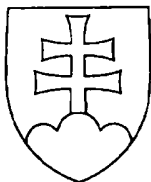


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **7. 12. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **00127011.5**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 12. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 9. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **9/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP01/14369**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/46456**

(11), (21) Číslo dokumentu:

695-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7:

C12Q 1/68

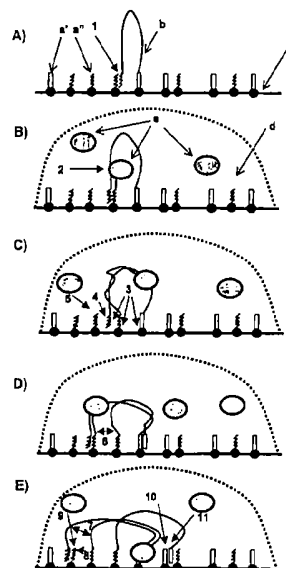
(71) Prihlasovateľ: **Applied Research Systems Ars Holding N. V., Curaçao, AN;**

(72) Pôvodca: **Mayer Pascal, Eloise, FR;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob izotermálnej amplifikácie nukleových kyselín na tuhom podklade a kit na jeho vykonanie**

(57) Anotácia:
Spôsob izotermálnej amplifikácie nukleovej kyseliny prostredníctvom tuhého podkladu. Tieto spôsoby sú užitočné na aplikácie vyžadujúce vysokú výkonnosť, najmä na sekvenovanie nukleových kyselín.



- 1 -

Spôsob izotermálnej amplifikácie nukleových kyselín na tuhom podklade a kit na jeho uskutočnenie

Oblasť techniky

Vynález sa týka oblasti nukleokyselinovej amplifikácie. Konkrétnejšie sa tento vynález týka spôsobu izotermálnej amplifikácie nukleových kyselín, ktorý je založený na použití tuhého podkladu a zariadenia, a ďalej sa týka kitov užitočných pre aplikácie vyžadujúce vysokú výkonnosť, najmä na sekvenovanie nukleových kyselín.

Doterajší stav techniky

Analýza nukleokyselinovej sekvencie sa stala základným kameňom mnohých aktivít v biológii, biotechnológii a medicíne. Schopnosť determinovať nukleokyselinové sekvencie sa stávala stále dôležitejšou pri pokusoch zameraných na determinovanie sekvencií veľkých genómov človeka a iných vyšších organizmov, a aj pri detekcii jednonukleotidových polymorfizmov (SNPs) a pri skríningu a monitoringu génovej expresie. Genetické informácie poskytnuté sekvenovaním nukleových kyselín majú mnohé aplikácie, napríklad pri hľadaní a hodnotení cieľov liečiv, pri diagnostike ochorenia, výpočte rizika a identifikácii a charakterizácii organizmov.

Kvôli rýchlemu zvyšovaniu sa dopytu po spoľahlivých údajoch o genetickej informácii týkajúcej sa organizmu, ochorenia alebo jedincov v populácii, je stále dôležitejšie zlepšiť výkonnosť sekvenčných metód. Základným cieľom takýchto aplikácií je determinácia sekvencie štyroch báz, adenínu (A), cytozínu (C), guanínu (G) a tymínu (T) alebo uracilu (U), ktoré sa nachádzajú v daných nukleových kyselinách a patria k určitému typu buniek, organizmu alebo populácii jedincov. Väčšina nukleokyselinových sekvenčných metód (zhrnutie v Yan H. a ďalší, Science 2000, 289 (5486): 1890-2) umožňuje determináciu nukleokyselinovej sekvencie buď priamo (použitím primerom vedeného nukleotidového predĺžovania alebo prostredníctvom hybridizačných technológií), alebo nepriamo (elektroforetickou

a/alebo štiepnou analýzou). Avšak vedecká a ekonomická hodnota akejkoľvek aplikácie určenej na analýzu nukleokyselinovej sekvencie je veľmi závislá na skutočnej výkonnosti metódy.

Snahy nevyhnutné na získanie izolovaných nukleových kyselín v takom množstve a takej kvalite, ktoré sú prijateľné na získanie spoľahlivých výsledkov, predstavujú jednu z hlavných skutočností, ktorú treba brať do úvahy, keď sa hodnotí výkonnosť sekvenčnej metódy. Originálna vzorka obsahujúca nukleovú kyselinu, ktorá sa má sekvenovať, často neposkytuje dostatok materiálu na uskutočňovanie takejto analýzy, pokiaľ nie je poskytnutá buď relatívne vysoká kvantita východiskového materiálu, a/alebo značná intervencia človeka. Toto je výnimočne dôležité v prípade súdnych alebo archívnych DNA vzoriek alebo mRNA vzoriek získaných z konkrétnych bunkových typov, keď sekvenčné metódy vyžadujúce stovky nanogramov izolovanej DNA sekvencie sa musia uskutočňovať vychádzajúc z nanogramov alebo aj menšieho množstva celkovej genomickej DNA.

Na prekonanie takéhoto problému je najpoužívanejším riešením amplifikácia DNA sekvencie prostredníctvom generovania niekoľkých kópií len toho nukleokyselinového fragmentu, o ktorý je záujem. Vo všeobecnosti, amplifikácia nukleovej kyseliny vyžaduje sériu akcií, ktoré sa musia opakovať:

- a) Poskytnutie prvej nukleovej kyseliny (templátu) obsahujúcej sekvenciu, o ktorú je záujem;
- b) Poskytnutie druhej nukleovej kyseliny (primeru) obsahujúcej aspoň na svojom 3' konci sekvenciu, ktorá je komplementára so sekvenciou obsiahnutou v prvej nukleovej kyseline a nachádza sa vedľa alebo vo vnútri vo vzťahu k 3' koncu sekvencie, o ktorú je záujem;
- c) Poskytnutie podmienok umožňujúcich tranzíciu tak templátu, ako aj primeru do jednovlákových molekúl, aspoň v komplementárnej oblasti týchto dvoch nukleových kyselín;
- d) Poskytnutie podmienok umožňujúcich hybridizáciu medzi komplementárnou sekvenciou umiestnenou v templáte a v primeri;
- e) Poskytnutie nukleokyselinovej polymerázy schopnej syntetizovať komplementárne vlákno templátovej oblasti vychádzajúc z 3' konca hybridizačného primeru v súlade s Watson a Crikovými pravidlami párovania báz (A-T alebo A-U a C-G);

f) Vyprovokovanie oddelenia výslednej dvojláknovej nukleovej kyseliny (jedno vlákno patriace pôvodnému templátu, druhé obsahujúce primer fúzovaný so sekvenciou, ktorá je komplementárna s tou oblasťou templátu, kde je možné nukleotidové predlžovanie) tak, aby sa každé vlákno mohlo stať templátom pre ďalšiu hybridizáciu a polymerizáciu.

Zvyčajne sa do amplifikačnej reakcie pridáva aj druhý primer, aby začala polymerizácia jeho hybridizáciou s časťou novo syntetizovaného reťazca susediaceho alebo vnútorného, ako aj so sekvenciou, o ktorú je záujem. Ak sa použijú dva primery, každý špecifický pre jeden komplementárny reťazec, opakovanie týchto cyklov umožňuje syntézu viacerých kópií oboch vlákien templátovej sekvencie nachádzajúcej sa medzi sekvenciami použitými na hybridizáciu s primermi. Alternatívne, ak je poskytnutý len jeden primer, vytvoria sa viaceré kópie jediného reťazca.

Kľúčovým bodom je kontinuálna obnova podmienok umožňujúcich dehybridizáciu pôvodného a novo syntetizovaného vlákna a ich hybridizáciu s voľnými primerovými molekulami, aby sa znova odštartovala hybridizácia požadovaného množstva špecifickej nukleokyselinovej sekvencie. Primerové molekuly sa vo všeobecnosti nachádzajú v koncentrácii, ktorá je značne vyššia ako koncentrácia templátových molekúl, aby sa mohla podporiť exponenciálna kinetika amplifikačného procesu.

Zvyčajne sa prechod medzi jednovláknovou a dvojláknovou formou nukleových kyselín získava zvýšením a znížením teploty systému, v ktorom sa uskutočňuje amplifikačný proces. V tomto kontexte, elementy nevyhnutné na amplifikáciu (templát, primery, nukleokyselinová polymeráza, nukleotidy, soli) sú dodávané so sérií zahrievacích a ochladzovacích fáz generovaných externým zariadením.

Takýto prístup, zvyčajne nazývaný termocyklický, sa aplikuje v dobre známej technike označovanej polymerázová reťazová reakcia (PCR; Taylor GR, „Polymerase chain reaction: basic principles and automation“ in „PCR: A Practical approach“, vydané McPherson MJ a ďalší, Oxford Univ. Press 1991), v ktorej sa nasledujúce kroky uskutočňujú v presnom poradí a vo vopred definovaných časových periódach:

a) Denaturácia (90 °C až 95 °C, 30 až 60 sekúnd). Externé zariadenie poskytuje energiu (vo forme tepla) nevyhnutnú na zvýšenie pohybu nukleokyselinových molekúl na úroveň, ktorá je dostatočná na prerušenie kovalentných interakcií stabilizujúcich dvojvláknovú konfiguráciu. Tento krok sa môže eventuálne vynechať v prvom cykle, ak sú templát a primery už v jednovláknovej forme, ale je absolútne nevyhnutný vo všetkých nasledujúcich cykloch.

b) Hybridizácia (35 °C až 80 °C, 30 až 90 sekúnd). Komplementárna sekvencia nachádzajúca sa v primeroch a v templátových molekulách môže pri zníženej teplote hybridizovať. Táto teplota, ktorá musí byť pozorne kontrolovaná, aby sa zabránilo hybridizácii molekuly, ktorá má len limitovanú homológiu, sa vypočítava od prípadu k prípadu, keďže je funkciou tak dĺžky, ako aj C/G obsahu nukleokyselinovej sekvencie v primerových a s templátom komplementárnych oblastiach.

c) Predlžovanie (60 °C až 85 °C, 60 až 180 sekúnd). Je to jediný krok skutočne produkujúci nové nukleokyselinové molekuly. Teplota, pri ktorej sa uskutočňuje predlžovanie je funkciou zvolenej polymerázy a okrem niekoľkých výnimiek nekorešponduje s hybridizačnou teplotou. Zvyčajne sa predlžovanie novo syntetizovaného vlákna uskutočňuje prostredníctvom bežne používaných polymeráz v jednej alebo niekoľkých minútach v závislosti na dĺžke nukleovej kyseliny, ktorá sa má amplifikovať. Nové primovacie javy sa nemôžu uskutočniť pokiaľ nie je takto predĺžené vlákno uvoľnené, aspoň čiastočne, ako jednovláknová molekula z dvojvláknovej molekuly, ktorá je výsledkom predlžovania.

Zvyčajne, na získanie takého množstva nukleovej kyseliny, ktoré je dostatočné na ďalšiu analýzu, sa tieto kroky opakujú v 15 až 40 cykloch, po ktorých PCR amplifikácia zvyčajne dosiahne plateau v dôsledku vyčerpania polymerázy.

Hoci bolo vyvinutých mnoho rôznych technológií, stratégií a reakčných podmienok na základnej schéme, PCR má niektoré obmedzenia v dôsledku série špecifických požiadaviek:

- a) zahrievacie a ochladzovacie zariadenie;
- b) polymeráza, ktorá ostáva vysoko progresívna a presná aj po mnohých cykloch pri vysokých teplotách, ktoré sú potrebné na denaturáciu nukleovej kyseliny;
- c) frakcionalizácia amplifikačného procesu na veľa cyklov, takže polymerizácia nie je kontinuálna, ale je synchronizovaná s termocyklickým procesom. Nie je možné

dosiahnuť nukleokyselinovú polymerizačnú reakciu kontinuálnym spôsobom, keďže je pravidelne prerušovaná, aby sa znova ustanovili podmienky nevyhnutné na hybridizáciu medzi voľnými primerovými a templátovými molekulami, čo celý proces spomaľuje.

Na prekonanie týchto obmedzení klasickej PCR boli v prechádzajúcom stave techniky opísané rôzne riešenia, spočívajúce najmä v poskytnutí alternatívnych prístupov na umožnenie separácie vlákien a hybridizácie v izotermálnych podmienkach bez termocyklizácie.

Vláknová vytesňovacia amplifikácia (Strand Displacement Amplification – SDA) je izotermálna nukleokyselinová amplifikačná a detekčná metóda, ktorá využíva polymerázu v spojitosti s endonukleázou, ktorá bude štiepiť len polymerizovaný reťazec, takže polymeráza vytlačí takéto vlákno, pričom sa bude generovať novo polymerizované vlákno (EP497272; Walker GT, PCR Methods Appl 1993, 3(1): 1-6). Táto technika, založená na opakovaní prerušenia jedného vlákna, predlžovacieho a vytesňovacieho kroku, bola rôzne upravovaná (WO 96/23904; Westin L a ďalší, Nat Biotechnol 2000, 18(2): 199-204), ale takýto prístup má obmedzenú použiteľnosť. Endonukleáza sa musí pridávať spolu s polymerázou a preto je rozsah povolených teplôt, pri ktorých sa môže celý proces uskutočňovať, obmedzený na teplotu udržiavajúcu aktivitu oboch enzýmov. V prípade endonukleáz, je takýto rozsah (zvyčajne 25 °C až 50 °C) priveľmi nízky, aby sa zabránilo nešpecifickej hybridizácii primerov na templát, čo vedie k značnému podielu reakcií, ktoré sú neproduktívne, alebo generujú nechcené produkty. Navyše, nukleové kyseliny slúžiace ako primery a/alebo templáty môžu vyžadovať ďalšiu modifikáciu, keďže je nevyhnutné, aby sa v templátovej oblasti, ktorá sa má amplifikovať, nenachádzalo miesto rozoznávané endonukleázou, pričom sa musí vždy nachádzať v primerovej sekvencii.

Rolovacia kruhová amplifikácia (Rolling Circle Amplification – RCA) je technika využívajúca predlžovanie cirkularizovaných oligonukleotidových sond prostredníctvom DNA polymerázy v izotermálnych podmienkach, buď s lineárnou, alebo geometrickou kinetikou, a generovanie tandemovo spojených kópií DNA molekuly, aby sa amplifikovala ako následok komplexného vzoru vytesnení vlákna (Walter NG a Strunk G, Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91 (17): 7937-41; WO

94/03624). Aj v tomto prípade, hoci bola technológia rôznym spôsobom adaptovaná (WO 97/19193, Isaksson A a Landegren U, Curr Opin Biotechnol 1999, 10(1):11-5), takéto technológie majú niekoľko obmedzení, ako napríklad použitie cirkularizovaných molekúl a produkciu amplifikovaných molekúl nie vo forme jednotlivých entít, ale vo forme série molekúl obsahujúcich rôzny počet kópií pôvodných sekvencií, ktoré sú vzájomne prepojené.

Vyvinuté boli aj iné techniky, ktoré riešia problém prostredníctvom medzi-produktového DNA-RNA hybridu v izotermálnej, multienzýmovej reakčnej zmesi obsahujúcej RNA polymerázu, ribonukleázu a reverznú transkriptázu (WO 91/04340, WO 92/08800, WO 97/04126; Gebinoga M a Oehlenschläger F, Eur J Biochem 1996, 235(1-2): 256-61). Je zrejmé, že pri používaní týchto metód je možné stretnúť sa s niekoľkými problémami týkajúcimi sa tak rýchlej RNA degradácie, ako aj zložitosti hľadania podmienok, pri ktorých všetky zložky pracujú v reakčnej zmesi správne v rovnakom čase, udržiavania špecificity a rýchlosti amplifikačného procesu.

Aj keď amplifikačné technológie slúžia na analýzu veľmi malého množstva nukleokyselinových sekvencií, účinnosť nukleokyselinových sekvenčných metód nie je spojená len s dostupnosťou izolovaných nukleových kyselín v množstve dostatočnom na spracovanie a získanie spoľahlivej informácie, ale aj s možnosťou spracovať niekoľko vzoriek rýchlo a s obmedzeným zasahovaním človeka. Väčšina genetických informácií sa doteraz generuje použitím technológií, ako napríklad gélovej elektroforézy, ktoré sú ťažkopádne, pracné, je zložitá ich automatizovať a vyžadujú relatívne veľké zariadenia. Navyše, takéto metódy vo všeobecnosti umožňujú len individuálne spracovanie každej nukleokyselinovej entity, ktorá sa má sekvenovať. Preto sa vyvinuli mnohé technológie poskytujúce špecifické riešenia umožňujúce paralelnú analýzu niekoľkých odlišných nukleových kyselín.

