antipozitif zincirin üçüncü dizi segmentinin 5' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci kısmı ve ikinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci kısmı içeren, birinci

15 kısmının uzunluğu, üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %20 ila %80 olan bir üçüncü ileri primer kullanarak PCR ile DNA dizisi kütüphanesini amplifiye etme; (c) (b) adımında amplifiye edilen DNA dizilerini tespit etme adımlarını içeren, bir mutasyonun bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi meydana getirmesi/ortadan kaldırması noktasında ayrılan, bir DNA kütüphanesinden bir birinci ve/veya bir ikinci hedef

20 DNA dizisini tespit etmeye yönelik bir yöntem ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. (a) Her biri, sırasıyla 5' ucundan 3' ucuna, 15 ila 50 nükleotidlik bir uzunluğa sahip olan bir birinci dizi segmenti, restriksiyon endonükleaz ile kesildiği üzere genomik DNA'nın bir
5 ikinci dizi segmenti, bahsedilen birinci dizi segmenti ile, eğer mevcut ise restriksiyon endonükleaz tarafından oluşturulan 5' çıkıntısı birleşimini ters tamamlayıcı bir üçüncü dizi segmenti içeren DNA dizilerinin kütüphanesini sağlama;
- (b) - en az bir birinci hedef dizi pozitif zincir veya en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir
10 birinci geri primer;
- en az bir birinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir ikinci ileri primer;
- en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin üçüncü dizi segmentinin 5' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci 5' kısmı ve en az bir birinci
15 kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci 3' kısmı içeren, birinci kısmının uzunluğu, en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %20 ila %80 olan en az bir üçüncü ileri primer
- kullanarak PCR ile DNA dizisi kütüphanesini amplifiye etme
- 20 (c) (b) adımıyla amplifiye edilen DNA dizilerini tespit etme adımlarını içeren, ikinci hedef dizideki tek bir veya çok sayıda nükleotid substitüsyonu veya delesyonu veya insersiyonunun, bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturarak, bu restriksiyon endonükleaz tarafından kesilmesi durumunda oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizisini 3' ve oluşturulan
25 restriksiyon bölgesinin bir ikinci kesilmiş ikinci hedef dizisini 5' meydana getirmesi noktasında, birinci hedef DNA dizisinin ikinci hedef DNA dizisinden ayrıldığı, bir DNA dizisi kütüphanesinden, en az bir birinci hedef DNA dizisinden ve en az bir ikinci hedef DNA dizisinden en az bir tanesini tespit etmeye yönelik bir yöntem.
- 30 2. (b) adımının, en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir dördüncü geri primer de kullandığı, istem 1'e göre yöntem.

3. DNA dizisi kütüphanesinin, deterministik restriksiyon bölgesi tüm genom amplifikasyonu ile elde edildiği, istem 1 veya istem 2'ye göre yöntem.
4. (c) adımının bir DNA dizileme yöntemi ile gerçekleştirildiği, istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre yöntem.
5. DNA dizileme yönteminin, Sanger dizileme veya sentez ile dizileme olduğu, istem 4'e göre yöntem.
- 10 6. En az bir üçüncü ileri primerin birinci kısmının uzunluğunun, bahsedilen en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %40 ila %60 olduğu, önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem.
- 15 7. En az bir üçüncü ileri primerin söz konusu ikinci kısmının baz olarak uzunluğunun, söz konusu restriksiyon endonükleazın konsensüs dizisinin, eğer mevcut ise, bu restriksiyon endonükleaz ile oluşturulan 5' çıkıntı ile farkının yarısına karşılık gelen bir minimum ile 30 bazlık bir maksimum arasında olduğu, önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem.
- 20 8. Söz konusu primerlerden en az bir tanesinin, söz konusu birinci veya ikinci hedef dizi, pozitif veya antipozitif zincirden hiç birisine hibridize olmayan 5' ucu bölgesini de içerdiği, önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem.
- 25 9. Restriksiyon endonükleazın Msel olduğu, önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem.
- 30 10. - En az bir birinci hedef dizi pozitif zincir veya en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir birinci geri primer;
- en az bir birinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir ikinci ileri primer;
- en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin üçüncü dizi segmentinin 5' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci 5' kısmı ve en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci 3' kısmı

içeren, birinci kısmının uzunluğu, en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %20 ila %80 olan en az bir üçüncü ileri primer içeren,

ikinci hedef dizideki tek bir veya çok sayıda nükleotid substitüsyonu veya delesyonu veya insersiyonunun, bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturarak,

5 restriksiyon endonükleaz tarafından kesilmesi durumunda oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizisini 3' ve oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir ikinci kesilmiş ikinci hedef dizisini 5' meydana getirmesi noktasında, birinci hedef DNA dizisinin ikinci hedef DNA dizisinden ayrıldığı, ve kütüphanenin her bir DNA dizisinin, sırasıyla 5' ucundan 3' ucuna, 15 ila 50 nükleotidlik bir uzunluğa sahip olan bir birinci dizi
10 segmenti, restriksiyon endonükleaz ile kesildiği üzere genomik DNA'nın bir ikinci dizi segmenti, bahsedilen birinci dizi segmenti ile, eğer mevcut ise restriksiyon endonükleaz tarafından oluşturulan 5' çıkıntısı birleşimini ters tamamlayıcı bir üçüncü dizi segmenti içerdiği, bir DNA dizisi kütüphanesinden, en az bir birinci hedef DNA dizisinden ve en az bir ikinci hedef DNA dizisinden en az bir tanesini tespit etmeye yönelik kit.

15

11. ALK veya EGFR veya PIK3CA mutasyonlarının teşhisinde kullanıma yönelik, istem 10'a göre kit.

20

TARİFNAME**YABANIL TİP VE/VEYA MUTASYONA UĞRAMIŞ BİR HEDEF DNA DİZİSİNİ TESPİT
ETMEYE YÖNELİK YÖNTEM VE KİT**

5

Mevcut buluş, yabancı tip bir hedef DNA dizisini ve/veya mutasyona uğramış bir hedef DNA dizisini tespit etmeye yönelik; tek bir veya çok sayıda nükleotid substütasyonu veya delesyonu veya insersiyonunun bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturması/ortadan kaldırması bakımından farklı olan bir yöntem ve bir kit ile ilgilidir.

10

Tekniğin Bilinen Durumu

Dizileme ve SNP tespiti dahil olmak üzere farklı türden genetik analizlerin yapılmasına imkan vermek amacıyla, DNA'yı amplifiye etmek için tek veya birkaç hücre üzerinde Tüm Genom Amplifikasyonu kullanılmaktadır.

15

Deterministik bir restriksiyon bölgesi (bundan sonra DRS-WGA olarak adlandırılacaktır) temelinde bölge ligasyon aracılı bir PCR (LM-PCR) yoluyla Tüm Genom Amplifikasyonu EP1109938 dokümanından bilinmektedir.

20

Tek hücrelerin amplifikasyonunda DRS-WGA'nın daha iyi olduğu (örn: Lee YS, et al: Comparison of whole genome amplification methods for further quantitative analysis with microarray-based comparative genomic hybridization. Taiwan J Obstet Gynecol. 2008, 47(1):32-41) bakınız) ve ayrıca fiksatif tedavi nedeniyle DNA degradasyonuna karşı daha toleranslı olduğu (örn: Stoecklein N.H. et al: SCOMP is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR for Global Amplification of Minute Amounts of DNA from Microdissected Archival Samples. American Journal of Pathology 2002, Vol. 161, No. 1; Arneson N. et al.: Comparison of Whole Genome Amplification methods for analysis of DNA extracted from microdissected early breast lesions in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. ISRN Oncol. 2012; 2012;710692 bakınız) görülmüştür.

30

DRS-WGA DNA kütüphaneleri, Şekil 1A'da gösterildiği gibi genel yapısı olan DNA fragmentlerini içermektedir. Şekil 1B, restriksiyon endonükleaz Msel kullanılarak DRS-

WGA ile elde edilen DNA kütüphanesi fragmentlerinin yapısına ait spesifik bir örneği göstermektedir.

5 Akış aşağı DRS-WGA mutasyon tespiti deneyleri normalde, primerleri restriksiyon endonükleaz (RE) amplikonunda tasarlayarak gerçekleştirilmektedir. DNA-WGA uniform ve dengeli amplifikasyon bakımından en iyi sonuçları verse de, söz konusu mutasyonun RE amplikonu içerisinde DRS-WGA restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturduğu veya ortadan kaldırdığı durumlarda mutasyon varlığını belirlemek için deneyleri tasarlamak zorlu olabilmektedir; bunun nedeni ise primerleri RE amplikonu 10 içerisinde tasarlamaya yönelik bilinen yolun yabancı tip ve mutasyona uğramış DNA'yı ayırt etmeye imkan vermemesidir.

Açıklama yoluyla, yukarıda bahsedilen probleme neden olan mutasyon örnekleri bundan sonra Msel restriksiyon endonükleaz restriksiyon bölgesi TTTA için gösterilmektedir, 15 bununla birlikte aynı problemler herhangi başka bir restriksiyon bölgesinde de meydana gelmektedir. Aşağıda belirtilen örneklerin mevcut buluşu sınırlandırmadığı, kör uçlu DNA fragmentlerini toplayan bir restriksiyon endonükleaz kullanan yöntemler dahil olmak üzere, DRS-WGA için diğer yöntemleri de kapsadığı anlaşılmalıdır.

20 **Vaka A. Bir mutasyon yeni bir restriksiyon bölgesi (RS) oluşturmaktadır**

Substitüsyon

25 Substitüsyon, bir (veya daha fazla) nükleotid(ler)in farklı bir nükleotidle yanlış bir şekilde değiştirildiği bir DNA mutasyonudur. Bu durum belirli DNA bölgesindeki nükleotid dizisinde bir değişime yol açmaktadır.

Substitüsyon dolayısıyla, yabancı tip (WT) DNA dizisinde RS'nin mevcut olmadığı mutasyona uğramış (M) DNA dizisinde bir RS oluşturmaktadır.

30

Tek bir baz-substütisyon örneği olarak:

	WT Dizisi	M Dizisi	Vaka
5	VTAA	TTAA	(1)
	TVAA	TTAA	(2)
	TTBA	TTAA	(3)
	TTAB	TTAA	(4)

burada V; A veya C veya G (T değil), B ise C veya G veya T'dir (A değil).

10 Delesyon

Bir DNA mutasyonu, yabanıl tip (WT) DNA dizisinde RS'nin mevcut olmadığı mutasyona uğramış (M) DNA dizisinde bir RS üreten bir (veya daha fazla) nükleotid(ler)i kaldırabilmektedir.

15

Tek veya çok sayıda (n) baz delesyonuna örnek olarak:

	WT Dizi	M Dizi	Vaka
20	T[V] _n TAA	TTAA	(5)
	TT[V] _n AA	TTAA	(6)
	TT[B] _n AA	TTAA	(7)
	TTA[B] _n A	TTAA	(8)

İnsersiyon

25

Bir DNA mutasyonu, yabanıl tip (WT) DNA dizisinde RS'nin mevcut olmadığı mutasyona uğramış (M) DNA dizisinde bir RS üreten bir (veya daha fazla) nükleotid(ler)i ekleyebilmektedir.

30 Tek bir baz insersiyonuna örnek olarak:

	WT Dizi	M Dizi	Vaka
	VTAA	[insT]TAA	(9)
	TTAB	TT[insA]AB	(10)

ve ilgili ayırt edilemez vakalar:

VTAA	T[insT]AA	(9')
TTAB	TTA[insA]B	(10')

5

Yukarıdaki mutasyonların tümü bir RS oluşturarak; yalnızca yabancı tip alel (eğer mevcut ise) doğru bir şekilde amplifiye edileceği ve dizileneceği için, mutasyon bölgesini içeren bir bölgeyi amplifiye eden primer çiftleri kullanıldığında, örneğin PCR ve Dizileme ile, mutasyonun DNA kütüphanesi fragmentinde tespit edilememesine yol açmaktadır. Bu durum Şekil 2'de, soldaki ekli resimde Vaka A olarak özetlenmiştir.

10

Vaka B. Mutasyon yabancı tip (WT) diziden restriksiyon bölgesini kaldırmaktadır

Substitüsyon

15

Substitüsyon, WT DNA dizisinde mevcut olan RS'yi kaldırabilmektedir.

	WT Dizi	M Dizi	Vaka
	TTAA	VTAA	(11)
20	TTAA	TVAA	(12)
	TTAA	TTBA	(13)
	TTAA	TTAB	(14)

Yukarıda belirtilen, M DNA dizisinin ve WT DNA dizisinin yer değiştirdiği vakalara (1)-(4) karşılık gelmektedir.

25

Delesyon

Bir DNA mutasyonu, bir RS'nin yabancı tip (WT) DNA dizisinde mevcut olduğu bir RS'yi kaldıran bir (veya daha fazla) nükleotid(ler)i kaldırabilmektedir.

30

Tek baz delesyonlarına örnek olarak:

	WT Dizi	M Dizi	Vaka
	VTTAA	V[delT]TAA	(15)
5	TTAAB	TT[delA]AB	(16)

ve ilgili ayırt edilemez vakalar:

	VTTAA	VT[delT]AA	(15')
10	TTAAB	TTA[delA]B	(16')

İnsersiyon

Bir DNA mutasyonu, bir RS'nin yabancı tip (WT) DNA dizisinde mevcut olduğu bir RS'yi kaldıran bir (veya daha fazla) nükleotid(ler)i ekleyebilmektedir.

	WT Dizi	M Dizi	Vaka
	TTAA	T[insV] _n TAA	(17)
	TTAA	TT[insV] _n AA	(18)
	TTAA	TT[insB] _n AA	(19)
20	TTAA	TTA[insB] _n A	(20)

Yukarıdaki örnekte olduğu gibi bir veya daha fazla bazın delesyonunu içeren herhangi bir (veya başka birçok) vaka bir WT dizide bulunan RS'yi kaldırarak, parçalanmamış bir diziyeye yol açmaktadır.

25 Mutasyona uğramış dizinin, mutasyon bölgesini içeren DNA dizisini amplifiye eden primer çiftlerini tasarladığı kolaylıkla tanımlanabilirken, yabancı tip alel (eğer mevcut ise) amplifiye edilme konusunda başarısızlığa uğrayarak genotip hakkında yanlış bir değerlendirme vermektedir. Bu durum Şekil 2'de, sağdaki ekli resimde Vaka B olarak özetlenmiştir.

30 Dahası, mutasyon olmadığında PCR'dan hiçbir sinyal olmayacaktır ve DRS-WGA esnasında bir yabancı tip alel çıkışı olup olmadığı veya genotipin basitçe yabancı tip olup olmadığını belirlemek imkansız hale gelecektir.

EP1350853 dokümanında restriksiyon bölgelerindeki polimorfizmleri ortaya çıkaran çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) tekniği açıklanmaktadır. Bir veya daha fazla genom arasındaki dizi polimorfizmlerini tespit etmeye yönelik yöntem, (a) nükleik asit fragmentlerinin restriksiyon endonükleazlar ile fragmente edilmesi ile elde edildiği, bir
5 başlangıç nükleik asidinden, uçları en az bir adaptör ile uyumlu olan birden çok adaptöre bağlanabilir nükleik asit fragmentleri sağlayarak; (b) adaptöre bağlı nükleik asit fragmentleri oluşturacak şekilde söz konusu nükleik asit fragmentlerinin söz konusu uçları ile söz konusu en az bir adaptör arasında bir ligasyon reaksiyonu gerçekleştirerek; (c) temelde söz konusu en az bir adaptörün nükleotid dizisini tamamlayıcı en az bir
10 amplifikasyon primeri kullanma yoluyla söz konusu adaptöre bağlı nükleik asit fragmentlerini amplifiye ederek; ve (d) söz konusu amplifiye edilmiş adaptöre bağlı nükleik asit fragmentlerinden bir nükleik asit parmak izi oluşturarak söz konusu genomlardan nükleik asit parmak izi üretilmesini; dizi polimorfizmlerinin varlığını belirleyecek şekilde amplifiye edilmiş nükleik asit fragmentlerinin varlığı veya yokluğu veya aralarındaki farklar
15 için elde edilen nükleik asit parmak izlerinin karşılaştırılmasını içermektedir.

Bununla birlikte, bu yöntem spesifik bir polimorfik bölgenin tespitine imkan vermemektedir.

Quiang Nie ve arkadaşları, bir EGFR polimorfizmi için RFLP-PCR analizini açıklamaktadır.
20 Bu teknik, polimorfizmi barındıran ilgilenilen bölgeleri amplifiye etmek üzere spesifik primer çiftlerini kullanmakta ve ardından amplifiye edilen fragmente spesifik bir restriksiyon endonükleaz uygulamaktadır.

US 6420117 B1 dokümanı, değiştirilebilir elemanlardan kaynaklanan tekrarlı
25 polimorfizmlerin tespitine yönelik bir yöntemi açıklamaktadır. Bu yöntem bir DNA parmak izi sağlamaktadır ve adaptörleri içeren birden çok restriksiyon fragmentinin sağlanmasını; bir primer çifti ile restriksiyon fragmentlerinin en azından bir kısmının amplifiye edilmesini, ki burada primer çiftine ait bir primerin nükleotid dizisi ilgilenilen bir dizinin bir kısmını tamamlayıcıdır ve bahsedilen primer çiftinin diğer primeri ise 5' ucunda adaptörün en
30 azından bir bölümüne tamamlayıcı olan bir nükleotid dizisini içermektedir; ve bir DNA parmak izi üretmek üzere amplifiye edilmiş fragmentlerin çözülmesini içermektedir.

Dolayısıyla mevcut buluşun bir amacı, DRS-WGA'nın restriksiyon endonükleazı için bir restriksiyon bölgesi varlığında yabancı tip hedef DNA dizisi ve mutasyona uğramış hedef

DNA dizisinin farklılaştığı, DRS-WGA ile elde edilen gibi bir yapıya sahip bir DNA fragmenti kütüphanesindeki yabancı tip bir hedef DNA dizisi ve/veya mutasyona uğramış bir hedef DNA dizisinin tespit edilmesine yönelik, yukarıda sıralanan problemleri basit ve verimli bir şekilde çözen bir yöntem sağlamaktır.

5

Bu amaca, istem 1'de tanımlandığı gibi bir yöntemle ilgili olduğu için mevcut buluş ile ulaşılmaktadır.

Mevcut buluşun başka bir amacı ise istem 10'da tanımlandığı gibi bir kit sağlamaktır.

10 Tanımlar

Aksi belirtilmediği sürece, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, bu buluşa ilişkin teknikte olağan bir kişinin yaygın bir şekilde anlayacağı şekilde aynı anlama gelmektedir. Mevcut buluşun uygulanması veya test edilmesinde burada açıklananlara benzer veya denk birçok yöntem ve malzeme kullanılabilir olsa da, tercih edilen yöntemler ve malzemeler aşağıda açıklanmıştır. Aksi belirtilmediği sürece, söz konusu buluş ile birlikte kullanılmak üzere burada açıklanan teknikler, teknikte olağan kişilerin iyi bildiği standart metodolojilerdir.

20 “Restriksiyon bölgesi” veya “RS” terimi ile, restriksiyon endonükleaz (veya “RE”) tarafından tanınan bir DNA molekülündeki nükleotid dizileri (tipik olarak uzunlukça 4-8 baz çifti) belirtilmektedir. Restriksiyon bölgesinde, restriksiyon endonükleaz nükleotidleri, aralarında bir fosfodiester bağ hidrolize ederek kesmektedir.

25 “mutasyona bağımlı restriksiyon bölgesi” (veya “MDRS”) terimi ile, mutasyon etkisi ile oluşturulan veya kaldırılan RS belirtilmektedir.

“kesme bölgesi” (veya “CS”) terimi ile, RE ile hidrolize edilen fosfodiester bağlarının yer aldığı restriksiyon bölgesinin dizisindeki pozisyon belirtilmektedir.

30

“mutasyona bağımlı kesme bölgesi” (veya “MDCS”) terimi ile, mutasyon etkisi ile oluşturulan veya kaldırılan CS belirtilmektedir.

“amplikon” terimi ile, PCR amplifikasyonu tarafından üretilen bir DNA bölgesi belirtilmektedir.

5 “DRS-WGA amplikonu” veya “WGA amplikonu” terimleri ile, bağlı WGA primerleri tarafından kuşatılan iki RS arasındaki bir DNA dizisini içeren, DRS-WGA sırasında amplifiye edilmiş bir DNA fragmenti belirtilmektedir.

10 “WGA PCR primeri” veya “evrensel WGA primeri” veya “adaptör” terimleri ile, DRS-WGA’daki restriksiyon enziminin faaliyeti ile oluşturulan her bir fragmente bağlı ilave oligonükleotid belirtilmektedir.

“orijinal DNA” terimi ile, DRS-WGA ile amplifikasyondan önceki genomik DNA (gDNA) belirtilmektedir.

15 “hedef dizi” ifadesi ile, orijinal DNA üzerindeki ilgilenilen bölge ifade edilmektedir.

“hedef dizi anlamlı zincir” ifadesi ile genel olarak, mRNA ile aynı diziye sahip olan ve anti anlamlı zinciri tamamlayıcı olan, 5’ – 3’ işleyen DNA zincirinin segmenti belirtilmektedir. Anlamlı zincir “pozitif zincir” olarak da ifade edilebilmektedir.

20

Basitlik bakımından, mevcut buluşta “hedef dizi pozitif zincir” (TSPS) terimi aşağıdaki anlamlarda kullanılacaktır:

25 1) artan nükleotid sayısı olan dizideki mutasyona bağımlı kesme bölgesinin 3’ tarafında mutasyonun meydana gelmesi durumunda, artan nükleotid sayısı ile genomik DNA dizisini tanımlamaktadır

2) artan nükleotid sayısı olan dizideki mutasyona bağımlı kesme bölgesinin 5’ tarafında mutasyonun meydana gelmesi durumunda, artan nükleotid sayısı ile genomik DNA dizisinin ters tamamlayıcısını tanımlamaktadır

30

Tutarlı olarak, “hedef dizi antipozitif zincir” (TSAS) terimi mevcut açıklamada aşağıdaki anlamlarda kullanılacaktır:

3) artan nükleotid sayısı olan dizideki mutasyona bağımlı kesme bölgesinin 3' tarafında mutasyonun meydana gelmesi durumunda, artan nükleotid sayısı ile genomik DNA dizisinin ters tamamlayıcısını tanımlamaktadır

5

4) artan nükleotid sayısı olan dizideki mutasyona bağımlı kesme bölgesinin 5' tarafında mutasyonun meydana gelmesi durumunda, artan nükleotid sayısı ile genomik DNA dizisini tanımlamaktadır.

“artan nükleotid sayısı” ifadesi, kromozom pozisyonuna göre numaralandırmayı belirtmektedir (UCSC Genom Tarayıcısı gibi dizi veri tabanlarında bulunan gibi).

10

“bir dizi segmentinin 5' ucu bölgesi” ifadesi ile, bahsedilen nükleotid dizilerinin lokalizasyonunun, dizi segmentinin 5' terminal ucuna doğru olduğu belirtilmektedir.