V predchádzajúcom stave techniky bolo bežnou cestou ako zvýšiť výkonnosť paralelné spracovanie mnohých vzoriek použitím tuhého podkladu, často definovaného ako „DNA mikrorada“ alebo DNA čip“, na ktorom sú nukleové kyseliny imobilizované a potom analyzované použitím rôznych prístupov zahŕňajúcich buď značené jednotlivé nukleotidy, alebo značené nukleové kyseliny (Southern E a ďalší, Nat Genet. 1999, 21(dodatok 1): 5-9; Lockhart DJ a Winzeler EA, Nature

2000, 405(6788): 827-36). Veľké molekuly (napr. molekuly dlhšie ako 500 nukleotidov), ako aj menšie molekuly, ako napríklad oligonukleotidové primery, je možné účinne pripojiť na tuhý podklad kovalentným spôsobom fyzikálnym alebo chemickým prostriedkom, buď nešpecificky, alebo použitím špecifickej chemickej skupiny na jednom konci (Adessi C a ďalší, *Nucleic Acids Res* 2000, 28(20): E87; Okamoto T a ďalší, *Nat Biotechnol* 2000, 18(4): 438-41). Kombinácia vhodných robotických zariadení, mikromechanických systémov a mikroskopických techník technicky umožňuje usporiadané uloženie a analýzu až miliónov nukleových kyselín na cm² podkladu.

Použitím podobných prístupov je možné získať primerovú predĺžovaciu reakciu prostredníctvom imobilizácie buď primerov, alebo templátových molekúl (WO 91/13075, WO 00/47767). Alternatívne, primery sa môžu zaštepíť na povrch a, v spojení s voľnými primermi v roztoku, umožňujú amplifikáciu a pripojenie PCR produktu na povrch (Andradis JD a Chrisey LA, *Nucleic Acids Res* 2000, 28(2): e5). Primery môžu byť imobilizované aj na matrici a templátové molekuly sa môžu udržiavať v kvapalnej fáze v rozsahu teplôt (58 °C až 74 °C) umožňujúcim, veľmi náhodným a nekontrolovaným spôsobom, rovnováhu medzi jednovlákovou a dvojlákovou formou, ako aj jednobázové predĺženie (Dubiley S a ďalší, *Nucleic Acids Res* 1999, 27(18): e19).

Hlavnou nevýhodou týchto technológií je to, že pre každú aplikáciu sa najprv musí navrhnuť a vyrobiť DNA čip, čo je stále dosť dlhá, zložitá a nákladná operácia, a preto sa to oplatí len vtedy, keď je potrebné veľké množstvo čipu. Navyše, čipy sa môžu často použiť len na hybridizáciu a/alebo jednu báзовú elongáciu, a nie sú opätovne použiteľné, a na každom čipe sa môže v jednom čase spracovať len jedna vzorka nukleových kyselín (Cheung VG a ďalší, *Na. Genet.* 1999, 21(dodatok 1): 15-9; Bowtell DD, *Nat Genet.* 1999, 21(dodat. 1): 25-32).

V súčasnosti sa vyvinuli aj iné technológie, ktoré aspoň čiastočne riešia problémy súvisiace s amplifikačnou a sekvenovacou účinnosťou, prostredníctvom účinnejšieho spojenia týchto dvoch procesov.

WO 96/04404 (Mosaic Technologies Inc.) opisuje spôsoby detekcie cieľovej nukleovej kyseliny, ktorá sa potenciálne nachádza vo vzorke. Spôsob zahŕňa indukciu PCR amplifikácie cieľovej molekuly len vtedy, keď sa cieľová nukleová

kyselina nachádza v testovanej vzorke. Špecifické primery sa pripoja na tuhý podklad, čo umožňuje, aby sa aj amplifikované cieľové nukleokyselinové sekvencie pripojili na takýto podklad. Dvojvláknové špecifické primery sú, ako pri bežnej PCR, špecificky navrhnuté tak, aby hybridizovali so sekvenciami ohraničujúcimi cieľovú sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať, alebo so sekvenciami vo vnútri cieľovej sekvencie, ktorá sa má amplifikovať, a poháňajú štandardný termocyklizačný proces.

Prvým krokom v tomto PCR amplifikačnom procese je hybridizácia cieľovej nukleovej kyseliny s prvým špecifickým primerom pripojeným na podklad („primer 1“). Prvý elongačný produkt, ktorý je komplementárny s cieľovou nukleovou kyselinou, sa potom vytvára predlžovaním sekvencie primeru 1. Potom, ako sa na podklad pôsobí vysokými teplotami nevyhnutnými na dehybridizáciu vlákien, cieľová nukleová kyselina sa uvoľní a môže potom participovať na ďalších hybridizačných reakciách s inými primer 1 sekvenciami, ktoré môžu byť pripojené na podklad. Prvý pripojený elongačný produkt môže potom hybridizovať s druhým špecifickým primerom („primer 2“), ktorý je tak isto pripojený na podklad a druhý elongačný produkt, ktorý je komplementárny s prvým elongačným produktom, sa potom môže vytvárať predlžovaním sekvencie primeru 2, a je tak isto pripojený na podklad. Takže cieľová nukleová kyselina a prvý a druhý elongačný produkt sú templátové molekuly, ktoré sú schopné participovať na množstve rôznych hybridizačných a predlžovacích procesoch, ktoré sú obmedzené len počiatočnou prítomnosťou cieľovej nukleovej kyseliny a počtom primer 1 a primer 2 sekvencií, ktoré sú prítomné na začiatku. Konečným výsledkom je množstvo kópií cieľovej sekvencie pripojených na povrchu.

Amplifikačná technika opísaná v tomto dokumente sa vo všeobecnosti nazýva ako „mostová amplifikácia“, keďže po prvom cykle, keď je templát v roztoku, sa tak templát, ako aj primerové molekuly imobilizujú na podklade cez ich 5' koniec, čím sa vytvorí typická štruktúra podobná mostu, keď hybridizujú.

Keďže tento amplifikačný proces umožňuje imobilizáciu len cieľovej nukleovej kyseliny, monitorovanie podkladu umožňuje všeobecne kvalitatívne hodnotenie prítomnosti alebo neprítomnosti cieľovej sekvencie vopred definovanej operátorom, keď sa navrhujú primery. Mostová amplifikácia sa preto môže použiť ako vysoko

výkonná sekvenčná analytická metóda, pri ktorej sa rôzne sady prvých a druhých primerov zoraďujú v rôznych oblastiach tuhého podkladu, a pri ktorej nie je potrebná analýza cieľovej sekvencie po jednotlivých bázach. Navyše, takáto technológia môže poskytnúť podstatné zlepšenie seriálnej analýzy rôznych sekvencií a/alebo vzoriek, stačí ak sú známe primery špecifické pre každú odlišnú cieľovú sekvenciu, a keď sa môže cieľová sekvencia amplifikovať v podobných amplifikačných podmienkach.

Iné technológie sa pokúšali účinnejšie využiť mechanizmus, ktorý je základom mostovej amplifikácie. WO 98/44151 (Glaxo) opisuje ako prostredníctvom skonštruovania všetkých nukleokyselinových templátov, ktoré sa majú analyzovať s prídavkom spojovníkových sekvencií, komplementárnych s imobilizovanými primermi, na ich koncoch, sa môže každá templátová molekula v roztoku náhodne zoradiť a amplifikovať bez ohľadu na ich skutočnú sekvenciu. Týmto spôsobom sa identické PCR amplifikačné produkty imobilizujú s vysokou hustotou v diskretnej oblasti tuhého podkladu, ktorá sa nazýva „DNA kolónia“, kvôli podobnosti s bakteriálnymi kolóniami, ktoré sa pozorujú na platni. Každá DNA kolónia môže byť vizualizovaná a analyzovaná jednotlivo, napríklad hybridizáciou so značenými referenčnými sekvenciami alebo použitím prístupu založeného na predĺžovaní primeru. WO 00/18957 (Appl. Res. Syst.) opisuje ako zlepšiť účinnosť mostovej amplifikačnej technológie simultánnou imobilizáciou tak primerových, ako aj templátových molekúl na tuhom podklade pred tým, ako amplifikácia skutočne začne.

Podstatným obmedzením technológií založených na mostovej amplifikácii je to, že keď sa zvolí akákoľvek špecifická primerových sekvencií alebo imobilizačná stratégia, neexistuje žiadna zmienka o tom, ako uskutočňovať proces v izotermálnych podmienkach (tzn. bez nevyhnutnosti termocykizačného procesu) a preto stále trpia rovnakými obmedzeniami, ktoré sú spojené s PCR. Hoci je možné aplikovať znížený počet cyklov, vďaka citlivosti analýzy a vizualizačným systémom, existuje ďalšia komplikácia v tom, že dehybridizačná teplota môže ovplyvňovať uniformitu tuhého podkladu, ako aj stabilitu nukleových kyselín naviazaných na podklad. Avšak žiadny z izotermálnych amplifikačných systémov opísaných v predchádzajúcom stave techniky nedosahuje zároveň takú hustotu rôznych

templátových molekúl, ktoré sa môžu amplifikovať a analyzovať simultánne, a nezávisle, čo je charakteristické pre mostovú amplifikačnú technológiu.

Preto by bolo výhodné navrhnúť spôsob, v ktorom by sa hybridizácia primerov, predlžovanie vlákien a oddeľovanie vlákien uskutočňovali kontinuálnym spôsobom pri konštantnej teplote, pričom by sa aplikovali princípy mostovej amplifikácie. V skutočnosti je kritickejšim bodom dosiahnutie separácie vlákien, keďže na riešenie tohto problému bola v doterajšom stave techniky opísaná len teplota alebo použitie komplexu a špecifických techník. WO 97/47767 (Sarnoff Corp.) navrhol použitie chemických alebo elektrostatických denaturačných postupov aplikovaných v amplifikačných procesoch. Avšak takéto procedúry vyžadujú vysoko špecifické materiály, ako napríklad zariadenie na generovanie elektrického poľa, alebo chemikálie, ako napríklad NaOH, ktoré sú slabo kompatibilné s bežnými amplifikačnými postupmi a vyžadujú špecifické ďalšie kroky (tzn. modifikáciu primerov, odmyvávanie chemikálií pred reštartovaním elongácie).

Mostová amplifikačná technológia by poskytla ďalšie výhody, ak by bolo možné spustiť jednoduchú separáciu vlákien v izotermálnych podmienkach, za predpokladu, že separácia vlákien by bola možná len po ukončení elongácie, alebo ak nie po ukončení, tak bez porušenia nukleokyselinovej polymerázy ukončujúcej elongáciu.

Teraz sa zistilo, že separácia vlákien dvojvláknovej nukleovej kyseliny, imobilizovanej prostredníctvom 5' konca oboch vlákien na rovnakom tuhom podklade, sa môže jednoducho dosiahnuť v izotermálnych podmienkach, ak dĺžka nukleovej kyseliny obmedzuje možnosť ohnutia sa. Tento biofyzikálny znak bol úspešne využitý na izotermálne generovanie DNA kolónií použitím mostovej amplifikácie.

Podstata vynálezu

Flexibilita makromolekuly sa tradične meria ako perzistenčná dĺžka, čo je minimálna veľkosť makromolekuly, ktorú musí mať, aby sa mohla točiť bez toho, aby sa významne modifikovala jeho lokálna štruktúra. Pri koncentráciách solí, ktoré sú kompatibilné s aktivitou nukleokyselinových polymeráz, táto dĺžka zodpovedá

približne 5 nanometrom (alebo 15 bázam) pre jednovláknovú DNA a približne 50 nanometrom (alebo 150 bázovým párom) pre dvojláknovú DNA (Tinland B a ďalší, *Macromolecules* 1997, 30 (19): 5763-5765; Williams LD a Maher LJ, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000, 29, 497-521). Inými slovami, dvojláknová DNA, kvôli veľkému počtu nekovalentných interakcií stabilizujúcich jej štruktúru, je oveľa tuhšia ako jednovláknová DNA. Podobné pozorovanie bolo aj v prípade RNA, hoci sa odhad perzistenčnej dĺžky dvojláknovej RNA v literatúre líši od 35 do 72 nanometrov (Zacharias M, *Biopolymers* 2000, 54(7): 547-60; Kezbekus P a ďalší, *Biochemistry* 1995, 4; 34(13): 4354-7). Preto, keď na zakrivenie pôsobia externé podmienky, dvojláknová molekula vydrží oveľa vyššie mechanické napätie ako jednovláknová molekula.

Mnohé biofyzikálne štúdie sa pokúšali kvantifikovať a robiť predpovede destabilizujúcich účinkov energie, ktorá je výsledkom mechanického napätia, na nekovalentné interakcie nachádzajúce sa v dvojláknovej DNA, ktoré môže byť výsledkom transkripcie, superzávitovania alebo mechanickej separácie priliehajúcich 5'/3' koncov (zhrnuté v Strick TR a ďalší, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000, 29, 523-43). Takéto tranzície jednovláknovej/dvojláknovej nukleovej kyseliny sa ukázali ako prirodzený a nekontrolovaný fenomén, keď sa dvojláknová molekula vystaví teplotám blízkym denaturačnej teplote (Dubiley S a ďalší, *Nucleic Acids Res.* 1999, 27(18): e19). Avšak nikdy sa nedemonštrovalo, že takýto fenomén môže byť indukovaný a užitočne využitý, ak sú oba 5' konce (čiastočne alebo úplne) dvojláknových DNA molekúl zároveň imobilizované na tuhom podklade. Navyše, žiadny z týchto dokumentov, ako aj žiadny dokument opisujúci technológie príbuzné s mostovou amplifikáciou, nenavrhuje, že takáto energia môže byť zámerne indukovaná, aby sa obišla termocyklizácia, keď sa uskutočňuje mostová amplifikácia.

Obrázok 1 sumarizuje molekulové mechanizmy, ktoré sú základom predloženého vynálezu.

Keď sa komplementárne sekvencie patriace k jednovláknovým primerom (a' a a'') a templátom (b) imobilizujú na 5' konci na tuhý podklad (c), sú dostatočne blízko na to, aby mohli hybridizovať (1), každý primer/templát hybridizačný produkt je viac

alebo menej silno stočený, v závislosti na vzdialenosti medzi imobilizovanými 5' koncami (obrázok 1A).

V prítomnosti amplifikačného roztoku (d) môže molekula (e) nukleokyselinovej polymerázy začať predlžovanie nového vlákna, ktorý je kópiou imobilizovaného templátu, z 3' konca hybridizovaného primeru (2). Dvojvláknová oblasť sa následkom toho predlžuje od počiatkovej hybridizačnej oblasti a komplex obsahuje progresívne sa zvyšujúce množstvo umelo stočenej, dvojvláknovej nukleovej kyseliny (obrázok 1B).

V priebehu predlžovania, dvojvláknový segment vzdialený od polymerázy môže byť denaturovaný spontánne, účinkom mechanického napätia indukovaného kontrastom medzi tuhosťou dvojvláknovej konformácie a ohybom spôsobeným fixovanou polohou 5' konca oboch vlákien (3). Nevalentné interakcie, stabilizujúce dvojvláknovú nukleovú kyselinu, môžu generovať súhlasné mechanické napätie, ak nie je templát dosť dlhý na to, aby zahrnul takúto tuhú štruktúru do stočenej konfigurácie. Dvojvláknová časť molekuly môže stále menej a menej akceptovať vyvíjaný ohyb s rastúcim počtom nevalentných interakcií nachádzajúcich sa v molekule, a mechanické napätie sa môže eliminovať len redukovaním časti templátu do dvojvláknovej konfigurácie. V tomto momente, je časťou, ktorá je slabšie asociovaná, a preto jednoduchšie absorbuje takéto napätie, 3' koniec templátovej molekuly, nachádzajúci sa distálne od postupujúcej nukleokyselinovej polymerázy, ktorý sa môže stať jednovláknovým. Ohybom indukované napätie sa následne zníži a polymeráza môže postupovať ďalej, až kým napätie nie je opäť príliš silné na to, aby bolo absorbované. Keďže tento proces je nepretržitý, molekuly dvojvláknovej nukleovej kyseliny sa progresívne „odzipsujú“, pričom 3' koniec ostáva prístupný na hybridizáciu s iným primerom (4) a druhá molekula DNA polymerázy môže iniciovať druhú kópiu templátu (5). Tento proces sa môže uskutočňovať aj ako proces postupujúci bázu za bázou. Otvorenie vlákna o 1 až 2 bázy na 3' konci templátu aktivované mechanickým napätím by mohlo byť spojené so zabudovaním 1 až 2 báz polymerázou na 3' konci novo syntetizovaného vlákna (obrázok 1C).