15

“bir dizi segmentinin 3' ucu bölgesi” ifadesi ile, bahsedilen nükleotid dizilerinin lokalizasyonunun, dizi segmentinin 3' terminal ucuna doğru olduğu belirtilmektedir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

20

Şekil 1A, bir mutasyona bağımlı kesme bölgesi (MDCS) kesilmediği zaman restriksiyon endonüklazı Msel kullanılarak, spesifik bir DRS-WGA ile elde edilen bir DNA kütüphanesi fragmentinin genel yapısına ait bir çizimi göstermektedir. Kısaltmalar belirtildiği gibidir: FTS = birinci hedef dizi; CS = kesme bölgesi; RS = restriksiyon bölgesi; FTSPS = birinci hedef dizi pozitif zincir; FTSAS = birinci hedef dizi antipozitif zincir; NUCL# = nükleotid sayısı (ok yönünde artmaktadır); WT = yabanıl tip; MDCS = mutasyona bağımlı kesme bölgesi.

25

30

Şekil 1B, bir mutasyona bağımlı kesme bölgesi (MDCS) yarıldığı zaman restriksiyon endonüklazı Msel kullanılarak, spesifik bir DRS-WGA ile elde edilen bir DNA kütüphanesi fragmentinin genel yapısına ait bir çizimi göstermektedir. İlave kısaltmalar belirtildiği gibidir: STS = ikinci hedef dizi; MDRS = mutasyona bağımlı restriksiyon bölgesi; M = mutasyona uğramış; STSPS = ikinci hedef dizi pozitif zincir; STSAS = ikinci hedef dizi antipozitif zincir.

Şekil 1C, birinci hedef dizi pozitif ve antipozitif zincirlerin bir çizimini ve ilgili geri ve ileri primerlerin konumunu göstermektedir. İlave kısaltmalar belirtildiği gibidir: R1 = birinci geri primer; F2 = ikinci ileri primer.

Şekil 1D, ikinci hedef dizi pozitif ve antipozitif zincirlerin bir çizimini ve ilgili geri ve ileri primerlerin konumunu göstermektedir. İlave kısaltmalar belirtildiği gibidir: F3 = üçüncü ileri primer; F31 = üçüncü ileri primerin birinci kısmı; F32 = üçüncü ileri primerin ikinci kısmı.

5 Şekil 1E, artan nükleotid sayısı ile mutasyon dizideki MDCS'nin 5' tarafında yer aldığı zaman birinci hedef dizi pozitif ve antipozitif zincirlerin bir çizimini ve ilgili geri ve ileri primerlerin konumunu göstermektedir.

Şekil 1F, artan nükleotid sayısı ile mutasyon dizideki MDCS'nin 5' tarafında yer aldığı zaman ikinci hedef dizi pozitif ve antipozitif zincirlerin bir çizimini ve ilgili geri ve ileri primerlerin konumunu göstermektedir.

10 Şekiller 1A-1F'de, kesilmemiş dizinin WT dizi, kesilmiş dizinin ise Mutant dizi olduğu duruma atıfta bulunulmuştur. Mutasyona uğramış dizinin kesilmemiş olduğu ve yabancı tip dizinin kesildiği alternatif durum, WT ile M kolayca değiştirilerek kolaylıkla elde edilebilmektedir.

15 Şekil 2, mutasyona uğramış DNA dizisindeki bir restriksiyon bölgesinin oluşturulmasını (Vaka A – soldaki ekli resim) veya çıkarılmasını (Vaka B) içeren iki durumun basitleştirilmiş bir çizimini ve geleneksel mutasyon tespit yöntemleri ile sonuçları göstermektedir.

20 Şekil 3, Örnek 1'deki wt ve mutasyona uğramış DNA için bir bivalan primer çifti ile gerçekleştirilen bir PCR amplifikasyona ait ayrılmış ürünlerin jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir. Cnt: WGA reaksiyonunun boşluğu. C-: PCR reaksiyonunun boşluğu.

25 Şekil 4A ve 4B, buluşa uygun yöntemin çalışma prensiplerinin basitleştirilmiş görünümünü göstermektedir. Şekil 4A, mutasyonun dizide bir restriksiyon bölgesi oluşturduğu durumu göstermektedir. Şekil 4B, mutasyonun dizideki restriksiyon bölgesini kaldırdığı durumu göstermektedir.

Şekil 5, evrensel WGA primere uzunluğunca %86 homolog olan, restriksiyon bölgesi dahil olmak üzere mutasyona uğramış bir spesifik 5' primer ile gerçekleştirilen bir PCR amplifikasyonuna ait ayrılmış ürünlerin bir jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir.

30 Şekil 6, Örnek 3'teki yabancı tip spesifik 5' primer ile gerçekleştirilen bir PCR amplifikasyonuna ait ayrılmış ürünlerin bir jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 7, Örnek 3'teki mutasyona uğramış spesifik 5' primer ile gerçekleştirilen bir PCR amplifikasyonuna ait ayrılmış ürünlerin bir jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 8, Örnek 3'teki bir yabancı tip alelin dizilenmesine ait bir örneği göstermektedir.

5 Şekil 9, Örnek 3'teki mutasyona uğramış bir alelin dizilenmesine ait bir örneği göstermektedir.

Şekil 10, Örnek 4'ün sonuçlarını özetleyen bir tabloyu göstermektedir.

Şekil 11, Örnek 5'teki mutasyona uğramış primer çifti ile gerçekleştirilen M ve WT münferit hücrelerin PCR amplifikasyonuna ait ayrılmış ürünlerin jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 12, Örnek 5'teki yabancı tip primer çifti ile gerçekleştirilen M ve WT münferit hücrelerin PCR amplifikasyonuna ait ayrılmış ürünlerin jel elektroforezinin bir görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 13, örnek 6'daki bir yabancı tip tek hücrenin ters zincir dizisinin bir örneğini göstermektedir.

Şekil 14, örnek 6'daki mutasyona uğramış bir tek hücrenin ters zincir dizisinin bir örneğini göstermektedir.

Şekil 15, Örnek 6'nın sonuçlarını özetleyen bir tabloyu göstermektedir.

Şekil 16, mutant PCR ürünü için pozitif bir yabancı tip hücrenin (bir lökosit) (yani, yalnız PCR ürünü için yanlış pozitif) ters zincir dizisinin bir örneğini göstermektedir, ki bunun, Örnek 6'da olduğu gibi deney ile yabancı tip olduğu onaylanmıştır.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

25 Mevcut buluşa göre bir DNA dizisi kütüphanesinden en az bir birinci hedef DNA dizisinden ve en az bir ikinci hedef DNA dizisinden en az birisinin tespit edilmesine yönelik yöntem, (a) ila (c) adımlarını içermektedir. İkinci dizideki tek bir veya çok sayıda nükleotid substitüsyonu veya delesyonu veya insersiyonunun, bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturarak, restriksiyon endonükleaz tarafından kesilmesi durumunda

30 oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir birinci kesilmiş ikinci hedef diziyi 3' ve oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir ikinci kesilmiş ikinci hedef dizisiyi 5' meydana getirmesi noktasında, birinci hedef DNA dizisi ikinci hedef DNA dizisinden ayrılmaktadır. Soldaki ekli resimde vaka A'yı gösteren Şekil 2'ye, ve Şekil 4A'ya atıfla, birinci hedef DNA dizisi yabancı tip DNA dizisine karşılık gelmekte, ikinci hedef DNA dizisi ise mutasyona uğramış

DNA dizisine karşılık gelmekteyken; sağdaki ekli resimde vaka B'yi gösteren Şekil 2'ye, ve Şekil 4B'ye atıfla, birinci hedef DNA dizisi mutasyona uğramış DNA dizisine, ikinci hedef DNA dizisi ise yabancı tip DNA dizisine karşılık gelmektedir.

- 5 (a) adımında DNA dizisi kütüphanesi sağlanmaktadır. Kütüphanenin her bir DNA dizisi, sırasıyla 5' ucundan 3' ucuna, 15 ila 50 nükleotidlik bir uzunluğa sahip olan bir birinci dizi segmenti, restriksiyon endonükleaz ile kesildiği üzere genomik DNA'nın bir ikinci dizi segmenti, bahsedilen birinci dizi segmenti ile, eğer mevcut ise RE tarafından oluşturulan 5' çıkıntısı birleşimini ters tamamlayıcı bir üçüncü dizi segmenti içermektedir. Şekil 1A'ya
- 10 atıfla, (1) sayısı birinci dizi segmentini, (2) sayısı ikinci dizi segmentini, (3) sayısı ise üçüncü dizi segmentini göstermektedir. Tercih edilen bir uygulamada söz edilen birinci dizi segmenti WGA PCR Primere karşılık gelmektedir.

Restriksiyon endonükleaz tercihen Msel'dir.

15

(b) adımında, DNA dizisi kütüphanesi aşağıdakiler kullanılarak amplifiye edilmektedir:

- en az bir birinci hedef dizi pozitif zincir veya en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir birinci geri primer;
- 20 - en az bir birinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir ikinci ileri primer;
- en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin üçüncü dizi segmentinin 5' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci 5' kısmı ve en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci 3' kısmı
- 25 içeren en az bir üçüncü ileri primer; ki burada en az bir üçüncü ileri primerin birinci kısmının uzunluğu, en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %20 ila %80'dir.
- 30 Üçüncü ileri primer bundan sonra kimi durumlarda kısaca "hibrid primer" olarak adlandırılacaktır.

Tercihen, (b) adımımda en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir dördüncü geri primer kullanılmaktadır.

- 5 Tercihen, en az bir üçüncü ileri primerin birinci kısmının uzunluğu, en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre 40 ila %60'tır.

Tercihen, en az bir üçüncü ileri primerin ikinci kısmının baz olarak uzunluğu, restriksiyon endonükleazın konsensüs dizinin, mevcut ise, restriksiyon endonükleaz ile oluşturulan 5' 10 çıkıntı ile farkının yarısına karşılık gelen bir minimum ile 30 bazlık bir maksimum arasındadır.

Şekil 4A'ya atıfla, söz edilen birinci geri primer yabancı tip geri primere (WT_R) karşılık gelmekte, ikinci ileri primer yabancı tip ileri primere (WT_F) karşılık gelmekte, üçüncü ileri 15 primer mutasyona uğramış ileri primere (M_F) karşılık gelmektedir. Bir uygulamada birinci geri primer yalnızca birinci hedef dizi pozitif zinciri değil, aynı zamanda birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zinciri de amplifiye etme görevi üstlenmektedir. Bununla birlikte, tercih edilen bir uygulamada bahsedilen birinci ters primerden farklı bir dördüncü geri primer, birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zinciri amplifiye etmek üzere 20 kullanılmaktadır. Şekil 4A'da, söz edilen dördüncü geri primer mutasyona uğramış geri primere (M_R) karşılık gelmektedir.

Aynı prensip, birinci geri primerin mutasyona uğramış geri primere (M_R) karşılık geldiği, ikinci ileri primerin mutasyona uğramış ileri primere (M_F) karşılık geldiği, üçüncü ileri 25 primerin yabancı tip ileri primere (WT_F) karşılık geldiği ve dördüncü geri primerin yabancı tip geri primere (WT_R) karşılık geldiği Şekil 4B'de de geçerlidir.

(c) adımımda, (b) adımımda amplifiye edilen DNA dizileri tespit edilmektedir. (c) adımı; örneğin jel elektroforez, kapiler elektroforez, DNA dizileme gibi teknikte bilinen birçok 30 tespit yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir. (c) adımı tercihen bir DNA dizileme yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Daha çok tercih edildiği haliyle DNA dizileme yöntemi Sanger dizileme veya sentez ile dizilemez.

Mevcut buluşun yöntemi, Şekil 1A'da gösterilen yapıya sahip herhangi bir DNA dizisi kütüphanesi ile kullanılabilir. Yöntem tercihen, deterministik restriksiyon bölgesi tüm genom amplifikasyonu ile elde edilen bir DNA dizisi kütüphanesi ile kullanılmaktadır.

- 5 Mevcut buluşa göre, yukarıda açıklandığı gibi bir birinci ve/veya biri ikinci ve/veya bir üçüncü primeri içeren bir kit de sağlanmaktadır.

Daha spesifik olarak, ikinci dizideki tek bir veya çok sayıda nükleotid substitüsyonu veya delesyonu veya insersiyonunun, bir restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi oluşturarak, restriksiyon endonükleaz tarafından kesilmesi durumunda oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir birinci kesilmiş ikinci hedef diziyi 3' ve oluşturulan restriksiyon bölgesinin bir ikinci kesilmiş ikinci hedef diziyi 5' meydana getirmesi noktasında, birinci hedef DNA dizisinin ikinci hedef DNA dizisinden ayrıldığı, ve kütüphanenin her bir DNA dizisinin, sırasıyla 5' ucundan 3' ucuna, 15 ila 50 nükleotidlik bir uzunluğa sahip olan bir birinci dizi segmenti, restriksiyon endonükleaz ile kesildiği üzere genomik DNA'nın bir ikinci dizi segmenti, ve bahsedilen birinci dizi segmenti ile, eğer mevcut ise restriksiyon endonükleaz tarafından oluşturulan 5' çıkıntısı birleşimini ters tamamlayıcı bir üçüncü dizi segmenti içerdiği, bir DNA dizisi kütüphanesinden en az bir birinci hedef DNA dizisinden ve en az bir ikinci hedef DNA dizisinden en az bir tanesini tespit etmeye yönelik kit olup, aşağıdakileri içermektedir:

- en az bir birinci hedef dizi pozitif zincir veya en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir birinci geri primer;
- en az bir birinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir ikinci ileri primer;
- en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin üçüncü dizi segmentinin 5' ucu bölgesine hibridize olan bir birinci 5' kısmı ve en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi antipozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan bir ikinci 3' kısmı içeren en az bir üçüncü ileri primer; ki burada en az bir üçüncü ileri primerin birinci kısmının uzunluğu, en az bir üçüncü ileri primerin toplam uzunluğuna göre %20 ila %80'dir.

Söz edilen kit tercihen, en az bir birinci kesilmiş ikinci hedef dizi pozitif zincirin ikinci dizi segmentinin 3' ucu bölgesine hibridize olan en az bir dördüncü geri primeri de içermektedir.

- 5 Kit, kütüphanedeki DNA fragmentlerinin ikinci dizi segmentinin uçlarının restriksiyon endonükleazı için bir restriksiyon bölgesini oluşturan veya ortadan kaldıran herhangi türden bir mutasyonu tespit etmek üzere kullanılabilir. Bahsedilen kit tercihen, ALK (anaplastik lenfoma kinaz) veya EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) veya PIK3CA (fosfatidilinozitol 3-kinaz katalitik alfa polipeptid) genindeki mutasyonların
- 10 teşhisinde kullanılmaktadır.

Örnekler

Örnek 1 – Bivalan primer yaklaşımı

- 15 ALK geninin kodon 1174'ünde heterozigot C'den A'ya substitüsyonu barındıran SY5Y hücre hatları (SH-SY5Y ATCC Catalog No. CRL-2266™) üzerinde ön testler yürütülmüş, bir Fenilalalin bir Lösin'e (F1174L) döndürülmüştür; komşu diziye bakıldığında, heterozigot substitüsyon mutasyona uğramış alele yeni bir restriksiyon bölgesi (RS) oluştururken,
- 20 yabancı tip alel herhangi bir RS'ye sahip değildir.

Şekil 2, mutasyon ile üretilen WGA DNA kütüphanesindeki dizilerin ve dönüşümlerin basitleştirilmiş bir çizimidir.

- 25 RS üzerinde meydana gelen mutasyonları tespit etmek için aşağıdaki yaklaşım test edilmiştir. 3' primerin RS'ye göre 3' içerisindeki bir bölgenin üstüne bindiği yeni bir PCR primer çiftinde bir 5' primer tasarlamak için tüm genom amplifikasyonunun evrensel primerinden (AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT dizisine sahip olan DRS-WGA primeri, SEQ ID NO:1) faydalanılmıştır.

30

Bir bivalan primer çiftinin tasarlanmasında oluşan strateji,

- DRS-WGA primeri ile %95 homolojiye sahip bir 5' primer; ve
- diğer DRS-WGA ampliconlar yerine hedef bölgeyi seçime bağlı olarak amplifiye etmek amacıyla, PCR için gerekli olan özgülüğü sağlaması gereken bir 3' PCR primeri

içermektedir.

Bu bivalan primer çifti teoride yabancı tip (WT) dizinin ve mutant (M) dizinin amplifikasyonunda görev almaktadır.

5

Deneysel kanıtlar bu yaklaşımın zayıf ve uygunsuz olduğunu, ve RS'de mutasyon tespitini garanti etmediğini göstermektedir. Şekil 3'te gösterildiği üzere, bir bivalan primer kullanımı özgül olmayan amplifikasyon sağlamakta; bu da farklı boyutlarda birçok amplifikasyon bandı ve istenilen boyutta açıkça ayıt edilebilir bandın olmaması ile sonuçlanmaktadır (örneğin, bir F1174L heterozigot mutasyon taşıyan, DEPArray™ ile izole edilen ve DRS-WGA ile amplifiye edilen tek SY5Y hücrelerinde. Mutasyona uğramış dizi için 132bp, WT dizi için 169 bp). Amplifikasyon hem mutasyona uğramış (M), hem de yabancı tip (WT) ve PCR negatif kontrol (C-) numunelerinde açık ve özgül bir bant vermeyi başaramamıştır. Negatif WGA (Ctr-) kontrolü yalnızca özgül olmayan bir bandı göstermektedir.

15

Bu zayıf sonuca etki eden bir faktör, %95 ligate edilmiş WGA primere karşılık gelen 5' bivalan primerin, DNA-WGA kütüphanesindeki tüm DNA fragmentlerinde mevcut olması ve 3' bivalan primerin yeterli özgüllüğe sahip PCR reaksiyonunu sağlamamasıdır.

20

Bir örnek olarak, insan genomu referansı (Homo sapien hg 19) 3,095,693,981 baz içermektedir. Eğer genom dört bazlık bir restriksiyon bölgesi (mesela TTAA) ile bir restriksiyon endonükleaz ile parçalanırsa, oluşturulan DNA fragmentlerinin ortalama uzunluğu 4'ün (olası bazlar) 4. kuvveti (düşünülen parçalanma dizisi uzunluğu) =256'dır. Oluşturulan DNA kütüphanesi bu nedenle, DNA'daki rastgele bir nükleotid dizisine ait basitleştirilmiş bir varsayım ile yaklaşık olarak $3,095,693,981/256 \sim 12.1$ milyon farklı fragmenti içerecektir. Bunların tümü aynı 5' primeri (birincil PCR'dan WGA primere karşılık gelmektedir) içerecektir.

25

Dolayısıyla bivalan primer çiftinin kullanımı özgül olmayan bantları vermektedir.

30

Örnek 2 – Hibrid primer homoloji aralığı limiti

Amplifikasyon testleri Örnek 1'de kullanılan ile aynı SY5Y hücre hattında, ancak mevcut buluşa ait yöntem kullanılarak yürütülmüştür.

DRS-WGA ürünlerindeki hem yabanıl tip (WT) hem de mutasyona uğramış (M) alellerin amplifikasyonunu test etmek üzere münferit SY5Y hücreleri saf tek hücre sağlayan DEPArray™ ile izole edilmiştir.

5

WGA evrensel primeri ile uzunluğunca %86 eşleşen bir 5' PCR primer kullanarak amplifikasyon yaklaşımı, ne WT ne de M aleli için bir çözüm sunmuştur. Şekil 5'te gösterildiği üzere amplifikasyon, hem mutasyona uğramış (M) hem de yabanıl tip (WT) ve PCR negatif kontrol (C-) numunelerinde açık ve spesifik bir bant vermeyi başaramamıştır.

10 Negatif WGA (Ctr-) kontrolü yalnızca özgül olmayan bir bantı göstermektedir.

WGA evrensel primeri ile farklı yüzdelerde homolojiye sahip primerler test edilmiştir. Sonuçlar aşağıda Tablo 1'de özetlenmiştir.

15 Tablo 1

Primer	WGA Homoloji	primere	Orijinal DNA ya Homoloji		F32 [# baz]	TEST
Evrensel	21/22	%95	1/22	%5	0	KO
Mutant 1	19/22	%86	3/22	%14	1	KO
Mutant 2	10/20	%50	10/22	%50	8	OK
Mutant 3	14/22	%64	8/22	%36	6	OK

Tablo 1'de, F32 sütunu "üçüncü ileri primerin ikinci kısmının", yani restriksiyon endonükleaz çıkıntısı dışında orijinal DNA ile aynı diziye sahip primer kısmının baz sayılarındaki uzunluğu bildirmektedir.

20

Tablo 1'deki sonuçlara göre, yöntem gerekliliklerini karşılamak üzere dengeli bir uzlaşımın tanımlanması gerektiği açıktır. Birçok test WGA evrensel primeri ile hibrid primer kimliğinin ideal yüzdesinin %20 ila %80 olduğunu, %40 ila %60 aralığında ise daha iyi verim alındığını göstermektedir.

25

Ornek 3 Mutant alelde (ALK geni) bulunan yeni bir RS oluşturulması – deney tasarımı

Buluşa göre yöntem, restriksiyon endonükleaz parçalanmayı tamamlamasa dahi amplifikasyonu (ve dizilemeyi) garanti etmektedir. Aslında restriksiyon endonükleaz aktivitesi hedef DNA'daki tüm RS'ler için garanti edilmemekte, ve WGA primeri (birincil PCR) bir diğer RS'de olsa da, DRS-WGA'da, DRS-WGA tarafından yine de başarılı bir şekilde amplifiye edilmiş istatistiksel olarak küçük yüzdede bir parçalanmamış RS mevcuttur.

Parçalanmamış bir bölge durumunda mutasyon deneyi için mutant dizi için tasarlanan yalnızca bir primer çifti kullanmak hedefin amplifikasyonuna ve dizilenmesine izin vermeyecektir.

Önceden açıklandığı üzere kodon 1174'te heterozigot C'den A'ya substitüsyonu barındıran SY5Y hücre hattı üzerinde yine amplifikasyon testleri yürütülmüş, bir Fenilalalin bir Lösin'e (F1174L) döndürülmüştür. Heterozigot substitüsyonu dolayısıyla mutasyona uğramış alelde yeni bir RS oluştururken, yabancı tip alel herhangi bir RS'ye sahip değildir.

WT ve M alellerin amplifikasyonu için kullanılan PCR primer dizileri Tablo 2'de gösterilmiştir. Mutant alel ileri primer için, WGA primerine homolog olan primer dizisinin birinci kısmı kalın ve altı çizili bir şekilde gösterilirken, orijinal DNA ile aynı diziye sahip olan primerin ikinci kısmı, restriksiyon endonükleaz çıkıntısı hariç, (F32 = 8 baz) kutu içerisinde gösterilmiştir.

Tablo 2

Primer Adı	SEQ ID NO:	Dizi	
ALK_WT_F	2	5' CCTCTCTGCTCTGCAGCAAAT	3'
ALK_WT_R	3	5' TCTCTCGGAGGAAGGACTTGAG	3'
ALK_M1_F	4	5' <u>TGCTGTCAGTTA</u> AACCACCA	3'
ALK_M1_R	5	5' GGTCTCTCGGAGGAAGGACT	3'

DRS-WGA ürünlerindeki hem WT hem de M alellerinin amplifikasyonunu test etmek üzere münferit SY5Y hücreleri saf tek hücre sağlayan DEPArray™ ile izole edilmiştir.