Keď je prvá kópia templátu kompletná, alebo je skoro kompletná, DNA polymeráza syntetizujúca druhú kópiu je schopná indukovať aj mechanické napätie pôsobiace na zdieľané vlákno, ktoré sa môže progresívne oddeľovať a odlúčiť od prvého syntetizovaného vlákna (6; obrázok 1D).

Reakcia môže pokračovať až do ukončenia, tzn. dovtedy, kým nie sú dve vlákna templátu obe imobilizované a pripravené na iniciáciu amplifikácie ako je opísané predtým. Keď je ukončená aj druhá kópia templátu alebo je skoro ukončená, 5' jednovlákový koniec templátu sa môže uvoľniť (7) a hybridizovať s iným imobilizovaným primerom, ktorý je v jeho blízkosti (8), zatiaľ čo iná molekula nukleokyselinovej polymerázy môže reštartovať syntézu (9). Zároveň môže prvá jednovlákonová kópia hybridizovať s iným primerom (10) a iniciovať nový kopírovací dej (11). Tento proces, ako je znázornené na obrázku 1E, umožňuje novo syntetizovaným kópiám kontinuálny prechod na jednovláknové nukleové kyseliny prostredníctvom mechanickým napätím poháňaného oddeľovania a vytesňovania vlákna, ktoré môže byť reprodukované akoukoľvek imobilizovanou templátovou molekulou hybridizujúcou s imobilizovaným primerom bez akejkoľvek externe generovanej cyklizačnej aktivity.

Predložený vynález ukazuje, že flexibilné znaky nukleových kyselín, ktoré sú značne rozdielne, keď je nukleová kyselina buď v jednovláknovej, alebo v dvojláknovej forme, umožňujú čiastočné uvoľnenie templátov vo forme jednovláknovej molekuly, pričom stále pokračuje polymerizácia. Prekvapujúco, predložený vynález ukazuje aj to, že tento dej neovplyvňuje aktivitu polymerázy, ale môže byť použitý na poháňanie izotermálnej amplifikácie templátovej molekuly na novo syntetizované molekuly, ktoré sú všetky imobilizované v diskretnej oblasti tuhého podkladu.

Zlepšenie mostovej amplifikačnej metódy opísané v predloženej prihláške vynálezu umožňuje exponenciálnu produkciu komplementárnych sekvencií, ktoré majú zmiešané jedno/dvojláknové konfigurácie, v diskretnej oblasti tuhého podkladu, ako DNA kolónie opísané vo WO 98/44151 a WO 00/18957, ale izotermálne a kontinuálnym spôsobom. Keď je množstvo identických amplifikovaných molekúl považované za dostatočné, sekvenovanie a iné analytické metódy opísané v týchto patentových prihláškach sa môžu rovnako aplikovať na

DNA kolónie generované izotermálne, buď na samotnom podklade, alebo na molekulách uvoľnených z DNA kolónií do roztoku metódami opísanými v predchádzajúcom stave techniky.

Kontinuita amplifikačného procesu opísaná v predložennom vynáleze, spolu s izotermálnymi podmienkami poskytuje evidentné výhody oproti predchádzajúcemu stavu techniky v tom, že šetrí čas a náklady na získanie nukleokyselinových molekúl vo forme a množstve umožňujúcom aplikovateľnosť vysoko-výkonných sekvenčných metód. Musí sa podotknúť aj to, že predložený vynález opisuje použitie tuhého podkladu nie len ako nástroja umožňujúceho paralelnú a *posteriori* analýzu amplifikovaných molekúl (čo je dobre známe z predchádzajúceho stavu techniky), ale aj ako komponentu nevyhnutného na uskutočňovanie nukleokyselinovej amplifikácie ako kontinuálneho procesu v izotermálnych podmienkach.

Hoci perzistenčná dĺžka dvojvláknovej DNA zodpovedá 150 bázovým párom, spôsoby podľa vynálezu sa potvrdili ako funkčné v širšom rozsahu dĺžok DNA alebo RNA templátu, rádovo až niekoľko stoviek nukleotidov. Je možné sa domnievať, že tento rozsah by sa mohol ďalej rozšíriť na templáty obsahujúce až 1000 nukleotidov použitím podmienok identifikovaných rovnakými empirickými metódami, ako sú tie opísané v príkladoch predloženej prihlášky vynálezu pre DNA molekuly obsahujúce 68 až 605 nukleotidov.

Podstatou vynálezu je teda spôsob izotermálnej amplifikácie aspoň jedného nukleokyselinového segmentu obsahujúceho do 1000 nukleotidov, ktorý zahŕňa nasledujúce kroky:

- a) vytvorenie aspoň jedného nukleokyselinového templátu obsahujúceho nukleovú kyselinu (kyseliny), ktorá sa má amplifikovať, pričom nukleová kyselina (kyseliny) obsahuje 5' koncovú oligonukleotidovú sekvenciu Y a 3' koncovú oligonukleotidovú sekvenciu Z, a okrem toho, nukleová kyselina (kyseliny) nesie, na 5' konci, prostriedok na imobilizáciu uvedenej nukleovej kyseliny (kyselín) na tuhý podklad;
- b) vytvorenie jedného alebo viacerých kolóniových primerov X, ktoré môžu hybridizovať buď s oligonukleotidovou sekvenciou Z, alebo s oligonukleotidovou sekvenciou Y, a nesú, na 5' konci, prostriedok na imobilizovanie uvedených kolóniových primerov na tuhý podklad;

- c) zmiešanie nukleokyselinového templátu (templátov) a kolóniových primerov spolu s roztokom umožňujúcim ich imobilizáciu prostredníctvom 5' konca na tuhý podklad v prítomnosti tuhého podkladu, aby 5' konce tak nukleokyselinového templátu (templátov), ako aj kolóniových primerov, boli naviazané na uvedený tuhý podklad;
- d) aplikovanie amplifikačného roztoku obsahujúceho aspoň nukleokyselinovú polymerázu a nukleotidové prekurzory, na uvedený tuhý podklad, aby sa izotermálne generovali a imobilizovali nukleové kyseliny majúce sekvenciu zhodnú alebo komplementárnu so sekvenciou imobilizovaného nukleokyselinového templátu (templátov).

Spôsob podľa vynálezu sa úspešne použil na amplifikáciu, izotermálne a na tuhom podklade, jednovláknových DNA molekúl obsahujúcich 68 až 605 báz.

Množstvo imobilizovaných nukleových kyselín v kroku c) determinuje priemerný počet DNA kolónií na povrchovú jednotku, ktoré môžu byť vytvorené prostredníctvom predloženého vynálezu. Výhodné koncentrácie DNA molekúl na imobilizáciu boli v príkladoch determinované medzi 1 nM a 0,01 nM pre templátové molekuly a medzi 1000 a 50 nM pre kolóniové primery. Takéto koncentrácie nukleových kyselín umožňujú generovanie DNA kolónií s hustotou 1000 až 100000 na mm².

Konštantná teplota použitá na amplifikačný proces opísaný vo vynáleze je teplota, pri ktorej zvolená nukleokyselinová polymeráza vykazuje optimálnu aktivitu. Príklady budú ilustrovať, že nukleokyselinové polymerázy bežne používané v nukleokyselinových amplifikačných systémoch známe z doterajšieho stavu techniky, môžu byť tiež použité na uskutočňovanie spôsobu podľa vynálezu pri teplotách medzi 70 °C a 85 °C alebo výhodnejšie, pri teplotách medzi 77 °C a 81 °C. Tento rozsah je funkčný aj na hybridizácie, keďže pri týchto teplotách je vo všeobecnosti redukovaná nešpecifická hybridizácia primer-templát.

Výraz „izotermálny“, tak ako sa používa tu, je ekvivalentný výrazu „v podstate pri rovnakej teplote“ a znamená, že akékoľvek odchýlky od teploty, ktorá bola na začiatku zvolená na uskutočňovanie spôsobu so špecifickou nukleokyselinovou polymerázou, sú v rozsahu odchýlky komerčného termostatu.

Výraz „tuhý podklad“, tak ako sa používa tu, označuje akýkoľvek tuhý podklad, na ktorý je možné pripojiť nukleové kyseliny, ako napríklad latexové guľôčky, dextransové guľôčky, polystyrénové povrchy, polypropylénové povrchy, polyakrylamidový gél, zlaté povrchy, sklenené povrchy a kremičité membrány. Výhodne je tuhým podkladom sklenený alebo polystyrénový povrch.

Výraz „nukleokyselinový templát“, tak ako sa používa tu, označuje entitu obsahujúcu nukleovú kyselinu (DNA alebo RNA), ktorá sa má amplifikovať, a prezentuje sa reakčnej zmesi ako jednovláknová, dvojvláknová alebo zmiešaná jedno-dvojvláknová nukleová kyselina. Nukleotidy vytvárajúce nukleokyselinové templáty môžu byť prirodzene sa vyskytujúcimi alebo neprirodzene sa vyskytujúcimi nukleotidmi.

Výraz „kolóniový primer“, tak ako sa používa tu, označuje entitu, ktorá obsahuje oligonukleotidový primer, ktorý môže byť imobilizovaný na tuhom podklade použitím svojho 5' konca a je schopný hybridizovať s komplementárnou sekvenciou použitím svojho 3' konca na iniciáciu špecifickej polymerázovej reakcie.

Výraz „degenerované primerové sekvencie“, tak ako sa používa tu, označuje krátku oligonukleotidovú sekvenciu, ktorá je schopná hybridizovať s akýmkoľvek nukleokyselinovým fragmentom bez ohľadu na sekvenciu tohto nukleokyselinového fragmentu.

Výraz „prostriedok na imobilizáciu nukleových kyselín na podklad“, tak ako sa používa tu, označuje akýkoľvek chemický alebo nechemický pripájací spôsob vrátane chemicky modifikovateľných funkčných skupín. „Pripojenie“ sa týka imobilizácie nukleovej kyseliny na tuhé podklady buď prostredníctvom kovalentného pripojenia, alebo prostredníctvom nekovalentného pripojenia.

Výraz „chemicky modifikovateľná funkčná skupina“, tak ako sa používa tu, označuje skupinu, ktorou je napríklad fosfátová skupina, karboxylová alebo aldehydová skupina, tiolová alebo aminoskupina.

Výraz „nukleokyselinová kolónia“, tak ako sa používa tu, označuje diskrétnu oblasť zahŕňajúcu množstvo kópií dvoch komplementárných nukleokyselinových vlákien.

Výraz „derivatizovaný povrch“, tak ako sa používa tu, označuje povrch, ktorý bol modifikovaný s chemickými reaktívnymi skupinami, napríklad aminoskupinou, tiolovou alebo akrylátovou skupinou.

Výraz „funkcionalizovaný povrch“, tak ako sa používa tu, označuje derivatizovaný povrch, ktorý bol modifikovaný so špecifickými funkčnými skupinami, napríklad maleínovu alebo sukcinátovou funkčnou skupinou.

Nukleové kyseliny, ktoré môžu byť amplifikované v súlade so spôsobmi podľa vynálezu, zahŕňajú DNA, napríklad genomickú DNA, komplementárnu DNA, rekombinantnú DNA alebo akúkoľvek formu syntetickej alebo modifikovanej DNA. Ich dĺžka môže byť v rámci templátových molekúl imobilizovaných na tuhom podklade rôzna, a môžu byť fragmentami alebo menšími časťami väčších nukleokyselinových molekúl, ktoré majú známu alebo neznámu sekvenciu. Nukleové kyseliny, ktoré sa majú amplifikovať môžu byť odvodené z akéhokoľvek zdroja (napr. genomické DNA fragmenty získané limitovaným štiepením s restriktívnym enzýmom). Avšak, môžu vyžadovať ďalšie spracovanie pred tým, ako sa použijú v spôsoboch podľa vynálezu použitím štandardných techník genetického inžinierstva, ako sú sumarizované vo WO00/18957, najmä na pridanie Y a Z sekvencie na hybridizáciu s kolóniovými primermi. V prípade mRNA, sa izolovaná mRNA môže transformovať na cDNA použitím reverznej transkriptázy a, eventuálne, na dvojvláknovú DNA pred adaptovaním pre spôsoby podľa vynálezu.

Alternatívne, bez ohľadu na to, či je templátom prirodzená, syntetická alebo modifikovaná RNA molekula, môže sa priamo amplifikovať spôsobom podľa vynálezu použitím špecifického enzýmu známeho v oblasti, ktorý môže generovať dvojvláknovú RNA vychádzajúc z jednovláknovej RNA.

Nukleokyselinové templáty podľa vynálezu neobsahujú len nukleovú kyselinu, ktorá sa má amplifikovať, ale aj oligonukleotidovú sekvenciu Y a Z, ktoré sú známymi sekvenciami a môžu mať rôznu dĺžku. Oligonukleotidové sekvencie Y a Z na použitie v spôsoboch podľa predloženého vynálezu majú výhodne dĺžku aspoň päť nukleotidov, výhodne 5 až 100 nukleotidov a výhodnejšie približne 20 nukleotidov.

Oligonukleotidové sekvencie Y a Z podľa vynálezu sa môžu pripraviť použitím techník, ktoré sú v oblasti štandardné alebo bežné, alebo sa môžu kúpiť

z komerčných zdrojov. Ak existujú rôzne nukleokyselinové sekvencie, ktoré sa majú amplifikovať, potom sa pripojenie oligonukleotidov Y a Z môže uskutočňovať v rovnakej alebo v rôznych reakciách.

Oligonukleotidové sekvencie Y a Z, nachádzajúce sa na 5', respektíve 3' konci nukleokyselinového templátu, nemusia byť lokalizované na úplných koncoch templátu. Napríklad, hoci sú oligonukleotidové sekvencie Y a Z výhodne lokalizované na alebo v blízkosti 5', respektíve 3' konca nukleokyselinového templátu (napríklad v rámci 0 až 100 nukleotidov 5' a 3' konca), môžu byť lokalizované oveľa ďalej (napr. viac ako 100 nukleotidov) od 5' a 3' konca nukleokyselinového templátu, za predpokladu, že sekvencie Y a Z ohraničujú nukleokyselinovú sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať, nie je dlhšiu ako 1000 báz.

Po pripravení nukleokyselinového templátu sa tento môže pred použitím spôsobov podľa predloženého vynálezu amplifikovať. Takáto amplifikácia sa môže uskutočňovať použitím spôsobov, ktoré sú v oblasti dobre známe a dokumentované, napríklad začlenením templátovej nukleovej kyseliny do expresného vektora a jeho amplifikáciou vo vhodnom biologickom hostiteľovi, alebo jeho amplifikáciou prostredníctvom PCR. Avšak tento amplifikačný krok nie je nevyhnutný, keďže spôsob podľa vynálezu umožňuje produkovať viacnásobné kópie nukleokyselinového templátu v nukleokyselinovej kolónii generovanej z jedinej kópie nukleokyselinového templátu, a môže sa uskutočňovať len na zavedenie 5' chemicky modifikovanej imobilizačnej skupiny, ako je uvedené v príkladoch.

Eventuálne sa nukleokyselinový templát môže imobilizovať na tuhom podklade ako dvojvláknová molekula, ale môže sa imobilizovať aj v jednovláknovej forme použitím spôsobov, ktoré sú v oblasti dobre známe a dokumentované, napríklad zahrievaním na približne 94 °C a rýchlym ochladením na 0 °C na ľade alebo premytím v 0,1 až 0,5M NaOH.

Sekvencia (sekvencie) obsiahnutá v kolóniovom primeri a sekvencia komplementárna s oligonukleotidovými sekvenciami obsiahnutými v templáte (templátoch) sú zvolené tak, aby mali maximálnu hybridizačnú aktivitu s akokoľvek inou sekvenciou. Kolóniové primery môžu mať dĺžku 5 až 100 báz, ale výhodne 15

až 25 báz. V príméri sa môžu nachádzať prirodzene sa vyskytujúce alebo iné ako prirodzene sa vyskytujúce nukleotidy.

Jeden alebo dva rôzne kolóniové primery môžu byť použité na generovanie nukleokyselinových kolónií v spôsoboch podľa predloženého vynálezu. V základnom uskutočnení, dva rozdielne kolóniové primery, X' a X'' sa zmiešajú s nukleokyselinovým templátom (templátmi) v kroku c) a sekvencie kolóniových priemrov X' a X'' sú také, že oligonukleotidová sekvencia Z môže hybridizovať s jedným z kolóniových primerov X' a oligonukleotidová sekvencia Y je rovnaká ako jeden z kolóniových primerov X''. Alternatívne je oligonukleotidová sekvencia Z komplementárna s oligonukleotidovou sekvenciou Y a kolóniový primer Y má rovnakú sekvenciu ako oligonukleotidová sekvencia Y.