Mutasyon tespiti için negatif kontrol olarak, münferit lenfositler de DEPArray™ ile izole edilmiş ve DRS-WGA ile amplifiye edilmiştir.

Hem WT (lenfositler) hem de heterozigot M (SY5Y) üzerindeki WT'nin PCR amplifikasyonu, spesifik olarak tasarlanmış WT 5' primerinin kullanımı ile mükemmel bir şekilde gerçekleştirilmiş, bu da WT alelin özel amplifikasyonuna izin vermiştir.

- 5 Şekil 6'da gözlemlenebileceği gibi spesifik amplifikasyon ürünü bulunmamaktadır. Bunun yerine, istenilen PCR bandı (132 bp) açıkça ayırt edilebilirdir.

Hedef diziyi ve evrensel DRS-WGA primerini destekleyecek şekilde (straddle) tasarlanan primer tarafından sağlanan amplifikasyonun özgüllüğünü tespit etmek amacıyla aynı lenfositler ve SY5Y hücreleri için M-spesifik 5' primeri test edilmiştir.

Şekil 7'de görülebileceği gibi, bu durumda, beklenildiği üzere, spesifik amplifikasyon yalnızca SY5Y tek hücre DRS-WGA DNA'da gözlenmiştir. Hedef mutasyon için WT olan, lenfositlerden DRS-WGA DNA istenilen amplifikasyon için negatif olmuş, ve yalnızca özgül olmayan PCR amplifikasyonları mevcut olmuştur.

Gerçekleştirilen amplifikasyonun spesifik olduğunu ve dizilemeye izin verdiğini göstermek üzere, tüm amplifikasyon ürünleri 3' uçlarından dizilenmiştir. Karşılık gelen WT veya M durumu, açıklanan yöntem ile gerçekleştirilen özgüllüğü gösteren tüm amplifikasyon ürünleri için onaylanmıştır. Bir WT alelin dizilenmesine yönelik bir örnek Şekil 8'de gösterilmiş, bir M alelin dizilenmesine yönelik bir örnek Şekil 9'da gösterilmiştir.

Sonuçlar Tablo 3'te özetlenmiştir.

25

Tablo 3

	Tek Hücre Replikatları	M-Spesifik 5' primer ile elde edilen dizi	WT-Spesifik 5' primer ile elde edilen dizi
WBC	1	PCR ürünü yok	WT
	2	PCR ürünü yok	WT
	3	PCR ürünü yok	WT
SY5Y	1	M	WT
	2	M	WT
	3	M	WT

30

Tercih edilen bir uygulamada, birinci hedef dizi antipozitif zincirde (FTSAS), yani bu örnekte yabancı tip dizide, hatalı bir başlangıç yapmayacak (mis-prime) şekilde, üçüncü ileri primerin (F3) ikinci kısmı (F32) 30 nükleotidden kısadır, böylelikle bir yanlış pozitif (PCR ürünü uzunluğu ve dizisi itibarıyla) ile sonuçlanabilecek bir PCR reaksiyonu başlatılmaktadır. Daha çok tercih edildiği haliyle, bahsedilen ikinci kısmın (F32) uzunluğu 20 nükleotidden kısadır. Daha da çok tercih edildiği haliyle, söz konusu üçüncü ileri primerin (F3) söz konusu ikinci kısmının (F32) uzunluğu 10 nükleotidden kısa veya buna eşittir.

10

Söz edilen üçüncü ileri primerin (F3) ikinci kısmı (F32), yeterli özgüllüğü sağlayamayacak kadar kısa olmamalıdır (örneğin tablo 1'deki sonuçlara bakınız). Özellikle, üçüncü ileri primerin söz konusu ikinci kısmının uzunluğu, restriksiyon bölgesi konsensüs dizisi uzunluğu eksi parçalanmış DNA'nın 5' çıkıntısının uzunluğunun yarısından büyük olmalıdır. Daha fazla özgüllük elde etmek amacıyla, üçüncü ileri primerin (F3) ikinci kısmı (F32) en az 3 nükleotid, ve daha çok tercih edildiği haliyle en az 6 nükleotid; restriksiyon bölgesi konsensüs dizisi uzunluğu eksi parçalanmış DNA'nın 5' çıkıntısının uzunluğunun yarısından daha uzun olmalıdır.

20

Örnek 4 Mutant alelde (ALK geni) yeni bir RS oluşturulması – deney doğrulama

Yukarıda açıklanan yöntem 54 tek hücre ile de doğrulanmıştır:

- 10 tek canlı, yeni SY5Y;

- oda sıcaklığında 20 dakika %2 paraformaldehit (PFA) ile önceden tespit yapılan ve

25

Inside Perm (Miltenyi Biotec) ile geçirgen hale getirilen (permeabilise) 19 tek SY5Y;

- CytoChex™ ile önceden tespit yapılan ve Inside Perm ile geçirgen hale getirilen 19 tek SY5Y;

- 2 tek yeni, canlı lenfosit;

- oda sıcaklığında 20 dakika %2 PFA ile önceden tespit yapılan ve Inside Perm (Miltenyi

30

Biotec) ile geçirgen hale getirilen 2 tek lenfosit.

Yöntem SY5Y ve lenfosit hücrelerinin %100'ünde WT alelini amplifiye etmiş, ve mutant alel canlı SY5Y'nin 9/10=%90'ında, cyto-chex/inside-perm ile tespit yapılan ve geçirgen hale getirilen SY5Y hücrelerinin 16/19=%84'ünde, oda sıcaklığında/inside-perm ile 20

5 dakika %2 PFA ile tespit yapılan ve geçirgen hale getirilen SY5Y hücrelerinin 17/19=%89'unda ve lenfositlerin 0/4=%0'ında amplifiye edilmiştir.

Tablo 4

5			ALK	
			WT Alelin PCR' i	F1174L M Alelin PCR' i
SY5Y	Canlı		100%	90%
	CytoChex, Inside Perm		100%	84%
	PFA, Inside Perm		100%	89%
10	Lymphocytes	Canlı	100%	0%
		PFA, Inside Perm	100%	0%

Bu sonuçlar, mevcut buluşun çok sayıda numune üzerindeki etkinliğini ve dayanıklılığını göstermektedir.

15

Ornek 5 Mutant alelde (EGFR geni) bir RS nin çıkarılması – deney tasarımı

EGFR geninde 5 kodon delesyonunu barındıran HCC-827 hücre hattında amplifikasyon testleri yürütülmüştür. İnsan genomunda tek bir PCR ve primer çifti kullanıldığı zaman, delesyon bir restriksiyon bölgesini (RS) kaldırarak M alelin tespitine imkan verirken, RS'ye sahip olan WT alelin tespitine imkan vermemektedir.

20

WT durumunun bir kontrolü olarak lenfositlerle birlikte münferit HCC-827 hücreleri DEPAArray™ ile izole edilmiştir.

25

M aleli ve (çıkarılan RS ile) WT aleli (RS'yi hala tutan) için hedeflenen iki farklı primer çifti tasarlanmış ve hem WT hem de M durumlarının doğru identifikasyonuna yönlendirilmiştir.

WT ve M alellerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR primer dizileri Tablo 5'te gösterilmiştir. Yabancıl tip alel ileri primerde, WGA primerine homolog olan primer dizisinin birinci kısmı kalın ve altı çizili bir şekilde gösterilirken, orijinal DNA ile aynı diziye sahip olan primerin ikinci kısmı, restriksiyon endonükleaz çıkıntısı hariç, (F32 = 16b) kutu içerisinde gösterilmiştir.

30

Tablo 5

Primer Adı	SEQ ID NO:	Dizi
Ex19_M_F	6	5'TAAAATTCCCGTCGCTATCAA3'
Ex19_M_R	7	5'TGTGGAGATGAGCAGGGTCTAG3'
5 Ex19_WT_F	8	<u>5'CTGTCAGTTAA</u> GAGAAGCAACATCTCC 3'
Ex19_WT_R	9	5'AGAGCAGCTGCCAGACATGAG3'

Şekil 11 M ve WT münferit hücrelerin M primer çiftleri ile PCR amplifikasyonunun sonuçlarını göstermekte iken, Şekil 12 M ve WT münferit hücrelerin WT primer çiftleri ile PCR amplifikasyonunun sonuçlarını göstermektedir.

Şekil 13 DRS-WGA ile amplifiye edilen gDNA'ya nazaran bir WT tek hücrenin bir ters zincir dizisini göstermekte iken, Şekil 14 DRS-WGA ile amplifiye edilen gDNA'ya nazaran bir M tek hücrenin bir ters zincir dizisini göstermektedir.

15

Örnek 6 Mutant alelde (EGFR geni) bir RS'nin çıkarılması – deney doğrulama

Yukarıda açıklanan yöntem 60 tek hücre ile de doğrulanmıştır:

- Veridex CellSearch zenginleştirme protokolüne göre işleme sokulan 31 tek HCC-827;
- 20 - Veridex CellSearch zenginleştirme protokolüne göre işleme sokulan 11 tek lenfosit;
- 17 tek yeni, canlı lenfosit.

Yöntem, tek HCC-827'nin 28/31=%90'ında WT alelini ve tek HCC-827'nin 31/31=%100'ünde M alelini amplifiye etmiştir.

25

11 Veridex ile işleme sokulan lenfositler dikkate alındığında, 11/11=%100 WT PCR'ı için pozitif bir PCR ürünü ile sonuçlanmış, 3/11=%27 ise M-PCR için pozitif bir PCR ürünü ile sonuçlanmıştır. Bu ürünler dizilenmiş ve WT olduğu onaylanmıştır. Dolayısıyla, DNA'yı dizileme ile tespit ederek Veridex ile işleme sokulan lenfositlerin özgüllüğü halen %100 iken, yalnızca PCT pozitifitesinin doğruluğuna güvenildiğinde bu özgüllük (bu testte) 8/11=%73'tür. Jel elektroforez ile DNA ürünü uzunluğunu tespit etme, aynı şekilde uzunluğu ayırt etmeye ve bunun gerçekten WT olduğunu belirlemeye izin verecektir; DNA ürününü gerçek zamanlı PCR ile tespit etme, WT ve M ürünlerini ayıramayacaktır. 17 yeni lenfosit dikkate alındığında, 17/17=%100 WT PCR için bir pozitif PCR ürünü ile

sonuçlanmış, 0/17=%0 ise M-PCR için pozitif bir PCR ürünü ile sonuçlanmıştır. Bu ürünler dizilenmiş ve WT olduğu onaylanmıştır.

5 Lenfosit başına 2 WT alel bulunduğu için, Veridex ile işleme sokulan (3/22=%14) ve yeni lenfositler (0/34=%0) arasındaki parçalanmamış RS'deki fark istatistiksel olarak büyüktür.

Bu durum, tamamlanmamış RE parçalanma aktivitesi durumunda yukarıda açıklanan yöntemin sağlamlığını göstermektedir.

10 Sonuçlar Şekil 15'te gösterilmiş ve Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6

EGFR Exon19

	İşlem	n	WT Alelin PCR'ı	Del.E746_A750 M Alelin PCR'ı	
15	HCC-827	Veridex	31	%90	%100
	WBC	Veridex	11	%100	%27 (*)
	WBC	Yeni	17	%100	%0
(*) Tüm diziler WT					

20 Yukarıdaki örnekler, mevcut buluşa göre yöntemin restriksiyon endonükleazın tamamlanmamış parçalanma aktivitesi durumunda dahi amplifikasyonu (ve dizilemeyi) garanti ettiğini göstermektedir. Hücrelerin tabii tutulmuş olduğu işlemde (önceki örnekte olduğu gibi) veya restriksiyon bölgesi etrafındaki spesifik diziye bağlı diğer sebeplerden dolayı, RE aktivitesi, hedef DNA'da bulunan tüm RS'ler için etkili parçalanmayı her zaman garanti edememektedir.