Keď sa produkujú nukleokyselinové templáty a primery podľa vynálezu, je možné zaviesť ďalšie želatelné sekvencie spôsobmi, ktoré sú dobre známe a dokumentované v oblasti. Takéto ďalšie sekvencie zahŕňajú napríklad miesta rozoznávané restričnými enzýmami, modifikované nukleotidy alebo iné nukleokyselinové prívesky umožňujúce identifikáciu a izoláciu amplifikovaných produktov obsahujúcich danú nukleokyselinovú templátovú sekvenciu. Iné želatelné sekvencie zahŕňajú spätne stočené DNA sekvencie (ktoré tvoria vlásenkové slučky alebo iné sekundárne sekundárne štruktúry, keď sú jednovláknové), „kontrolné“ DNA sekvencie, ktoré riadia proteín/DNA interakcie, ako napríklad promótor, zosilňovač, počiatok replikácie alebo operátorovú DNA sekvenciu, ktorá je rozoznávaná špecifickými DNA-viažucimi proteínmi.

Kolóniové primery podľa predloženého vynálezu môžu zahŕňať aj degenerované primerové sekvencie. Takéto degenerované primery tak nevyžadujú prítomnosť oligonukleotidových sekvencií Y alebo Z v nukleotidovom templáte (templátoch) na to, aby nastala hybridizácia s templátom, hoci použitie degenerovaných primerov na hybridizáciu s templátom obsahujúcim oligonukleotidové sekvencie X alebo Y nie je vylúčené. Avšak na použitie v amplifikačných spôsoboch podľa predloženého vynálezu musia degenerované primery hybridizovať s nukleokyselinovými sekvenciami v templáte v miestach nachádzajúcich sa na oboch stranách alebo ohraničujúcich nukleokyselinovú sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať.

5' koniec nukleokyselinového templátu a primerov pripravených ako je opísané vyššie, sa modifikuje tak, aby niesol prostriedok imobilizujúci 5' konce tak nukleokyselinového templátu (templátov), ako aj kolóniových primerov. Imobilizácia nukleových kyselín použitím 5' konca necháva 3' koniec vzdialený od podkladu tak, že 3' oblasť templátov a primeru môže hybridizovať a poháňať syntézu nového vlákna.

Hybridizačný protokol by mal zabrániť uvoľňovaniu templátov a primerov z tuhého podkladu v priebehu izotermálnej amplifikácie. Preto sú prostriedkami na imobilizáciu výhodne chemicky modifikovateľné funkčné skupiny, ktoré umožňujú vytvorenie kovalentnej väzby medzi uvedenými molekulami a tuhým podkladom s derivatizovaným povrchom, ktorý sa následne modifikuje s bifunkčnými krížovo prepájajúcimi skupinami, aby sa poskytol funkcionalizovaný povrch. Alternatívne, imobilizácia sa môže získať ireverzibilnou pasívnou adsorpciou alebo využitím afinity medzi špecifickými molekulami (napríklad imobilizácia na avidínom pokrytom povrchu prostredníctvom biotinylovaných molekúl).

Príklady chemicky modifikovateľných funkčných skupín na pripojenie na 5' koniec nukleových kyselín, ktoré sa majú imobilizovať, sú tiolová, hydroxylová, dimetoxyltritylová (DMT), aminoskupina alebo fosfátová skupina, ako aj karboxy-cyklická alebo aldehydová skupina. Príklady sieťujúcich činidiel užitočných na derivatizovanie tuhého podkladu sú hydrochlorid 1-etyl-3-(3-dimetylamino-propyl)-karbodiimidu (EDC), anhydrid kyseliny jantárovej, anhydrid kyseliny fenyldiizotio-kyanátovej alebo maleínovej, alebo hetero-bifunkčné sieťujúce činidlo, ako napríklad *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysukcinimidový ester (MBS), *N*-sukcínimidyl[4-jódacetyl]aminobenzoát (SIAB), sukcinimidyl-4-[*N*-maleimidometyl]cyklohexán-1-karboxylát (SMCC), *N*- γ -maleimidobutyryloxysukcinimidový ester (GMBS), sukcinimidyl-4-[*p*-maleimidofenyl]butyrát (SMPB) a zodpovedajúce sulfónové (vo vode rozpustné) zlúčeniny. Najvýhodnejšie sú nukleokyselinové templáty a primery modifikované s tiolovou, fosfátovou skupinou alebo aminoskupinou na 5' koncovej modifikácii a imobilizované použitím imobilizačného roztoku obsahujúceho hydrochlorid 1-etyl-3-(3-dimetylamino-propyl)karbodiimidu (EDC) ako sieťujúce činidlo.

Hoci tuhým podkladom môže byť akýkoľvek tuhý povrch, na ktorý sa môžu imobilizovať nukleové kyseliny, ako napríklad latexové alebo dextransové guľôčky, polystyrénové povrchy, polypropylénové povrchy, polyakrylamidový gél, zlaté povrchy, sklenené povrchy a kremičité membrány, výhodne je tuhý podklad dostatočne rigidný na to, aby nebol ovplyvňovaný silou vyvíjanou v priebehu predlžovania, a aby umožňoval kovalentné pripojenie nukleovej kyseliny prostredníctvom funkcionalizácie použitím mono- alebo bifunkčných sieťujúcich reakčných činidiel, ktoré boli opísané vyššie a vo WO 00/18957. Potom ako sú tak nukleokyselinové templáty, ako aj kolóniové primery podľa vynálezu syntetizované alebo purifikované zo vzorky, a modifikované ako bolo predtým opísané, môžu sa spolu zmiešať v koncentráciách vypočítaných berúc do úvahy údaje uvedené v tejto prihláške vynálezu, ako aj požadovanú hustotu DNA kolónií. Výhodne je koncentrácia templátu subnanomolárna a kolóniové primery sú 50 až 100000 krát koncentrovanejšie.

Keď sa už kolóniové primery a nukleokyselinové templáty imobilizujú na tuhý podklad, môžu sa generovať DNA kolónie podľa vynálezu prostredníctvom uskutočňovania izotermálnej amplifikačnej reakcie, ako je znázornená na obrázku 1, tak, aby každá kolónia obsahovala množstvo kópií pôvodne imobilizovaného nukleokyselinového templátu a jeho komplementárnej sekvencie. Hranica vytvorenej nukleokyselinovej kolónie je limitovaná na relatívne lokálnu oblasť, na oblasť v ktorej sa imobilizovala počiatočná templátová nukleová kyselina. Je zrejmé, že keď sa syntetizuje viac kópií templátovej molekuly a jej komplementu uskutočňovaním amplifikačného spôsobu podľa vynálezu, potom sa bude môcť hranica generovanej nukleokyselinovej kolónie rozšíriť ďalej, hoci hranica vytvorenej kolónie je stále limitovaná malou časťou tuhého podkladu, na ktorej boli nukleové kyseliny imobilizované.

Veľkosť a počet DNA kolónií môžu byť kontrolované modulovaním času, v priebehu ktorého sa tuhý podklad podrobuje izotermálnej amplifikácii. Takže počet nukleokyselinových kolónií vytvorených na povrchu tuhého podkladu je závislý na počte nukleokyselinových templátov, ktoré sú na začiatku imobilizované na podklad, za predpokladu, že existuje dostatočný počet imobilizovaných kolóniových primerov vo vzdialenosti umožňujúcej hybridizáciu s templátovými molekulami. Prostred-

níctvom kontroly počiatkovej hustoty nukleokyselinových templátov a primerov sa môže dosiahnuť optimálna situácia, kedy sa môže izotermálne produkovať vysoká hustota jednotlivých nukleokyselinových kolónií na tuhom podklade s veľkosťou dostatočnou na to, aby sa umožnila ich analýza, a s obsahom dostatočného počtu amplifikovaných sekvencií.

Izotermálna amplifikácia opísaná v predloženej prihláške vynálezu sa môže uskutočňovať použitím DNA- alebo RNA-závislej DNA polymerázy spolu s dodávaním nukleozidtrifosfátových molekúl alebo akýchkoľvek iných nukleotidových prekursorov, napríklad modifikovaných nukleozidtrifosfátových molekúl.

Príkladmi nukleokyselinových polymeráz, ktoré môžu byť používané v predloženej prihláške vynálezu, sú DNA polymeráza (Klenowov fragment, T4 DNA polymeráza), termostabilné DNA polymerázy (Perler F. B. a ďalší, *Adv. Protein Chem.* 1996, 48: 377-435) identifikované a klonované v rôznych termostabilných baktériách (ako napríklad Taq, VENT, Pfu, Tfi DNA polymerázy), ako aj ich geneticky modifikované deriváty (TaqGold, VENTexo, Pfuexo). Výhodne je nukleokyselinová polymeráza používaná na predlžovanie kolóniového primeru stabilná pri teplote, pri ktorej je výsledok hybridizácie primeru s templátom dostatočne špecifický na to, aby sa vylúčili nekompletné alebo falošné amplifikácie templátu.

Amplifikačný roztok obsahuje výhodne, ako nukleotidové prekursor, deoxyribonukleotidové trifosfáty, napríklad dATP, dTTP, dCTP, dGTP, prirodzene alebo neprirodzene sa vyskytujúce, napríklad modifikované s fluorescenčnou alebo rádioaktívnou skupinou. Veľké množstvo rôznych synteticky modifikovaných nukleových kyselín bolo vyvinuté pre chemické a biologické metódy, aby sa zvýšila detegovateľnosť a/alebo funkčná diverzita nukleových kyselín. Tieto funkcionalizované/modifikované molekuly môžu byť plne kompatibilné s prirodzenými polymerizujúcimi enzýmami, pričom si zachovávajú párovanie báz a replikačné vlastnosti prirodzených náprotivkov, čoho prehľad bol v súčasnosti urobený v Thum O a ďalší, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40(21): 3990-3993.

Keď je templátom buď RNA, alebo DNA molekula, a je žiadateľné získať amplifikačné produkty vo forme dvojvláknovej RNA, nukleokyselinovou polymerázou môže byť RNA- alebo DNA-závislá RNA polymeráza, napríklad vírusová RNA

replikáza alebo ribozým (Johnston WK a ďalší, Science 2001, 292(5520): 1319-25; Tayon R ml a ďalší, Nucleic Acids Res 2001, 29(17): 3576-92). Amplifikačný roztok bude preto obsahovať ako nukleotidové prekurzory ribonukleotidové trifosfáty.

Iné zložky amplifikačného roztoku sa pridávajú podľa zvolenej nukleokyselinovej polymerázy a v podstate zodpovedajú zlúčeninám, o ktorých je v oblasti známe, že účinne podporujú aktivitu každej polymerázy. Koncentrácie zlúčenín ako je dimetylsulfoxid (DMSO), hovädzí sérový albumín (BSA), Triton X-100 alebo $MgCl_2$ sú v oblasti dobre známe ako dôležité pre optimálnu amplifikáciu a preto môže operátor jednoducho nastaviť takéto koncentrácie pre spôsoby podľa predloženého vynálezu na základe nižšie prezentovaných príkladov.

Viacere kópie nukleokyselinových vlákien vytvárajúce kolónie sú vo všeobecnosti imobilizované na tuhom podklade a môžu byť v jednovláknovej, dvojvláknovej alebo zmiešanej jedno-dvojvláknovej konfigurácii, všetky simultánne reprezentované v populácii amplifikovaných molekúl patriacich do jednej DNA kolónie. Preto, ak je v danom spôsobe nevyhnutné všetky nukleokyselinové molekuly, ktoré sa majú analyzovať a/alebo sekvenovať, mať v špecifickej konfigurácii (buď celé, alebo v segmente, o ktorý je záujem), môžu sa aplikovať ďalšie pôsobenia na izotermálne amplifikované produkty, aby boli všetky (alebo aspoň väčšina) v takomto stave. Napríklad sa môže použiť teplotou, chemicky, alebo elektrickým nábojom poháňaná denaturácia na transformáciu všetkých amplifikačných produktov na jednovláknovú DNA. Takéto molekuly môžu teraz hybridizovať účinnejšie s primerom, pridávaným v kvapalnej fáze alebo pripojeným na podklad, ktorý má sekvenciu komplementárnu s vnútornou sekvenciou jedného amplifikovaného vlákna. V závislosti na sekvenčnej metóde môže tento „pomocný“ oligonukleotid umožniť detekciu sekvencie rôznymi spôsobmi. Môže byť značený, alebo môže primovať elongáciu použitím značeného/modifikovaného nukleotidu (nukleotidov). Alternatívne, môže umožniť použitie endonukleolytických enzýmov rozoznávajúcich špecifickú sekvenciu alebo štruktúru vytvorenú po hybridizačnom kroku alebo po elongačnom kroku.

Nukleokyselinové kolónie podľa vynálezu sa môžu generovať v rôznych veľkostiach a hustotách v závislosti na použitých podmienkach. Veľkosť kolónií je výhodne od 0,2 μm do 6 μm . Hustota nukleokyselinových kolónií používaných

v spôsobe podľa vynálezu je typicky 1000/mm² až 100000/mm². Vyššie hustoty, napríklad 100000/mm² až 10000000/mm² sú tiež dosiahnuteľné spôsobmi podľa vynálezu. Limitáciu určujú len technológie obrazovej analýzy (mikroskopy, CCD fotoaparáty, software), ktoré sú v súčasnosti dostupné, a ktoré budú pravdepodobne v budúcnosti prekonané, na jasné rozlíšenie jednotlivých DNA kolónií pri takýchto hustotách.

Potom ako sa izotermálne generujú nukleokyselinové kolónie, rôzne technológie môžu byť použité na simultánnu vizualizáciu a/alebo charakterizáciu jednej alebo viacerých DNA kolónií, napríklad na overenie toho, že hustota a rozmery izotermálne generovaných DNA kolónií sa zhodujú s očakávanou hustotou a rozmermi. V závislosti na špecifickej technike sa výstup analytického spôsobu môže získať monitorovaním buď tuhého podkladu, na ktorom sa uskutočňovala izotermálna amplifikácia, alebo monitorovaním materiálu uvoľneného z takéhoto podkladu v kvapalnej fáze. Voliteľne, nukleokyselinové molekuly, ktoré sa líšia od nukleokyselinovej molekuly (molekúl) použitých na izotermálnu amplifikáciu, sa môžu použiť na špecifické analytické metódy a môžu hybridizovať s amplifikovanými produktmi v kvapalnej fáze, v súlade s optimálnymi hybridizačnými podmienkami, ktoré je možné jednoducho determinovať empiricky, pre každú nukleokyselinovú sekvenciu, použitím spôsobov dobre známych v oblasti.

Kolóniové vizualizačné metódy alebo metódy determinácie sekvencie, ktoré môžu byť použité na DNA kolóniách, boli opísané vo WO 00/18957. Nevyčerpávajúci zoznam takýchto metód zahŕňa hybridizáciu so značenými oligonukleotidmi, začlenenie značených nukleotidov, opätovnú amplifikáciu použitím špecifických sond, použitie DNA viažucich farbičiek, štiepenie so sekvenčne alebo štruktúrne špecifickými endonukleázami a použitie iných DNA modifikujúcich enzýmov (ako napríklad ligáz, metyláz, exonukleáz) a iných DNA viažucich proteínov.

Hustota a rozmer izotermálne generovaných nukleokyselinových kolónií sa môže vypočítať pred sekvenčnou analýzou použitím fluorescenčných detekčných metód, ktoré sú dobre známe pre odborníka v oblasti. Napríklad je možné použiť interkalárne farbivo, ako napríklad etídiumbromid alebo PicoGreenTM (Molecular Probes, Eugene, OR) alebo iné chemické DNA farbiace metódy, ako UlisysTM

(Molecular Probes) na farbenie izotermálne amplifikovaných dvojlákových molekúl imobilizovaných na povrchu a pozorovať výsledok farbenia s epi-fluorescenčným mikroskopom, ako je znázornené na obrázku 3. Akékoľvek zariadenie umožňujúce detekciu a kvantifikáciu príslušnej značky, napríklad fluorescencie alebo rádioaktivity, sa môže použiť na determináciu sekvencie, ako je zhrnuté vo WO 00/18957. Pre odborníka v oblasti sú dobre známe alternatívy k mikroskopu, napríklad skenovacie zariadenie.

Kompletné alebo čiastočné sekvencie jednej alebo viacerých nukleových kyselín sa môžu determinovať determináciou kompletnej alebo čiastočnej sekvencie amplifikovaných nukleokyselinových templátov nachádzajúcich sa vo viac ako jednej DNA kolónii. Takýto ďalší krok (kroky) sa môže uskutočňovať na amplifikovaných nukleových kyselinách buď na samotnom tuhom podklade, alebo po uvoľnení jedného alebo oboch nukleokyselinových vlákien patriacich jednej alebo viacerým DNA kolóniám. Výhodnej sa množstvo rôznych sekvencií determinuje súčasne.