25

İstatistiksel olarak DRS-WGA'da küçük yüzdede bir parçalanmamış RS mevcuttur; evrensel (birincil –PCR) primer bir diğer RS'ye bağlansa da, bunlara başarılı bir şekilde Tüm Genom Amplifikasyonu yapılmıştır.

30

Parçalanmamış bir bölge durumunda üçüncü hedef dizi (MDRS ile) yalnızca bir PCR kullanılması söz konusu hedefin amplifikasyonuna ve dizilenmesine izin vermeyecektir. Restriksiyon enzimi ile tamamlanmamış DNA parçalanması durumunda, buluşa uygun

yöntem, DRS-WGA kütüphanesinde mevcut olduklarında hem WT hem de M alelin tespitine imkan vermektedir.

5 Şekil 16, M-PCR için pozitif üç adet Veridex ile işleme sokulmuş lenfositin birisinin dizileme sonuçlarını göstermektedir. Bu, ikinci ileri primer ile doğru bir şekilde amplifiye edilmiş ve dizilenmiş ikinci hedef dizi (MDRS ile, ancak WGA sırasında parçalanmamış) durumudur.

Örnek 7 Mutant alelde (PIK3CA geni) yeni bir RS oluşturulması.

10

Başka bir örnek olarak, tek nükleotid değişimi ATG/TAAT'den kaynaklanan PIK3CA geninin ekson 21'inin mutasyonu, M1043I mevcut buluşa göre yöntem ile tespit edilebilmektedir.

15 Mevcut buluşa ait yöntemin özellikleri ve kitinin analizi yoluyla ortaya çıkan avantajlar belirgindir.

20 Özellikle, DNA dizileri kütüphanesini PCR ile amplifiye etmek üzere kullanılan primerlerin belirli tasarımı sayesinde, bahsedilen yöntem birinci hedef DNA dizisini ve ikinci hedef DNA dizisini (DRS-WGA'nın restriksiyon endonükleaz için bir restriksiyon bölgesi varlığında farklılaşan) yüksek özgüllük ve sağlamlık ile farklı açılardan tespit etmeye imkan vermektedir.

25 Bunların yanı sıra, dördüncü bir geri primerin kullanılması, hızlı, basit ve uygun maliyetli olan daha da spesifik ve sağlam bir tespite ve amplikon-boyutu bazlı tespite imkan vermektedir.

30 Bunların yanı sıra, mevcut buluşa ait yöntem mutasyonları spesifik ve sağlam bir şekilde belirlemek üzere deterministik restriksiyon bölgesi tüm genom amplifikasyonunun aşağı yönüne uygulanabilmektedir. Bu mutasyonların aksi taktirde mevcut geleneksel tespit yöntemleri ile tespit edilmesi imkansızdır.

Dahası, bir DNA dizileme yönteminin, özellikle Sanger dizileme veya pirodizilemenin kullanılması, DNA kütüphanesinin restriksiyon endonükleazının tamamlanmamış

parçalanması durumunda oluşabilecek yanlış pozitiflerin dahi doğru şekilde tespit edilmesini garanti etmektedir.

5 İlave olarak, WGA primeri ile üçüncü ileri primerin %20 ila %80, daha iyi şekilde %40 ila %60 kimlik yüzdesi optimal bir sonuç elde etmeye imkan vermektedir.

Son olarak, ekli istemlerin koruma kapsamından ayrılmadan, açıklanan ve gösterilen yöntemin ve kitin modifikasyonları ve varyantlarının yapılabileceği açıktır.

10 Özellikle, yöntem birinci, ikinci, üçüncü ve olası dördüncü primer ile PCR amplifikasyonuna karışmayan primer çiftleri de kullanılarak katlanabilmektedir.

15 Ek olarak, söz konusu primerlerin bir veya daha fazlası, söz konusu birinci veya ikinci hedef dizi pozitif veya antipozitif zincire hibridize olmayan 5' ucu dizisini de kapsayabilmektedir. Bu özellik avantajlı bir şekilde aşağıda belirtilen amaçların biri veya daha fazlası için kullanılabilir:

- PCR ürünlerini bir numune etiketi ile barkodlama,
- sonraki jenerasyon dizileme için PCR ürünüde bir adaptör oluşturma
- 20 - katlanmış hedef reaksiyonda taklitçi olgunlaşmayı önleme.

Bunların yanı sıra, PCR reaksiyonundan WGA ürünleri birtakım arka plan sinyali gösterebildiği için, dizileme için farklı bir primer kullanmak avantajlı olabilmektedir. Bu ekstra özgüllük katmanı ekleyerek, sinyal-gürültüyü ve dizi grafiğinin okunabilirliğini

25 geliştirmektedir.

DİZİ LİSTESİ

- <110> Silicon Biosystems S.p.A.
- 30 <120> YABANIL TİP VE/VEYA MUTASYONA UĞRAMIŞ BİR HEDEF DNA DİZİSİNİ TESPİT ETMEYE YÖNELİK YÖNTEM VE KİT
- <160> 9
- <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Yapay

5

<220>

<221> kaynak

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"

10 /not="evrensel WGA primer"

/organizma="Yapay"

<400> 1

agtgggattc ctgctgtcag t 21

15

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapienler

20

<220>

<221> kaynak

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"

25 /not="ALK_WT_F"

/organizma="Homo sapienler"

<400> 2

cctctctgct ctgcagcaaa t 21

30

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapienler

<220>

<221> kaynak

<222> 1..22

5 <223> /mol_type="DNA"
/not="ALK_WT_R"
/organizma="Homo sapienler"

<400> 3

10 tctctcggag gaaggacttg ag 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Homo sapienler

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

20 <223> /mol_type="DNA"
/not="ALK_M1_F"
/organizma="Homo sapienler"

<400> 4

25 tgctgtcagt taaaccacca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Homo sapienler

<220>

<221> kaynak

<222> 1..20

<223> /mol_type="DNA"
/not="ALK_M1_R"
/organizma="Homo sapienler"

5 <400> 5
ggctctcgg aggaaggact 20

<210> 6

<211> 21

10 <212> DNA

<213> Homo sapienler

<220>

<221> kaynak

15 <222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"

/not="Ex19_M_F"

/organizma="Homo sapienler"

20 <400> 6
taaaattccc gtcgctatca a 21

<210> 7

<211> 22

25 <212> DNA

<213> Homo sapienler

<220>

<221> kaynak

30 <222> 1..22

<223> /mol_type="DNA"

/not="Ex19_M_R"

/organizma="Homo sapienler"

<400> 7

tgtggagatg agcaggtct ag 22

<210> 8

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapienler

<220>

10 <221> kaynak

<222> 1..27

<223> /mol_type="DNA"

/not="Ex19_WT_F"

/organizma="Homo sapienler"

15

<400> 8

ctgtcagtta agagaagcaa catctcc 27

<210> 9

20 <211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapienler

<220>

25 <221> kaynak

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"

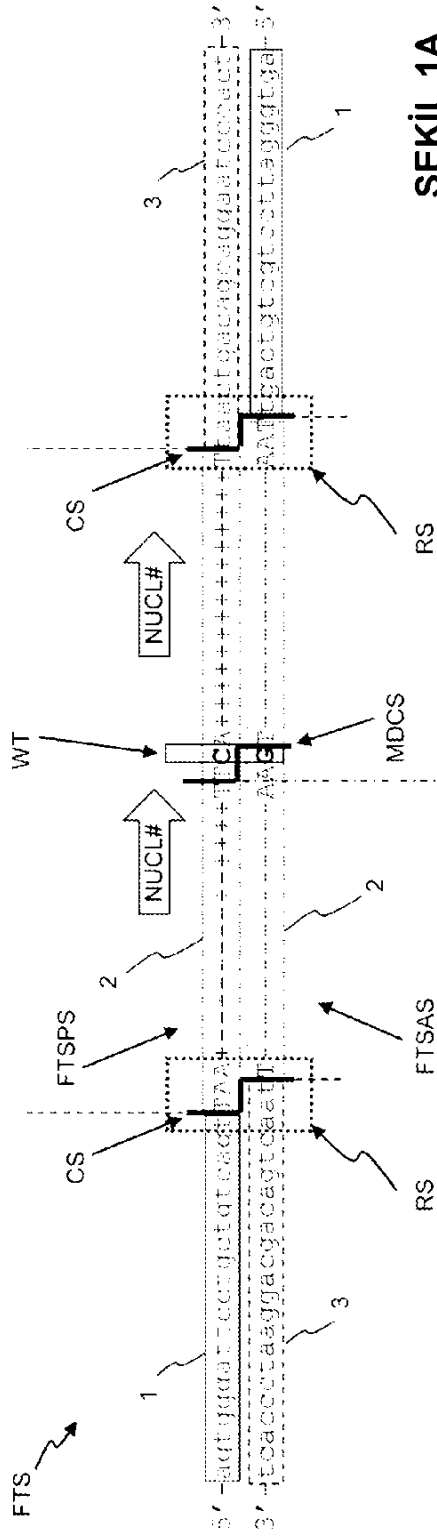
/not="Ex19_WT_R"

/organizma="Homo sapienler"