Konkrétne, kdekoľvek je želateľné priame značenie amplifikačného produktu alebo sekvenovanie amplifikačného produktu, značený nukleotid sa môže zahrnúť do amplifikačného roztoku po tom, ako reakcia pokročila dostatočne na to, aby sa detegovali izolované DNA kolónie. Značiaca skupina môže byť rádioaktívna alebo fluorescenčná, ako napríklad texaská červeň, a môže sa pridávať do amplifikačného roztoku, eventuálne spolu s primerom, ktorý je odlišný od primerov použitých na amplifikáciu templátových molekúl v príslušnej koncentrácii (typicky, jedna desatina až jedna tisícina koncentrácie neznačeného dATP). Avšak vysoké koncentrácie značených nukleotidov môžu inhibovať amplifikačný proces, čo je fenomén dobre známy odborníkovi v oblasti iných amplifikačných techník, ako napríklad kvapalnej fázovej PCR.

Preto spôsoby podľa vynálezu zahŕňajú ďalší krok uskutočňovania aspoň jedného kroku determinácie sekvencie jednej alebo viacerých izotermálne amplifikovaných DNA kolónií. Determinácia sekvencie môže byť výsledkom začleňovania značeného oligonukleotidu (oligonukleotidov) využívajúc kolóniové primery alebo iné primery, imobilizované na tuhom podklade alebo v kvapalnej fáze. Alternatívne, determinácia sekvencie môže byť výsledkom hybridizácie so

značeným oligonukleotidom (oligonukleotidmi) alebo uvoľňovania jedného alebo oboch nukleokyselinových vlákien patriacich jednej alebo viacerým nukleokyselinovým kolóniám.

V ďalšom aspekte vynálezu spôsob zahŕňa ďalší krok uvoľňovania jedného alebo oboch nukleokyselinových vlákien patriacich do jednej alebo viacerých DNA kolónií generovaných izotermálne, tak, aby sa mohli znova izolovať z roztoku na ďalšie použitie. Uvoľnenie takejto nukleovej kyseliny sa môže dosiahnuť chemickým, optickým, fyzikálnym alebo enzymatickým prostriedkom, ktorý štiepi väzbu medzi primermi a povrchom alebo špecifickú sekvenciu, štruktúru alebo nukleotid obsiahnuté v amplifikovaných nukleových kyselinách. Napríklad WO 00/58329 (Goldsborough A) poskytuje spôsob odpojenia nukleokyselinovej molekuly od tuhého podkladu prostredníctvom selektívneho štiepenia nie bežného nukleotidu. Alternatívne, sekvencie obsiahnuté v imobilizovaných DNA kolóniách sa môžu znova amplifikovať v kvapalnej fáze, v ktorej sú kolónie ponorené, použitím akejkoľvek zo známych amplifikačných metód, ako PCR.

Akýkoľvek DNA kolóniový detekčný systém sa výhodne používa v kombinácii s analytickým systémom, aby sa determinoval počet a povaha nukleotidov začlenených do každej kolónie okamžite napríklad po kroku predlžovania primeru, alebo neskôr, použitím zaznamenaných údajov umožňujúcich determinovať sekvenciu nukleokyselinového templátu v rámci danej kolónie.

Spôsoby podľa vynálezu sa môžu použiť na generovanie nukleokyselinových kolónií v izotermálnych podmienkach. Nukleokyselinová kolónia podľa vynálezu sa môže generovať z jediného imobilizovaného nukleokyselinového templátu podľa vynálezu. Spôsob podľa vynálezu umožňuje simultánnu produkciu množstva takýchto nukleokyselinových kolónií, z ktorých každá potenciálne obsahuje odlišné imobilizované sekvencie.

Predložená prihláška poskytuje alternatívne riešenie problému urýchlenia nukleokyselinovej amplifikácie a sekvenovania poskytnutím prostriedku na významné uľahčenie procedúr nevyhnutných na izotermálnu amplifikáciu nukleových kyselín na tuhom podklade. Predložený vynález, aj keď je aplikovateľný pre nukleokyselinové sekvencie s limitovanou dĺžkou (do 1000 báz), môže uspokojiť mnohé z rastúcich požiadaviek na vysokovýkonné metódy.

Často, v oblasti genomických a príbuzných štúdií (farmakogenomický výskum, hľadanie liekov, charakterizácia potravín, genotyping, diagnostika, monitoring génovej expresie, vytváranie profilu genetickej diverzity, sekvenovanie celého genómu a študovanie polymorfizmov), sa nukleokyselínové sekvencie, ktoré sa majú determinovať a porovnávať, týkajú niekoľkých stoviek rôznych genomických, rekombinantných alebo retrorepisovaných DNA fragmentov, pričom každá z nich nie je dlhšia ako 1000 báz. Preto sú spôsoby podľa vynálezu výnimočne užitočné, ale nie obmedzené, na identifikáciu DNA sekvencií v situáciách, kedy sa veľa génov alebo mRNAs (napr. 500) z mnohých jedincov (napr. 500) musí sekvenovať simultánne, alebo sa musí simultánne vyhodnocovať skóre veľkého množstva (napr. miliónov) polymorfizmov, alebo sa musí simultánne monitorovať expresia veľkého počtu génov (napr. 100000).

Napríklad, rôzne spôsoby podrobnej analýzy génovej expresie umožňujú charakterizáciu génovej expresie typickej pre bunkové subpopulácie alebo mikro-anatomické štruktúry. Tieto vysoko citlivé techniky často využívajú komplementárnu DNA, ktorá je fragmentovaná na krátke segmenty s dĺžkou 10 až 20 bázových párov („prívesky“), čo je počet báz, ktorý je dostatočný na identifikáciu jednotlivých mRNA druhov, tak, aby sa nahrubo mohlo vypočítať množstvom mRNA kódujúcej proteín, alebo sa porovnať medzi vzorkami prostredníctvom počítania množstva „príveskov“ nachádzajúcich sa vo vzorke asociovanej s takouto mRNA. Tieto segmenty sú zvyčajne tandemovo ligované, aby sa sekvenovali ako v prípade SAGE (seriálna analýza génovej expresie; Velculescu Ve a ďalší, Trends Genet 2000; 16(10); 423-5) alebo v iných systémoch, ktoré sú vždy založené na generovaní príveskov použitím restriktčných endonukleáz typu II (WO 00/53806). Spôsoby podľa vynálezu môžu uľahčiť identifikáciu a počítanie počtu príveskov. Po ligovaní príslušných spojovacích sekvencií na každý prívesok, aby sa umožnila imobilizácia a izotermálna amplifikácia na tuhom podklade, môžu sa jednotlivé DNA kolónie zodpovedajúce danému prívesku vizualizovať, priamo alebo nepriamo sekvenovať a môže sa určiť ich skóre použitím softwaru na analýzu obrazu. Týmto spôsobom sa môže vypočítať frekvencia každého prívesku v cDNA populácii bez ligovania všetkých príveskov v konkataméroch na klonovanie do plazmidov.

Podobný prístup sa môže aplikovať na ESTs alebo na genomickú DNA, aby sa identifikovali haplotypy alebo špecifické SNPs asociované s ochorením alebo s inými fenotypmi, keďže v tomto prípade je fundamentálne identifikovať rýchlo sekvenciu tisícky malých jednotlivých nukleokyselinových segmentov.

Ďalej vynález poskytuje použitie izotermálnej nukleokyselinovej amplifikačnej metódy na tuhom podklade na poskytnutie nukleokyselinových molekúl na použitie na nukleokyselinové sekvenovanie a opätovné sekvenovanie v oblasti štúdií a farmakoštúdií génov a ich funkcií, výskumu liečiv, charakterizácie potravín, genotypingu, diagnostík, monitorovania génovej expresie, vytvárania profilov genetickej diverzity, sekvenovania celého genómu a hľadania polymorfizmov, alebo na akékoľvek iné aplikácie zahŕňajúce amplifikáciu nukleových kyselín.

Ďalej vynález poskytuje kit na izotermálnu nukleokyselinovú amplifikáciu na tuhom podklade na poskytnutie nukleokyselinových molekúl na použitie na nukleokyselinové sekvenovanie a opätovné sekvenovanie v oblasti štúdií a farmakoštúdií génov a ich funkcií, výskumu liekov, charakterizácie potravín, genotypingu, diagnostík, monitorovania génovej expresie, vytvárania profilu genetickej diverzity, sekvenovania celého genómu a hľadania polymorfizmov, alebo na akékoľvek iné aplikácie zahŕňajúce amplifikáciu nukleových kyselín.

Príkladom postupu na identifikáciu a charakterizáciu amplifikačných produktov získaných spôsobmi podľa predloženého vynálezu a založeného na značených nukleotidoch by mohlo byť:

- 1a) generovanie a vizualizácia amplifikovaných nukleových kyselín na tuhom povrchu použitím spôsobov predtým opísaných v predloženej prihláške vynálezu a zaznamenanie výsledku;
- 1b) ošetrovanie amplifikovaných nukleových kyselín, ako napríklad na odstránenie interkalárneho farbiva použitého na vizualizáciu;
- 1c) transformovanie, aspoň čiastočné, amplifikovaných nukleových kyselín na jednovláknové molekuly;
- 1d) poskytnutie oligonukleotidu (oligonukleotidov) v kvapaline alebo v tuhom skupenstve, pričom skupenstvo a/alebo oligonukleotid (oligonukleotidy) môžu byť rovnaké ako tie použité na izotermálnu amplifikáciu alebo môžu byť rozdielne, a oligonukleotid (oligonukleotidy) by mal obsahovať 3'-koncovú sekvenciu schopnú

hybridizovať so sekvenciou nachádzajúcou sa aspoň v jednom amplifikovanom produkte;

1e) poskytnutie podmienok na hybridizáciu medzi oligonukleotidom (oligonukleotidmi) a amplifikovanou molekulou;

1f) poskytnutie nukleokyselinovej polymerázy a aspoň jedného typu značeného nukleotidu v kvapalnom skupenstve, spolu s vhodným tlmivým roztokom, v podmienkach umožňujúcich predlžovanie primera;

1g) detekciu amplifikovaných nukleových kyselín zahŕňajúcich značený nukleotid (nukleotidy), prostredníctvom takejto značky alebo prostredníctvom interakcie tejto značky s amplifikovaným produktom, a zaznamenanie výsledku;

1h) voliteľne odstránenie kvapalnej fázy a opakovanie kroku 1f) a 1g) použitím nukleotidu (nukleotidov) majúcich značku odlišnú od tej, ktorá bola použitá v predchádzajúcom predlžovaní, a zaznamenanie výsledku;

1i) voliteľne opakovanie kroku 1c) až 1f) použitím oligonukleotidov a/alebo značeného nukleotidu (nukleotidov), ktorý sa líši od nukleotidu použitého v predchádzajúcom predlžovaní, a zaznamenanie výsledku.

Vyššie uvedený postup je výnimočne užitočný na umožnenie sekvenovania amplifikovaných produktov podľa vynálezu systémom báza za bázou, pričom relatívne odchýlky výsledkov sú konvertované na signál a porovnávané, aby sa dokázalo začlenenie značeného nukleotidu, ako je opísané vo WO 00/18957.

Príkladom postupu na identifikáciu a charakterizáciu amplifikačných produktov získaných spôsobmi podľa predloženého vynálezu a založeného na značených oligonukleotidoch by mohlo byť:

2a) generovanie a vizualizácia amplifikovaných nukleových kyselín na tuhom povrchu použitím spôsobov predtým opísaných v predloženej prihláške vynálezu a zaznamenanie výsledku;

2b) ošetrovanie amplifikovaných nukleových kyselín, ako napríklad na odstránenie interkalárneho farbiva použitého na vizualizáciu;

2c) transformovanie, aspoň čiastočné, amplifikovaných nukleových kyselín na jednovláknové molekuly;

2d) poskytnutie oligonukleotidu (oligonukleotidov) v kvapaline alebo v tuhom skupenstve, pričom skupenstvo a/alebo oligonukleotid (oligonukleotidy) môžu byť

rovnaké ako tie použité na izotermálnu amplifikáciu alebo môžu byť rozdielne, a oligonukleotid (oligonukleotidy) by mal obsahovať 3'-koncovú sekvenciu schopnú hybridizovať so sekvenciou nachádzajúcou sa aspoň v jednom amplifikovanom produkte;

2e) poskytnutie podmienok na hybridizáciu medzi oligonukleotidom (oligonukleotidmi) a amplifikovanou molekulou;

2f) detekciu amplifikovaných nukleových kyselín hybridizujúcich so značeným oligonukleotidom (oligonukleotidmi) prostredníctvom takejto značky alebo prostredníctvom interakcie tejto značky s amplifikovaným produktom, a zaznamenanie výsledku;

2g) voliteľne opakovanie krokov 2c) až 2f) alebo 2e) až 2f) použitím oligonukleotidu (oligonukleotidov) obsahujúcich odlišnú sekvenciu a/alebo odlišnú značku a zaznamenanie výsledku.

Príkladom postupu na identifikáciu a charakterizáciu amplifikačných produktov získaných spôsobmi podľa predloženého vynálezu a založeného na restričných enzýmoch, by mohlo byť:

3a) generovanie a vizualizácia amplifikovaných nukleových kyselín na tuhom povrchu použitím spôsobov predtým opísaných v predloženej prihláške vynálezu a zaznamenanie výsledku;

3b) ošetrovanie amplifikovaných nukleových kyselín, ako napríklad na odstránenie interkalárneho farbiva použitého na vizualizáciu;

3c) ošetrovanie amplifikovaných nukleových kyselín s roztokom obsahujúcim aspoň jednu restričnú endonukleázu, ktorá potenciálne štiepi dvojvláknovú nukleokyselinovú molekulu nachádzajúcu sa aspoň v jednom amplifikačnom produkte podľa vynálezu a/alebo molekulu získanú po kroku b), spolu s vhodným tlmivým roztokom a podmienkami umožňujúcimi takúto enzymatickú aktivitu;

3d) opätovnú izoláciu uvoľnených nukleových kyselín;

3e) opakovanie kroku 3a) a zaznamenanie výsledku; porovnanie výsledkov vizualizácie pred a po štiepení;

3f) voliteľne opakovanie krokov 3b) až 3e) s odlišnou restričnou endonukleázou a zaznamenanie výsledku.

Po pochopení znakov amplifikačných spôsobov a produktov opísaných v predloženej prihláške, nevyhnutnosť a typ takýchto analyticko-špecifických prídavných krokov môže byť jednoducho odvodená na základe predchádzajúceho stavu techniky, ako aj neobmedzujúcich nasledujúcich obrázkov a príkladov opisujúcich základné detaily a niektoré aplikácie vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: schematické znázornenie mechanizmu, ktorý je podstatou izotermálnej amplifikácie na tuhých podkladoch. Písmená a čísla označujú deje a zložky definované v opise vynálezu.

Obrázok 2: sekvencia templátového T1 plazmidového inzeru. Sekvencie použité na hybridizáciu s rôznymi primermi a na amplifikáciu špecifických templátov testovaných v príkladoch sú podčiarknuté. Názov primeru a smer predlžovania sú vyznačené nad nimi.

Obrázok 3: obrazkové kópie digitálnych invertovaných obrazov fluorescenčne značených nukleových kyselín izotermálne amplifikovaných na tuhom podklade, ktoré sa pozorovali s epifluorescenčným mikroskopom vybaveným s CCD fotoaparátom. Rozsah obrazov je uvedený na ľavej hornej strane obrázku.

Obrázok 4: log-log krivka hustoty DNA kolónie pozorovanej na dne PicoGreen™ farbených jamiek po izotermálnej amplifikácii, keď boli imobilizované rôzne koncentrácie templátu. Každý bod je priemerom troch pozorovaní. Sklon priamky je jedna.

Obrázok 5: zmena celkovej fluorescencie získaná, keď sa templáty s rôznou dĺžkou amplifikovali izotermálne. Rovnaká zvolená jednotka sa použila pre všetky krivky.

Obrázok 6: porovnanie celkovej fluorescencie získanej, keď sa templát T386 imobilizoval na jamky alebo bol v roztoku, alebo keď templát T386 v amplifikačnom procese chýbal.

Obrázok 7: digitalizovaný obraz 2% agarózového gélu, na ktorý boli nanesené amplifikačné produkty získané prostredníctvom PCR alebo kvapalnou izotermálnou amplifikáciou, ktorá bežala 30 minút v elektrickom poli 10 V/cm. Dráhy

1, 5, 9, 13: 2,5 mikrolitra markerov molekulovej hmotnosti (Superladder low, rebrík po 100 bázových pároch; Gensura), pričom relevantné počty bázových párov sú uvedené vľavo. Dráhy 2, 3 a 4: 6 mikrolitrov amplifikovaného a purifikovaného templátu T90 generovaného po termocyklizačnej PCR (dráha 2) alebo v izotermálnych podmienkach pri 72 °C (dráha 3) alebo pri 78 °C (dráha 4). Dráhy 6, 7 a 8: 2,5 mikrolitra amplifikovaného a purifikovaného templátu T386 generovaného po termocyklizačnej PCR (dráha 6), alebo v izotermálnych podmienkach pri 72 °C (dráha 7) a 78 °C (dráha 8). Dráhy 10, 11 a 12: 2,5 mikrolitrov amplifikovanej a purifikovanej negatívnej kontroly (len primery) generovanej po termocyklizačnej PCR (dráha 10), alebo v izotermálnych podmienkach pri 72 °C (dráha 11) a 78 °C (dráha 12). Gél sa farbilo so SybrGreen™ (Molecular Probes, Eugene OR).

Obrázok 8: prímer dvoch impulzových experimentov ukazujúci množstvo ³²P-dCTP inkorporované použitím izotermálnej amplifikácie použitím rozličných enzýmov: Dynazyme (Dyn), Pfu polymerázy (Pfu), Taq polymeázy (Taq), Vent™ (Vent).

Obrázok 9: zmena množstva fluorescencie získanej uskutočnením izotermálnej amplifikácie použitím rôznych teplôt (A) alebo rôzneho percentuálneho zastúpenia DMSO (B) použitím templátov s rôznou dĺžkou. Každá krivka bola normalizovaná vo vzťahu k jej najvyššej hodnote.

Obrázok 10: digitalizovaný obraz agarózového gélu, ktorý bežal 30 minút v elektrickom poli 10 V/cm, a na ktorý boli nanesené PCR produkty získané použitím rôznych východiskových materiálov. Dráhy 1 a 8 sú 10bp DNA rebríkom (Superladder low, Gensura), pričom relevantný počet báz je uvedený naľavo. PCR východiskovým materiálom bol 0,1 nanogramov T386 (dráha 2), žiadny východiskový materiál (dráha 3), alikvot jamiek, kde bol T386 imobilizovaný (dráhy 4 a 6), alebo jamiek, kde nebol T386 imobilizovaný (dráha 5 a 7), a jamiek, kde sa predtým uskutočnila izotermálna amplifikácia (dráhy 4 a 5) a kde sa neuskutočnila (dráhy 6 a 7). Gél bol farbený so SybrGreen™ (Molecular Probes, Eugene OR). Sotva viditeľné pásy naspodku gélu sú primery použité na PCR amplifikáciu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Izotermálna amplifikácia templátovej DNA imobilizovanej na tuhom podklade

Metódy

DNA sekvencie

Primery P1 (24-mér; sekv. č. 1), P2 (24-mér, sekv. č. 2) a P3 (40-mér, sekv. č. 3) sú syntetické oligonukleotidy nesúce C6 amino pripájaciu skupinu na svojom 5' konci. Táto chemická skupina bola použitá na imobilizáciu primerov a templátov na tuhý podklad na aplikáciu spôsobov podľa vynálezu.

Templáty T3 (sekv. č. 9) a T4 (sekv. č. 10), ktoré sú 68-mérmi majúcimi sekvenciu zodpovedajúcu P1 na 5' konci a sekvenciu komplementárnu s P2 na 3' konci, a T90 (90-mér so sekvenciou zodpovedajúcou P1 na 5' konci a sekvenciou komplementárnou s P2 na 3' konci, sekv. č. 11) sú syntetické oligonukleotidy nesúce C6 amino pripájaciu skupinu na svojom 5' konci (T90) alebo 5' fosfátovú skupinu (T3 a T4).

Templáty T155 (155-mér, sekv. č. 12), T203 (203-mér, sekv. č. 13), T386 (386-mér, sekv. č. 14) a T605 (605-mér, sekv. č. 15) majú sekvencie zodpovedajúce P3 na 5' konci a sekvenciu komplementárnu s P2 na 3' konci. Boli skonštruované prostredníctvom amplifikácie včlenených fragmentov T1 (sekv. č. 8), sekvencie s 823 bázovými párami obsiahnutej v pBSk-plazmide (Strategene), ako je znázornené na obrázku 2. Priamy primer P3 (40-mér majúci sekvenciu zodpovedajúcu P1 na 5' konci a sekvenciu komplementárnu so 16-nukleotidovou T1 sekvenciou na 3' konci, sekv. č. 3) nesie 5' amino pripájaciu skupinu. Reverzné primery P155r (sekv. č. 4), P203r (sekv. č. 5), P386r (sekv. č. 6) a P605r (sekv. č. 7) sú 44-mérnymi syntetickými oligonukleotidmi, ktoré majú sekvenciu zodpovedajúcu P2 na 5' konci a sekvenciu komplementárnu s rozličnými 16-nukleotidovými T1 sekvenciami). Tieto templáty sa amplifikovali použitím 100 mikrolitrov roztoku obsahujúceho 5 jednotiek Taq polymerázy (Perkin-Elmer), 1x Taq tlmičový roztok (Perkin-Elmer), dTNPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia) 200 μ M, 5 nanogramov na mikroliter pBSk-plazmidu, 1 μ M primeru P3 a 1 μ M zodpovedajúceho reverzného primeru. Uskutočnilo sa dvadsať PCR cyklov (94 °C 30 sekúnd,

62 °C 30 sekúnd, 72 °C 60 sekúnd) a výsledný produkt sa purifikoval použitím QiaQuick kitu (Qiagen) v súlade s inštrukciou výrobcu. Roztok použitý na izoláciu purifikovaných nukleových kyselín obsahoval 10 µM boritan sodný (pH 7,5).

Všetky syntetické oligonukleotidy sa získali od Microsynth (Švajčiarsko).

Protokol na imobilizáciu primerovej a templátovej nukleovej kyseliny na tuhom podklade

Tuhý povrch použitý na demonštrovanie jednoduchosti spôsobov podľa vynálezu bol reprezentovaný vnútram jamiek s plochým dnom vyrobených z funkcionizovaného syntetického materiálu označovaného Nucleolink™ (Nunc, Dánsko), ktoré boli zostavené do platí s celkovým tvarom zodpovedajúcim 96 jamkovému PCR zariadeniu. Keď sa naplnili objemom imobilizačného a amplifikačného roztoku používaného v príkladoch (15 až 20 mikrolitrov), povrch každej jamky, ktorý bol skutočne vystavený týmto roztokom, zodpovedá približne 30 mm².

Primery a templáty boli pripojené na Nucleolink™ platne, ktoré sa udržiavali na ľade, zatiaľ čo sa nukleové kyseliny nariedili v imobilizačnom roztoku obsahujúcom 10nM imidazol a 10mM hydrochlorid 1-etyl-3-(3-dimetylamino-propyl)-karbodiimidu (EDC), a pridali sa do jamiek. Potom, ako sa všetky jamky naplnili sa platne inkubovali 10 minút pri 50 °C. Jamky sa potom premývali pri laboratórnej teplote dvakrát s roztokom obsahujúcim 0,4M NaOH a 0,1% Tween-20 a nakoniec trikrát s TNT, roztokom obsahujúcim 100mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, a to predtým ako boli podrobené izotermálnej amplifikácii.

Protokol vizualizácie amplifikovaných nukleových kyselín

Po izotermálnej amplifikácii sa jamky trikrát premyli v 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) a potom sa DNA kolónie vizualizovali prostredníctvom inkubovania jamiek s PicoGreen™ (Molecular Probes), molekulou, ktorá je fluorescenčná, keď sa naviaže na dvojvláknovú DNA, pričom bola rutinne nariedená 2000 krát v 20 mM Tris-HCl (pH 7,5). Každá jamka sa inkubovala s 50 µl PicoGreen™ riedenia 10 minút pri laboratórnej teplote.

DNA kolónie imobilizované na dne jamiek sa pozorovali použitím epi-fluorescenčného mikroskopu (Axiovert 100TV, eiss, Nemecko) vybaveného

s chladeným CCD fotoaparátom (Micomax 512x768, Princeton Instruments, Trenton, NJ), ktorý je riadený Winview softwarom (Princeton Instruments, Trenton, NJ). Obrazy sa získali po expozičnom čase 2 sekundy a analyzovali sa použitím analySIS softwaru (Soft Imaging System GmbH, Nemecko) alebo iného ekvivalentného softwaru.

Výsledky

Primery P1 a P2 a nukleokyselínové templáty T90 a T386 sa pripojili na Nucleolink™ jamky, ako je opísané vyššie. Templáty obsahujú také množstvo nukleotidov, ktoré je približne 0,6 a 2,5 násobkom perzistenčnej dĺžky, aby sa identifikoval prvý rozsah dĺžky templátu, na ktorý sú aplikovateľné spôsoby podľa vynálezu.

Jamky sa naplnili 20 µl imobilizačného roztoku obsahujúceho primery P1 a P2 (každý 250 nM) a templátom, ktorého typ a koncentrácia boli v každej jamke odlišné, ako je uvedené v tabuľke I:

Tabuľka I

Číslo jamky	Meno templátu	Koncentrácia templátu (nM)
A1	T90	3,1
B1	T90	1
C1	T90	0,3
D1	T90	0,1
E1	T90	0,03
F1	T90	0,01
G1	T90	0,003
H1	-	0
A2	T386	3,1
B2	T386	1
C2	T386	0,3
D2	T386	0,1
E2	T386	0,03

F2	T386	0,01
G2	T386	0,003
H2	-	0

Izotermálna amplifikácia sa uskutočňovala inkubovaním jamiek 1 hodinu pri 78 °C s 15 µl amplifikačného roztoku obsahujúceho 1 jednotu Pfu polymerázy (Stratagene), 10% dimetylsulfoxid (DMSO), 80µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 a 0,1 mg/ml BSA. Izotermálna inkubácia sa uskutočňovala použitím štandardného 96-jamkového PCR prístroja (MJ-Research PTC-200) nastaveného konštantne na 78 °C použitím zahrievaného veka.

Výsledné obrázky sú znázornené na obrázku 3. Vďaka použitému DNA farbiacemu postupu je signál spôsobovaný prítomnosťou (aspoň čiastočne) dvojvláknovej DNA amplifikovanej a imobilizovanej v kolóniách na dne Nucleolink™ jamiek. Obrázky sa invertovali, aby sa lepšie tlačili. Signál nižší alebo rovný 130 AU (zvolené jednotky, vypočítané softwarom riadiacim CCD fotoaparát) sa javí ako biela a signál vyšší alebo rovný 350 AU sa javí ako čierna.

Obrázok 3 znázorňuje to, že keď sa majú primery len pripojiť (H1 a H2) obraz je úplne biely, čo demonštruje, že tam nie je žiadna detegovateľná spontánna amplifikácia. Zatiaľ čo pri najvyšších koncentráciách templátu (A1/2, B1/2), pokrývajú amplifikačné produkty celý povrch nasycujú obraz, pričom zreteľné DNA kolónie sa získali v jamkách C1/2, D1/2 a E1/2 pri subnanomolárnych koncentráciách oboch templátov. Počet takýchto „miest“ (každé zaberajúce oblasť 1 až 5 štvorcových mikrometrov) rastie približne lineárne s koncentráciou templátu použitého v priebehu pripájacieho kroku. Amplifikácia sa uskutočňovala s templátmi majúcimi dve rozdielne dĺžky a použitím rôznych pomerov templátu a primeru v priebehu imobilizačného postupu.

Kvantitatívnejšia analýza účinnosti izotermálnej amplifikácie v termínoch počtu DNA kolónií je prezentovaná na obrázku 4. V testovaných experimentálnych podmienkach (imidazol/EDC nukleokyselinový imobilizačný roztok, Nucleolink™ jamky, 10 minút inkubovania pri 50 °C a dva 250 mM primery) sa môžu templáty v rozsahu 90 až 386 nukleotidov, pridávané do imobilizačného roztoku v subnano-

molárných koncentráciách, amplifikovať izotermálne ako DNA kolónie na tuhom podklade, získajúc niekoľko desiatok tisíc DNA kolónií na milimeter štvorcový.

Izotermálny amplifikačný postup sa aplikoval aj použitím iných dĺžok templátu a rozdielnych koncentrácií primerov. Séria ôsmich Nucleolink™ jamiek sa naplnila 20 µl imobilizačného roztoku obsahujúceho konštantnú sub-nanomolárnu koncentráciu jedného templátu pre každú sériu, pre A (0,14 nM T155), B (0,2 nM T203), C (0,08 nM T386) a pre D (0,04 nM T606). Koncentrácie sa definovali na základe kriviek získaných pre každý templát, ako je znázornené na obrázku 4 pre dve z nich.

Osem jamiek obsahovalo P1 a P2 v koncentráciách uvedených v tabuľke II.

Tabuľka II

Číslo jamky	P1 (nM)	P2 (nM)
1	250,0	250,0
2	75,0	75,0
3	55,0	55,0
4	37,5	37,5
5	22,5	22,5
6	6,8	6,8
7	2,0	2,0
8	0,6	0,6

Po uskutočnení izotermálnej amplifikácie, ako je opísaná vyššie, sa účinnosť spôsobu podľa vynálezu môže merať prostredníctvom fluorescenčného signálu normalizovaného pre dĺžku templátu, pri rôznych koncentráciách primeru (obrázok 5). Normalizácia je nevyhnutná preto, že dlhšie templáty zahŕňajú viac DNA farbivacej zlúčeniny, takže surový fluorescenčný signál sa po odčítaní pozadia delí dĺžkou templátu (vyjadrenou v kilobázach).

Tieto experimenty ukazujú, že množstvo primerov P1 a P2 nevyhnutné na získanie detegovateľnej hladiny amplifikácie spôsobom podľa vynálezu v predtým nastavených imobilizačných a amplifikačných podmienkach, čiastočne závisí na dĺžke templátu. Zatiaľ čo signál je dostatočne silný pri celkovej koncentrácii primerov

nižšej ako 100 nM pre menšie templáty s dĺžkou približujúcej sa perzistenčnej dĺžke (T90 a T155, 0,6, respektíve 1 násobok perzistenčnej dĺžky), dlhšie templáty (T386 a T605, 2,5, respektíve 4 násobok perzistenčnej dĺžky) sa ešte amplifikujú, ale vyžadujú celkovú koncentráciu primerov vyššiu ako 100 nM. Tieto výsledky naznačujú, že v dlhších imobilizovaných nukleových kyselinách, ktoré pravdepodobne môžu zaujať alternatívnu trojrozmernú konfiguráciu absorbujúcu frakciu mechanického napätia nevyhnutného na poháňanie izotermálnej separácie a vytesňovania vlákna, je indukovateľné menšie mechanické napätie.

Nasledujúce kontrolné experimenty sa uskutočnili na overenie toho, že amplifikované produkty sa skutočne získali príslušnou imobilizáciou primerov a templátov na tuhom podklade.

V prvom experimente sa predtým opísaný izotermálne amplifikačný a vizualizačný protokol uskutočňoval s alebo bez imobilizovaných primerov (P1 a P2, každý 250 mM) a s templátom (0,08nM T386), buď imobilizovaným, alebo v roztoku. Ako je znázornené na obrázku 6, celková fluorescencia je veľmi slabá, keď je templát buď v roztoku, alebo chýba, aj ak sa imobilizujú veľké množstvá primerov. Takýto signál je pravdepodobne spôsobený marginálnou samo-amplifikáciou. V každom prípade je evidentné, že len imobilizácia oboch primerov a templátu umožňuje izotermálnu amplifikáciu dvojvláknovej DNA vo forme DNA kolónií.

V druhom kontrolnom experimente sa používajú rovnaké nukleové kyseliny ako v predchádzajúcich experimentoch v kvapalnej fáze, použitím PCR podmienok alebo izotermálnych podmienok rovnakých ako boli aplikované na tuhom povrchu.

Amplifikačný roztok používaný na amplifikačné experimenty obsahoval 0,05 jednotky/ μ l Pfu polymerázy (Stratagene), 80 μ M dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, 1 μ M primer P1, 1 μ M primer P2, bez alebo s templátom (0,13nM T386 alebo 0,33nM T90). Amplifikačný roztok sa rozdelil do troch alikvot, pričom každá sa podrobila rôznym amplifikačným podmienkam: 20 cyklov termocyklizačnej PCR (94 °C 30 sekúnd, 60 °C 30 sekúnd, 72 °C 1 minúta), 1 hodina pri 72 °C alebo 1 hodina pri 78 °C. Amplifikačné produkty sa purifikovali na Qiaquick kolónach (Qiagen) a naniesli sa na 2% agarózový gél.