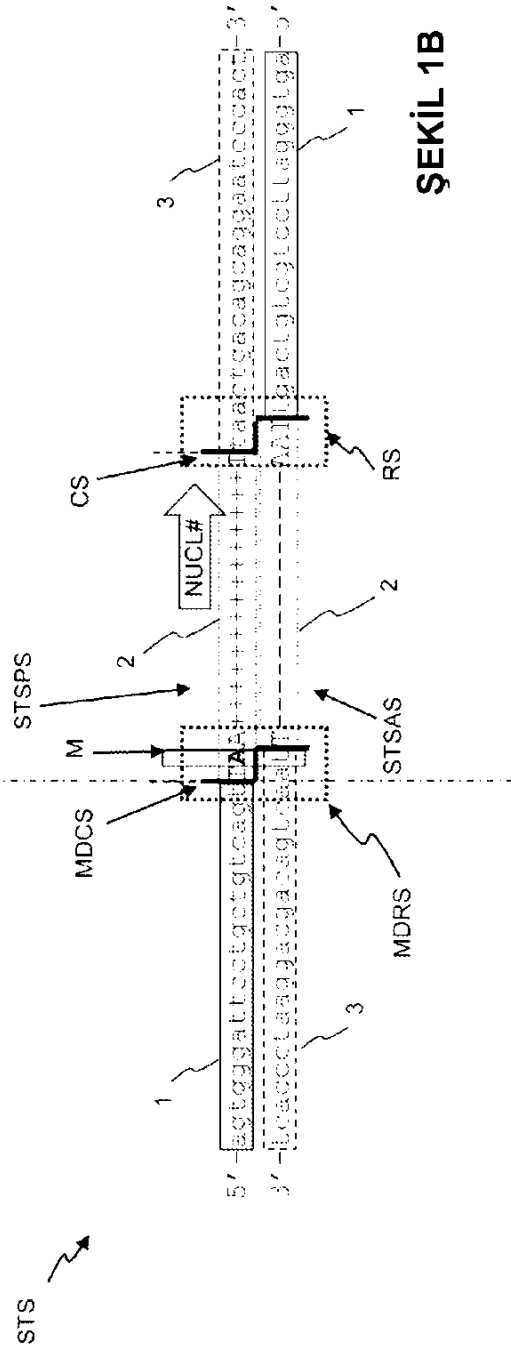
30

<400> 9

agagcagctg ccagacatga g 21

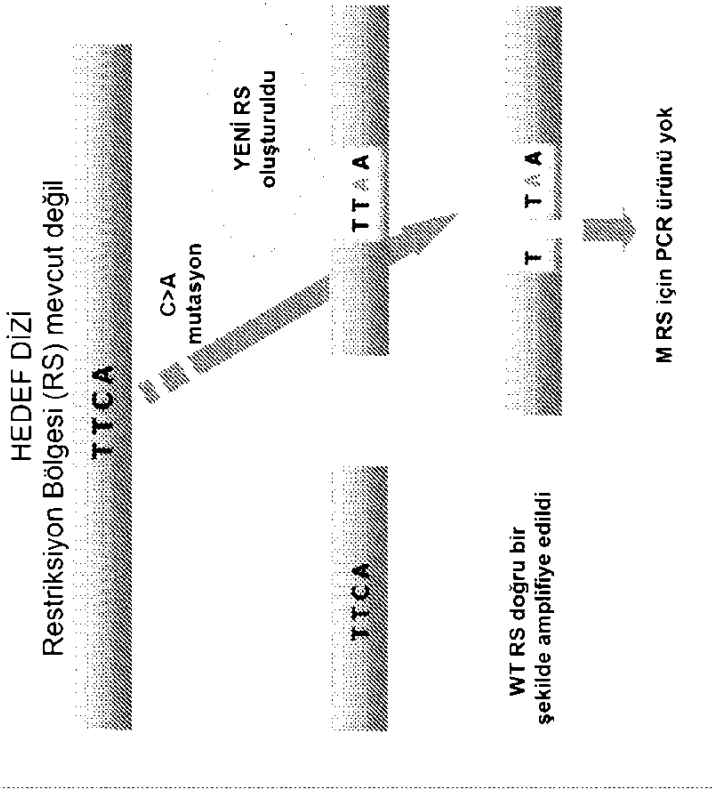


ŞEKİL 1A

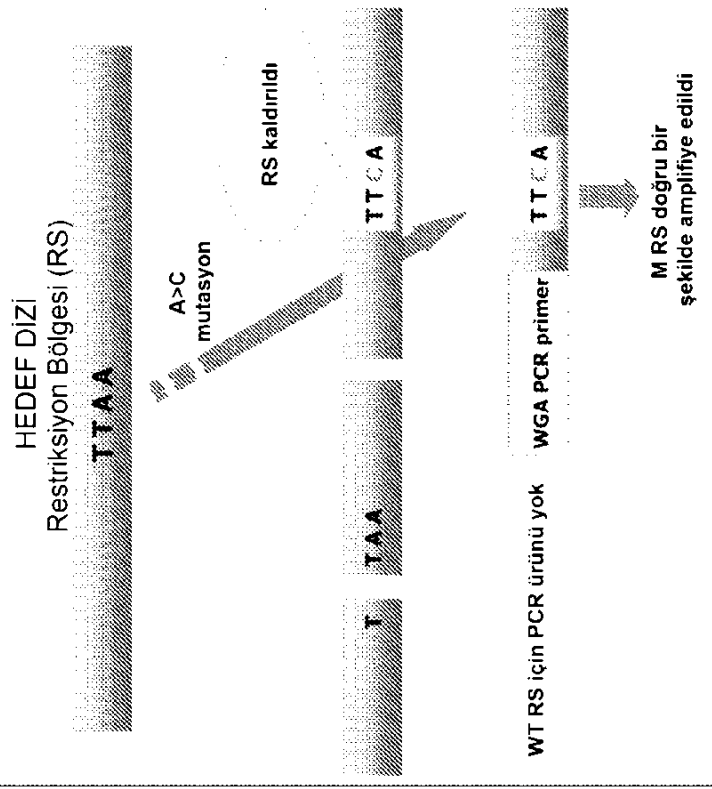


ŞEKİL 1B

Vaka A

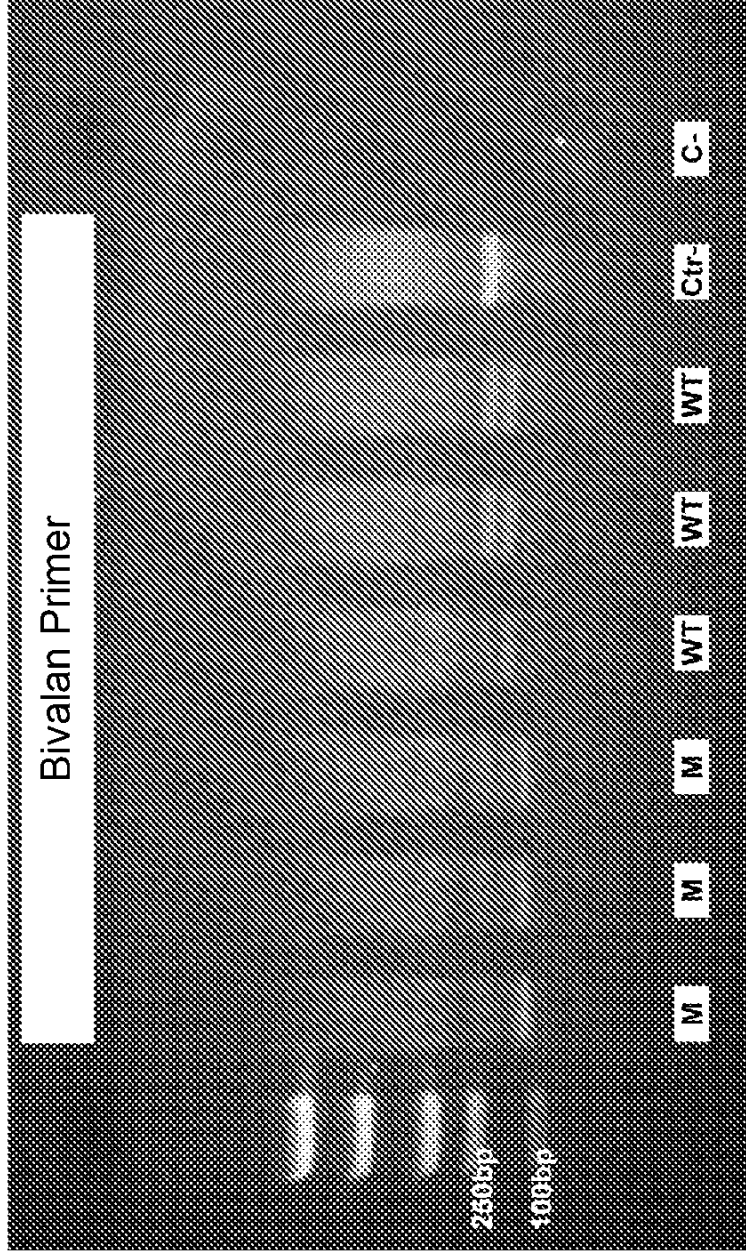


Vaka B

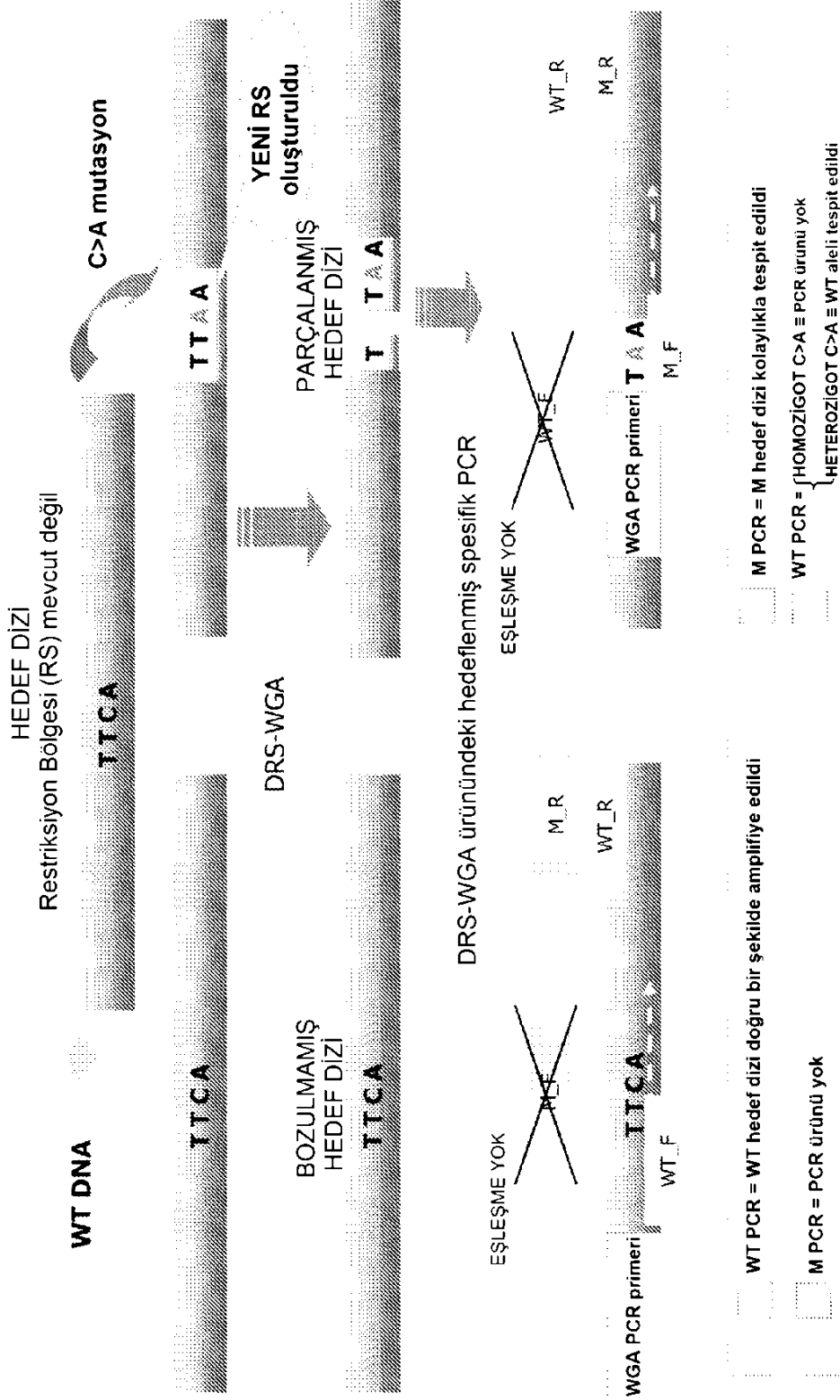


Bir RS bir mutasyon ile oluşturulabilir/kaldırılabilir; bivalan primer çifti hem WT hem de M DNA tespitine izin vermemektedir

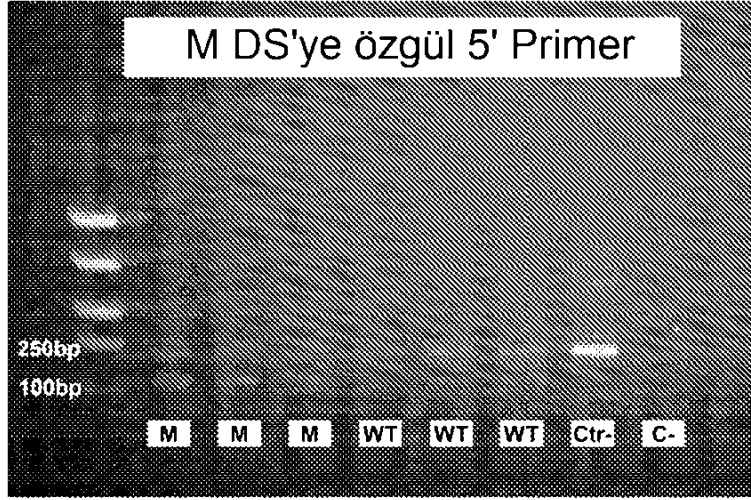
ŞEKİL 2



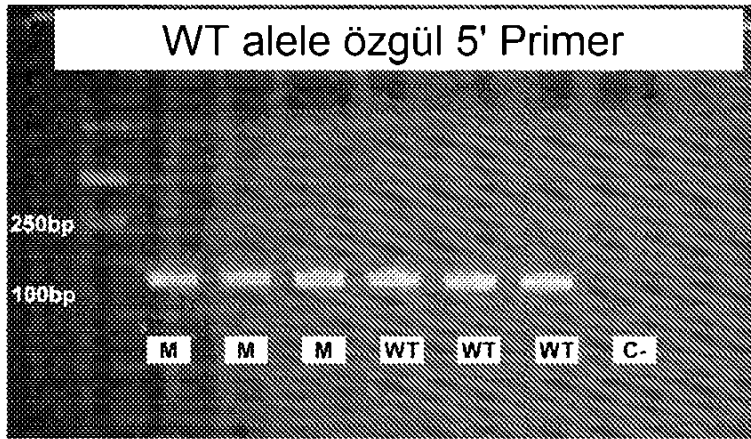
ŞEKİL 3



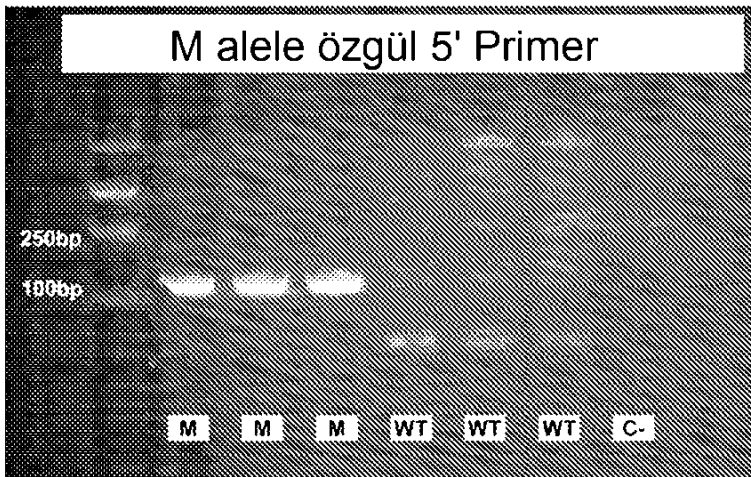
ŞEKİL 4A



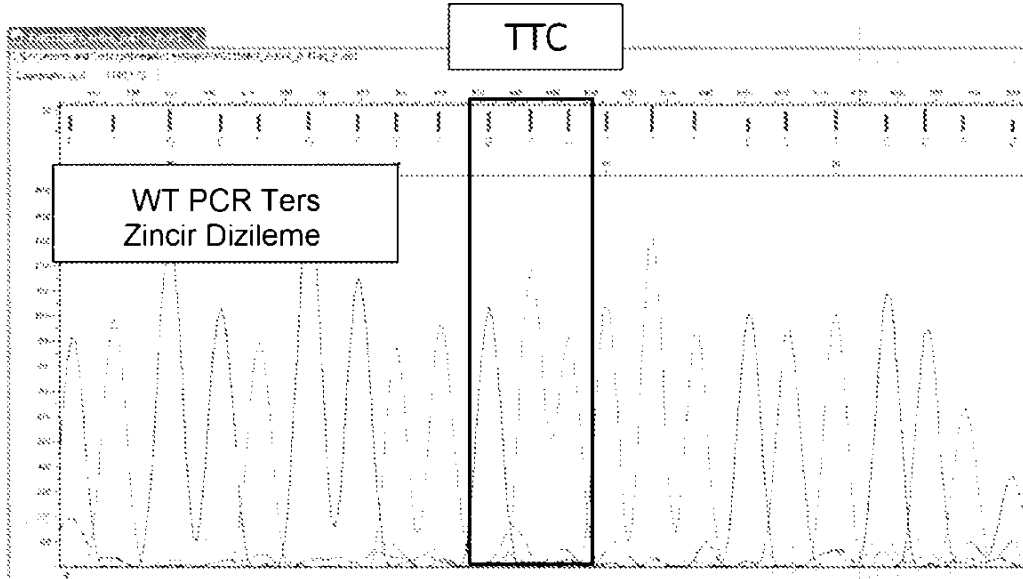
ŞEKİL 5



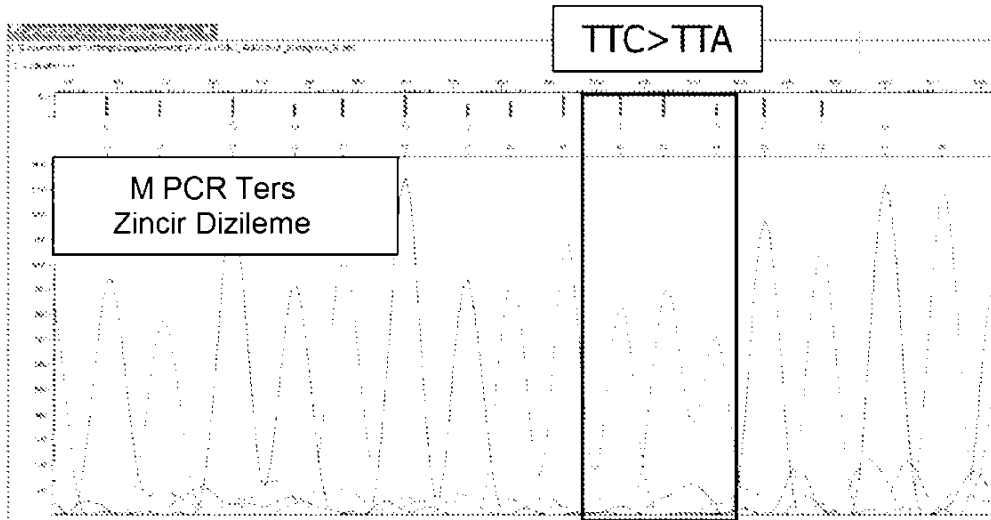
ŞEKİL 6



ŞEKİL 7



ŞEKİL 8



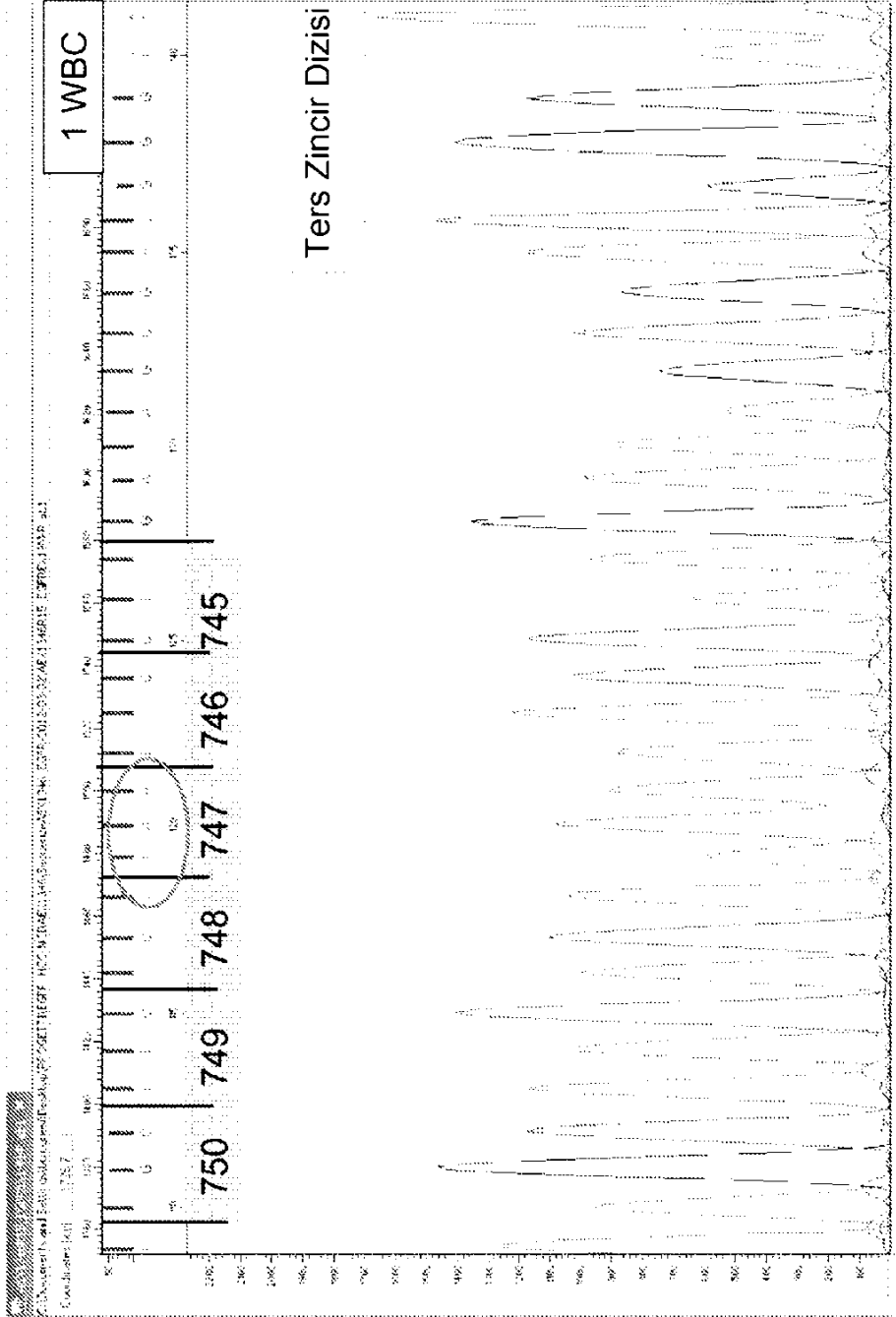
ŞEKİL 9

Hücre ID	Hücre Tipi	# hücre	Fiksasyon	Geçirgen hale getirme	ALK F1174 L	
					WT alet	M alet
AWG1152R1	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R2	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R3	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R4	SY5Y	1	Canlı	na	1	0
AWG1152R5	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R6	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R7	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R8	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R9	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1152R10	SY5Y	1	Canlı	na	1	1
AWG1157R1	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R2	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	0
AWG1157R3	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R4	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R5	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R6	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	0
AWG1157R7	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	0
AWG1157R8	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R9	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1157R10	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R1	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R3	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R4	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R5	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R6	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R7	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R8	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R9	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1159R10	SY5Y	1	CYTO-CHEX	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R1	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R2	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R3	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R4	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R5	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R6	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R7	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R8	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1153R9	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	0
AWG1153R10	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R1	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R2	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R3	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R4	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R5	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	0
AWG1158R6	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R7	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R8	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1158R9	SY5Y	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	1
AWG1106R1	PBMC	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	0
AWG1106R2	PBMC	1	PFA 2% 20' RT	INSIDE PERM	1	0
AWG1162R1	PBMC	1	Canlı	na	1	0
AWG1162R2	PBMC	1	Canlı	na	1	0

ŞEKİL 10

Hücre ID	Hücre Tipi	#hücreler	Fiksasyon	EGFR Exon19 Del. E746_A750	
				WT	M
AEX1204R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R2	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R4	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R10	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R2	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1171R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R4	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R10	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R2	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R4	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1346R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R10	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1346R11	HCC-827	1	Veridex	1	1
AWG1162R1	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R2	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R3	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R5	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R6	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R7	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1162R8	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R1	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R2	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R3	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R4	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R5	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R6	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R7	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R8	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R9	PBMC	1	Canlı	1	0
AWG1205R10	PBMC	1	Canlı	1	0
AEX1204R11	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1204R12	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1204R13	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1171R11	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R12	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R13	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R14	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R15	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1346R14	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1346R15	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1346R16	PBMC	1	Veridex	1	0

ŞEKİL 15



ŞEKİL 16