Ako je znázornené na obrázku 7, žiadne amplifikačné produkty sa nezískali v izotermálnych podmienkach, hoci primery mohli amplifikovať templát v kvapaline, keď sa aplikovali termocyklizačné podmienky.

Účinnosť rôznych komerčných DNA polymeráz na aplikáciu spôsobov podľa vynálezu sa testovali meraním začleňovania rádioaktívneho nukleotidu. Izotermálna amplifikácia sa uskutočňovala použitím P1 a P2 ako primerov (každý 250nM) s alebo bez T3 a T4, čo sú veľmi krátke templáty (68-méry) pridávané vo veľkom nadbytku (každý 5nM). Izotermálna amplifikácia sa uskutočňovala pri 80 °C 90 minút použitím 20 µl amplifikačného roztoku obsahujúceho 0,5 jednotky DNA polymerázy, 5% DMSO, 80µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA a 0,128µM α³²P-dCTP. Použitými DNA polymerázami boli Dynazyme™ (Finzyme, Fínsko), Pfu polymeráza (Promega), Taq polymeráza (Perkin Elmer) a Vent™ polymeráza (New England Biolabs).

Po izotermálnej amplifikácii sa Nucleolink™ jamky päťkrát premyli v 20mM Tris-HCl (pH 7,5), umiestnili sa do scintilačného snímača, aby sa vypočítalo množstvo začleneného značeného nukleotidu.

Ako je znázornené na obrázku 8, všetky testované polymerázy umožňujú izotermálnu amplifikáciu spôsobmi podľa vynálezu, ale s rôznymi výťažkami a rôznymi úrovňami amplifikačného pozadia. Pfu a Vent™ polymerázy majú najlepší pomer špecifického ku nešpecifickému signálu.

Iné alternatívne podmienky na aplikáciu izotermálnej amplifikácie podľa vynálezu sa testovali s ohľadom na teplotu a koncentráciu DMSO, porovnávajúc výsledky získané použitím templátov s rôznou dĺžkou.

Každý templát (0,14nM T155, 0,2nM T203, 0,08nM T386 a 0,04nM T606) sa imobilizoval v rôznych sériách Nucleolink™ jamiek spolu s primermi P1 a P2, každý 250nM. Izotermálna amplifikácia sa potom uskutočňovala buď použitím 10% DMSO, ale v PCR zariadení vytvárajúcom teplotný gradient pozdĺž série jamiek, alebo pri 78 °C, ale v prítomnosti rôznych množstiev DMSO.

Po izotermálnej amplifikácii, premývaní a vizualizácii sa celková fluorescencia DNA kolónií merala s obrazovým analyzačným softwarom kvantifikujúcim intenzitu všetkých bodov prezentovaných na obraze. Ako je znázornené na obrázkoch 9A

a 9B, množstvo amplifikovaného produktu môže veľmi závisieť na aplikovaných amplifikačných podmienkach. Izotermálna amplifikácia je výnimočne účinná pre všetky templáty pri teplotách medzi 77 a 81 °C a pri DMSO koncentráciách medzi 8 % a 14 %.

Príklad 2

Analýza amplifikovanej nukleovej kyseliny

Potom ako sa izotermálne získali DNA kolónie, uskutočňovali sa niektoré experimenty na hodnotenie niektorých znakov amplifikovaných nukleových kyselín.

Priemerné množstvo nukleokyselínových vlákien nachádzajúcich sa v každom bode sa odhadovalo použitím tak DNA farbenia, ako aj rádioaktívne značených nukleotidov, použitím Pfu polymerázy a podmienok na imobilizáciu, amplifikáciu, vizualizáciu a snímanie použitých pre experiment znázornený na obrázku 8.

Templát T386 sa pridával do sérií jamiek s rôznymi koncentraciami (1nM, 0,31nM) alebo chýbal. Impulzy sa konvertovali na počet molekúl na DNA kolóniu berúc do úvahy povrch jamky pokrytý objemom amplifikačného roztoku (približne 27,56 mm², keď sa použije objem 15 µl a jamka má priemer 4 µl), veľkosť každého analyzovaného obrazu (približne 0,08 mm²), ako aj špecifickú aktivitu značky. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke III.

Tabuľka III

	Jamky obsahujúce 1nM T386						Jamky obsahujúce 0,3nM T386						č. T386
Impulzy	8304	8536	6754	8615	6427	4867	3687	4787	4988	2902	3693	4072	843
Počet kolónií	3846	3831	3149	3788	2844	2349	1808	2087	2408	1218	1638	1935	0
Priem. počet vlákien na kolóniu	3007	3103	2987	3167	3147	2885	2840	3194	2885	3318	3140	2931	N.A
	3049 ± 109						3051 ± 193						

N.A: neaplikovateľné

Tento experiment ilustruje, že spôsoby podľa vynálezu umožňujú izotermálnu amplifikáciu jedinej templátovej molekuly na niekoľko tisíc vlákien imobilizovaných v diskkrétnej oblasti. Navyše, hoci je počet DNA kolónií zjavne závislý na koncentrácii templátu, účinnosť spôsobu podľa vynálezu, meraná ako počet amplifikovaných vlákien na DNA kolóniu, je nezávislá na koncentrácii templátu v pracovných podmienkach (tzn. v nanomolárnom rozsahu).

Bolo tiež možné izolovať produkty izotermálnej amplifikácie z povrchu. Imobilizačný protokol opísaný vyššie sa aplikoval v štyroch jamkách použitím P1 a P2 vo všetkých z nich a T386 len v dvoch z nich, ale len dve, jedna s a jedna bez imobilizovaného T386 boli podrobené vyššie opísanému amplifikačnému protokolu. Všetky jamky sa potom naplnili 60 μ l PCR roztoku obsahujúceho 5 jednotiek Pfu polymerázy (Stratagene), 10% DMSO, 100 μ M dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Pharmacia), 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA a primery P3 a P386r (každý 1 μ M). Jeden PCR cyklus sa uskutočňoval v jamkách (94 °C 30 sekúnd, 60 °C 30 sekúnd, 72 °C 60 sekúnd) a potom sa 30 μ l PCR roztoku prenieslo do PCR skúmavky. Ako kontrola sa iná PCR skúmavka naplnila 30 μ l rovnakého PCR roztoku, do ktorého sa pridalo 0,1 ng T386. Potom sa uskutočňovali PCR cykly (94 °C 30 sekúnd, 60 °C 30 sekúnd, 72 °C 60 sekúnd) a 4 μ l každej vzorky sa naniesli na 2% agarózový gél. Výsledky sú uvedené na obrázku 10. Produkt izotermálnej amplifikácie poskytol PCR produkt porovnateľný s PCR produktom získaným, keď bol T386 prítomný v roztoku, zatiaľ čo produkt bol ťažko viditeľný, ako bol DNA pripojená na skúmavku, ktorá sa nepodrobila izotermálnej amplifikácii. Kontroly ukázali, že nevzniká žiadny artefakt, ako napríklad primerové diméry, ani v priebehu izotermálnej amplifikácie, ani v priebehu PCR amplifikácie.

Zoznam sekvencií

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Izotermálna amplifikácia nukleových kyselín na tuhom podklade

<130> 464

<160> 15

<170> PatentIn verzia 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 1

caccaacca aaccaacca aacc

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 2

gaggaaaggg aagggaaagg aagg

24

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 3

caccaacca aaccaacca aaccggctca cgctgtaat

40

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 4

gaggaaaggg aagggaaagg aaggatccgc ctcccaggta gaat

44

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 5
gaggaaaggg aagggaaag aaggatccgc ctctggggt caag 44

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> syntetický konštrukt

<400> 6
gaggaaaggg aagggaaag aaggatccga tctgcctggt tctg 44

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> syntetický konštrukt

<400> 7
gaggaaaggg aagggaaag aaggatccgt gagcgcaacg caat 44

<210> 8
<211> 823
<212> DNA
<213> syntetický konštrukt

<400> 8
gggcccccc tcgagaagcc gtgctgtcag catcagcadc atcggtgaga cctctcccca 60
agcctacag accctgggac tagggtgcag gacagcacag gctctaattt cctgccccat 120
tctggcctta tccctaacag ccaccccacc tctccctcca tgcaccaca cccaagcctc 180
ccctacccca cccaaattct gccaaagagag cagccaagcc tctcccttct tccctctgag 240
ctaaaaaag gaacagacgg ctgggcgcgg tggctcacgc ctgtaatccc aacctccat 300
gcatctggtg atgcgagctc gactctgggg aaaacactgg gttttcccag agtcgagcat 360
tctacctggg aggccagcta cttgagaggc tgaggcagga gaattgcttg aaccaggag 420
gcatagattg tgatgagcca agatcgcacc attgcatgcc agcctcggca acaaaagtga 480
aactccatct caaaaaaaaa agaaagggaa agactccact ggggctccca ctaaataacc 540
ctctctcaac ccgaagtctt cctttctgac tggatccaac tttgtcttcc agaaccaggc 600
agatccacta gttctagagc ggccgccacc gccgtggagc tccagctttt gttcccttta 660
gtgagggtta attccgagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg 720
ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg 780
tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcggtgcgc tca 823

<210> 9
<211> 68
<212> DNA
<213> syntetický konštrukt

<400> 9
caccaacca aaccaacca aaccatgccg atgacctgca gaagccttcc tttcccttcc 60
ctttcctc 68

<210> 10
<211> 68

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400>10

caccaaccca aaccaaccca aaccgtactg caccaggcgg ccgcccttcc tttcccttcc 60
ctttcctc 68

<210> 11

<211> 90

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 11

caccaaccca aaccaaccca aacccctggg gaggcattgc gatgacctgc agaagccatg 60
ggatggcctt cctttccctt ccctttcctc 90

<210> 12

<211> 155

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 12

caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgctgtaat cccaacactc catgcatctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggcgga tccttccctt cccttccctt tcctc 155

<210> 13

<211> 203

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 13

caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgctgtaat cccaacactc catagctctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggccag ctacttgaga ggctgaggca ggagaattgc ttgaaccag gaggcgatc 180
cttcttttcc cttccctttc ctc 203

<210> 14

<211> 386

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 14

caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgctgtaat cccaacactc catgcatctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggccag ctacttgaga ggctgaggca ggagaattgc ttgaaccag gaggcataga 180
ttgtgatgag ccaagatcgc accattgcat gccagcctcg gcaacaaaag tgaaactcca 240
tctcaaaaaa aaaagaaagg gaaagactcc actggggctc ccactaaata accctctctc 300
aacccgaagt cttcctttct gactggatcc aactttgtct tccagaacca ggcagatcgg 360
atccttccctt tccttccctt tcctc 386

<210> 15

<211> 605

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 15

caccaaccca	aaccaaccca	aacoggtca	cgctgtaat	cccaacactc	catagctctg	60
gtgatgag	ctcgactctg	gggaaaacac	tgggttttcc	cagagtcgag	cattctacct	120
gggaggccag	ctacttgaga	ggctgaggca	ggagaattgc	ttgaaccag	gaggcataga	180
ttgtgatgag	ccaagatcgc	accattgcat	gccagcctcg	gcaacaaaag	tgaaactcca	240
tctcaaaaaa	aaaagaaagg	gaaagactcc	actggggctc	ccactaaata	accctctctc	300
aaccggaagt	cttcctttct	gactggatcc	aactttgtct	tccagaacca	ggcagatcca	360
ctagttctag	agcggccgcc	accgcggtgg	agctccagct	ttgttccct	ttagtgggg	420
ttaattccga	gcttggcgta	atcatggtca	tagctgttcc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	480
ctcacaattc	cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	540
tgagtgagct	aactcacatt	aattgcggtg	cgctcacgga	tccttccttt	cccttccttt	600
tcctc						605

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob izotermálnej amplifikácie aspoň jedného nukleokyselinového segmentu obsahujúceho do 1000 nukleotidov, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa nasledujúce kroky:

- a) vytvorenie aspoň jedného nukleokyselinového templátu obsahujúceho nukleovú kyselinu (kyseliny), ktorá sa má amplifikovať, pričom uvedená nukleová kyselina (kyseliny) obsahuje na 5' konci oligonukleotidovú sekvenciu Y a na 3' konci oligonukleotidovú sekvenciu Z, a okrem toho nesie na 5' konci prostriedok na jej (ich) mobilizáciu na tuhý podklad;
- b) vytvorenie jedného alebo viacerých kolóniových primerov X, ktoré môžu hybridizovať s oligonukleotidovou sekvenciou Z a na 5' konci nesú prostriedok na imobilizáciu kolóniových primerov na tuhý podklad;
- c) zmiešanie nukleokyselinového templátu (templátov) a kolóniových primerov spolu s roztokom umožňujúcim ich imobilizáciu prostredníctvom 5' konca na tuhý podklad v prítomnosti tuhého podkladu, aby sa 5' konce tak nukleokyselinového templátu (templátov), ako aj kolóniových primerov, naviazali na tuhý podklad;
- d) aplikovanie amplifikačného roztoku obsahujúceho aspoň nukleokyselinovú polymerázu a nukleotidové prekurzory na tuhý podklad na izotermálne generovanie a imobilizovanie nukleových kyselín so sekvenciou, ktorá je identická alebo komplementárna so sekvenciou imobilizovaného nukleokyselinového templátu (templátov).

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že sa dva odlišné kolóniové primery X' a X'' zmiešavajú s nukleokyselinovým templátom (templátmi) a sekvencie kolóniových primerov X' a X'' sú také, že oligonukleotidová sekvencia Z môže hybridizovať s jedným z kolóniových primerov X' a oligonukleotidová sekvencia Y je rovnaká ako jeden z kolóniových primerov X''.

3. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že oligonukleotidová sekvencia Z je komplementárna s oligonukleotidovou sekvenciou Y a kolóniový primer X má rovnakú sekvenciu ako oligonukleotidová sekvencia Y.

4. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že jeden alebo viacero kolóniových primerov X môže obsahovať degenerovanú primerovú sekvenciu a nukleokyselinový templát (templáty) obsahuje nukleovú kyselinu (kyseliny), ktoré sa majú amplifikovať, a neobsahuje oligonukleotidové sekvencie Y alebo Z na 5', respektíve 3' konci.

5. Spôsob podľa nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinovým templátom je genomická DNA, komplementárna DNA, rekombinantná DNA alebo akákoľvek forma syntetickej alebo modifikovanej DNA, RNA, mRNA alebo akákoľvek forma syntetickej alebo modifikovanej RNA.

6. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinový templát obsahuje 68 až 605 báz.

7. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinový templát (templáty) má v imobilizačnom roztoku koncentráciu medzi 1 nM a 0,01 nM.

8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 7, vyznačujúci sa tým, že kolóniové primery majú v imobilizačnom roztoku koncentráciu medzi 1000 nM a 50 nM.

9. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinovou polymerázou je DNA-závislá DNA polymeráza alebo RNA-závislá DNA polymeráza.

10. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinovou polymerázou je DNA polymeráza, ktorá je aktívna pri teplote medzi 70 °C a 85 °C.

11. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že amplifikácia sa uskutočňuje pri teplote medzi 77 °C a 81 °C.

12. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 11, vyznačujúci sa tým, že nukleotidovými prekurzormi amplifikačného roztoku sú deoxyribonukleotid trifosfáty.

13. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 12, vyznačujúci sa tým, že prostriedkom na imobilizáciu 5' konca tak nukleokyselinového templátu (templátov), ako aj kolóniových primerov, sú chemicky modifikovateľné funkčné skupiny, ktoré umožňujú vytváranie kovalentnej väzby medzi uvedenými molekulami a tuhým podkladom.

14. Spôsob podľa nároku 13, vyznačujúci sa tým, že nukleokyselinové templáty a primery sú modifikované s tiolovou, fosfátovou alebo amino-skupinou na 5' koncovej modifikácii a imobilizované použitím imobilizačného roztoku obsahujúceho hydrochlorid 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC).

15. Spôsob podľa nároku 13, vyznačujúci sa tým, že tuhý podklad umožňuje kovalentné naviazanie nukleovej kyseliny prostredníctvom funkcionalizácie použitím mono- alebo bifunkčných sieťujúcich reakčných činidiel.

16. Spôsob podľa nárokov 1 až 12, vyznačujúci sa tým, že prostriedkom na imobilizáciu 5' koncov tak nukleokyselinového templátu (templátov), ako aj kolóniových primerov, sú chemické skupiny viažuce molekuly imobilizované na tuhom podklade prostredníctvom afinity.

17. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 16, vyznačujúci sa tým, že amplifikačný roztok obsahuje 6% až 14% DMSO.

18. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 17, na izotermálne generovanie DNA kolónií na tuhom podklade.

19. Spôsob podľa nároku 18, vyznačujúci sa tým, že hustota generovaných nukleokyselinových kolónií je medzi 1000 a 100000 na každý mm².

20. Spôsob podľa nároku 18 alebo 19, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa ďalší krok vizualizácie amplifikovanej nukleovej kyseliny.

21. Spôsob podľa nároku 20, vyznačujúci sa tým, že sa použije interkalačné činidlo do dvojvláknovej DNA, značený nukleotid (nukleotidy) alebo značený oligonukleotid (oligonukleotidy).

22. Spôsob podľa nárokov 18 až 21, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa ďalší krok uvoľnenia jedného alebo viacerých imobilizovaných nukleokyselinových vlákien patriacich jednej alebo viacerým nukleokyselinovým kolóniám s chemickým, optickým, fyzikálnym alebo enzymatickým prostriedkom.

23. Spôsob podľa nárokov 18 až 22, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa ďalší krok uskutočňovania aspoň jedného kroku určovania sekvencie jednej alebo viacerých nukleokyselinových kolónií.

24. Spôsob podľa nároku 23, vyznačujúci sa tým, že determinácia sekvencie sa získa prostredníctvom začlenenia značeného nukleotidu (nukleotidov).

25. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že značený nukleotid (nukleotidy) sa začleňuje využitím kolóniových primerov.

26. Spôsob podľa nároku 25, vyznačujúci sa tým, že značený nukleotid (nukleotidy) sa začleňuje využitím primerov, iných ako kolóniových primerov, ktoré hybridizujú s jednou alebo viacerými amplifikovanými nukleovými kyselinami.

27. Spôsob podľa nároku 23, vyznačujúci sa tým, že determinácia sekvencie nasleduje po hybridizácii jedného alebo oboch nukleokyselinových vlákien, patriacich ku jednej alebo viacerým nukleokyselinovým kolóniám, so značeným oligonukleotidom (oligonukleotidmi).

28. Spôsob podľa nárokov 23 až 27, vyznačujúci sa tým, že značkou je rádioaktívna alebo fluorescenčná skupina.

29. Spôsob podľa nároku 23, vyznačujúci sa tým, že determinácia sekvencie nasleduje po uvoľnení jedného alebo oboch nukleokyselinových vlákien, ako je uvedené v nároku 22.

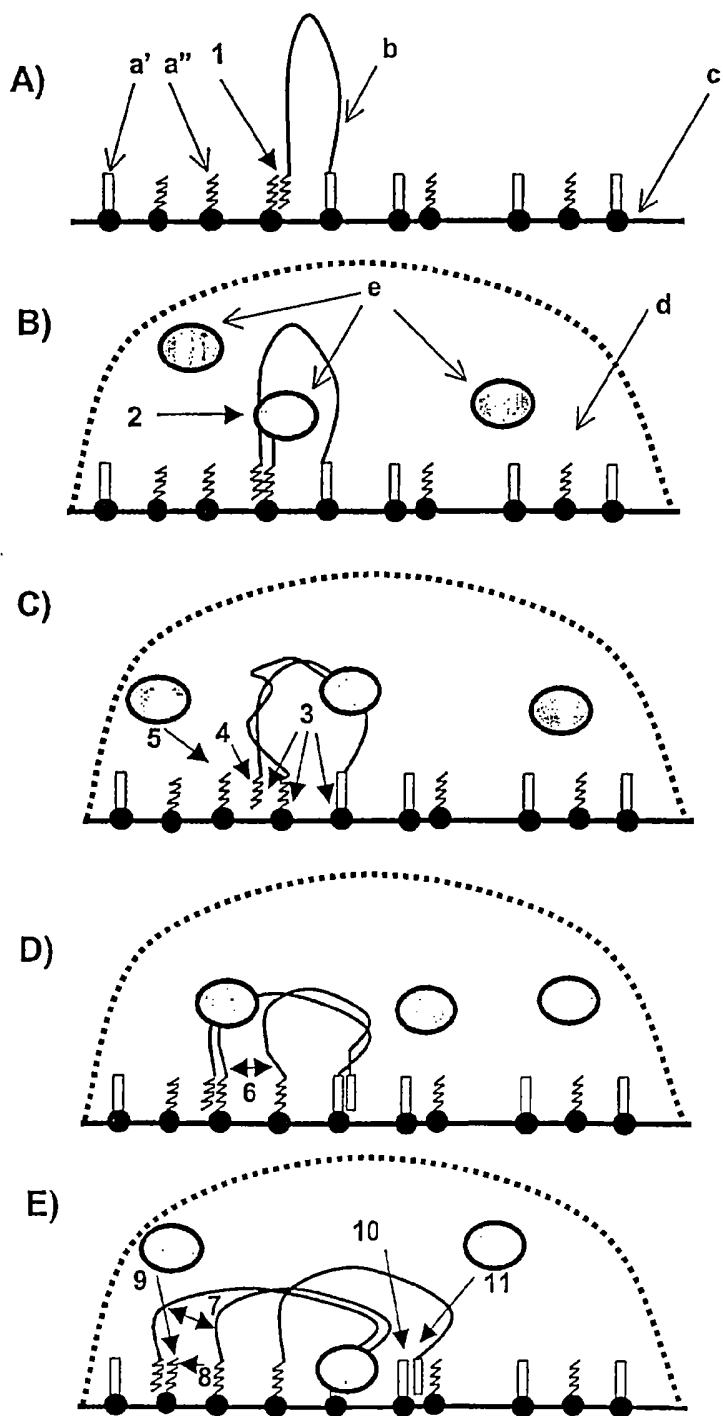
30. Spôsob podľa nároku 22, vyznačujúci sa tým, že sa determinujú celé alebo čiastočné sekvencie amplifikovaných nukleokyselinových templátov nachádzajúcich sa aspoň v jednej nukleokyselinovej kolónii.

31. Spôsob podľa nárokov 19 až 29, vyznačujúci sa tým, že ďalší krok (kroky) sa uskutočňuje naraz na jednej alebo viacerých nukleokyselinových kolóniách.

32. Použitie spôsobu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 31 na poskytnutie nukleokyselinových molekúl na použitie na sekvenovanie a opätovné sekvenovanie nukleových kyselín v oblasti štúdií a farmakoštúdií génov a ich funkcií, výskumu liečiv, charakterizácie potravín, genotypingu, diagnostik, monitorovania génovej expresie, vytvárania profilov genetickej diverzity, sekvenovania celého genómu a výskumu polymorfizmov, alebo na akékoľvek iné aplikácie zahŕňajúce amplifikáciu nukleových kyselín.

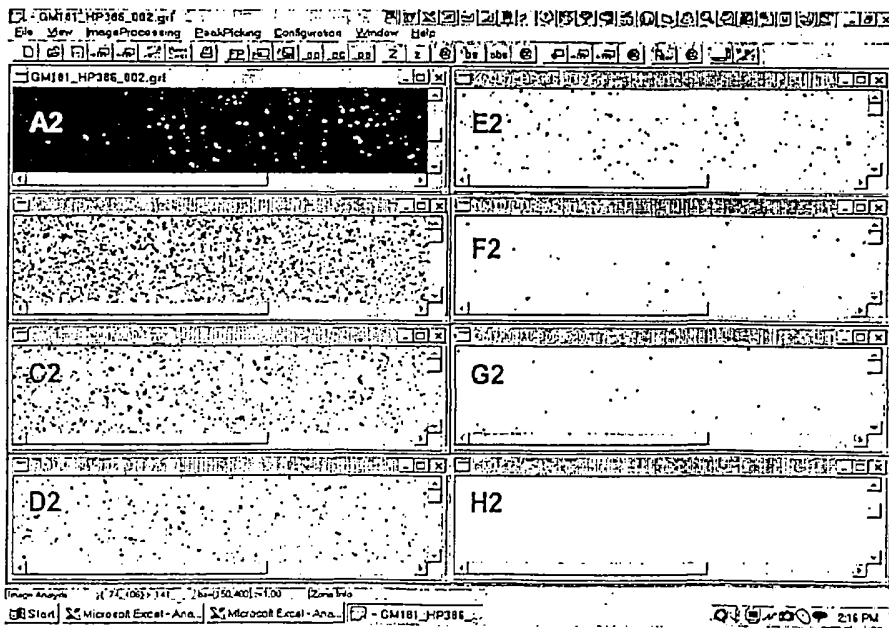
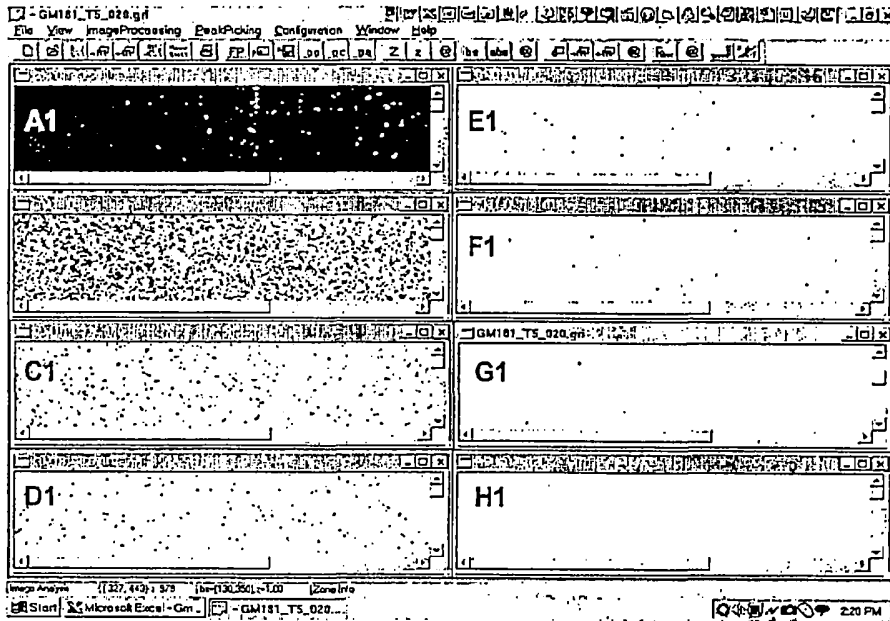
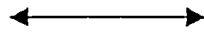
33. Kit na použitie na izotermálnu amplifikáciu nukleových kyselín, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 31 na poskytnutie nukleokyselinových molekúl na použitie na sekvenovanie a opätovné sekvenovanie nukleových kyselín v oblasti štúdií a farmakoštúdií génov a ich

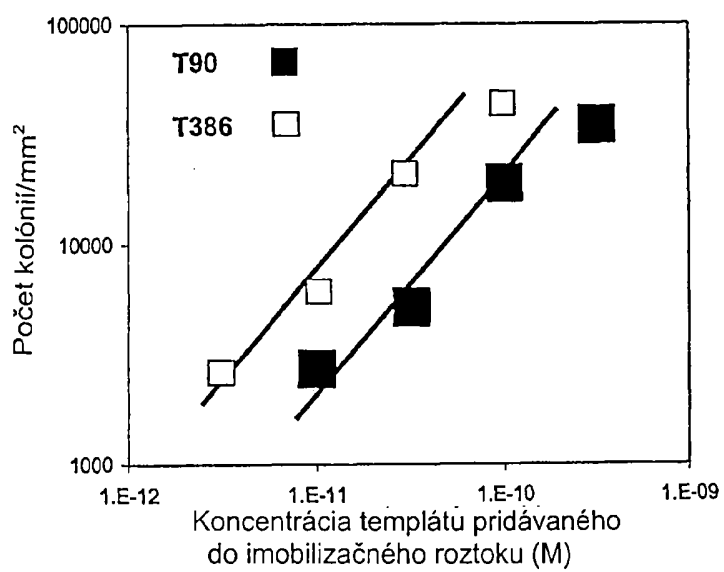
funkcií, výskumu liečiv, charakterizácie potravín, genotypingu, diagnostik, monitorovania génovej expresie, vytvárania profilov genetickej diverzity, sekvenovania celého genómu a výskumu polymorfizmov, alebo na akékoľvek iné aplikácie zahŕňajúce amplifikáciu nukleových kyselín.



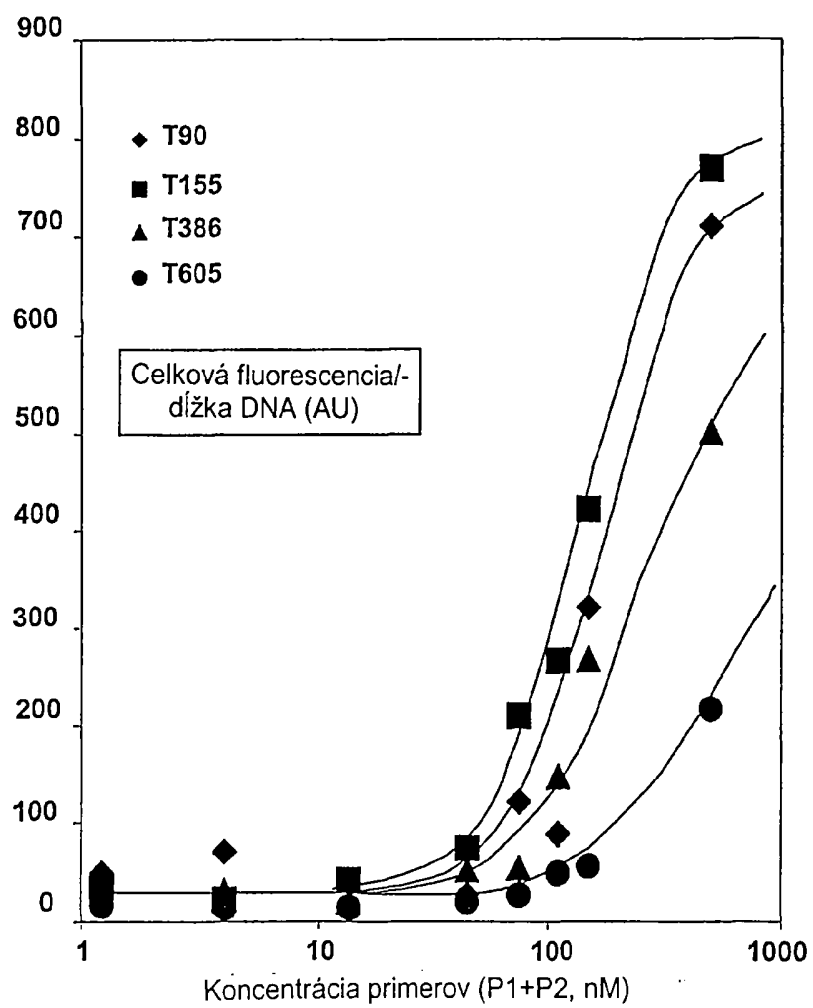
Obr. 1

100 mikrometrov

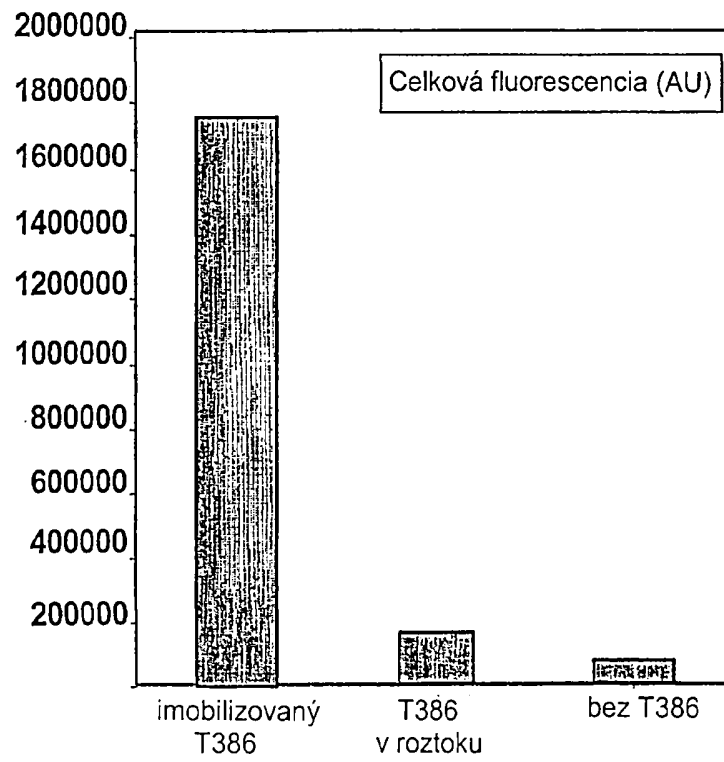




Obr. 4

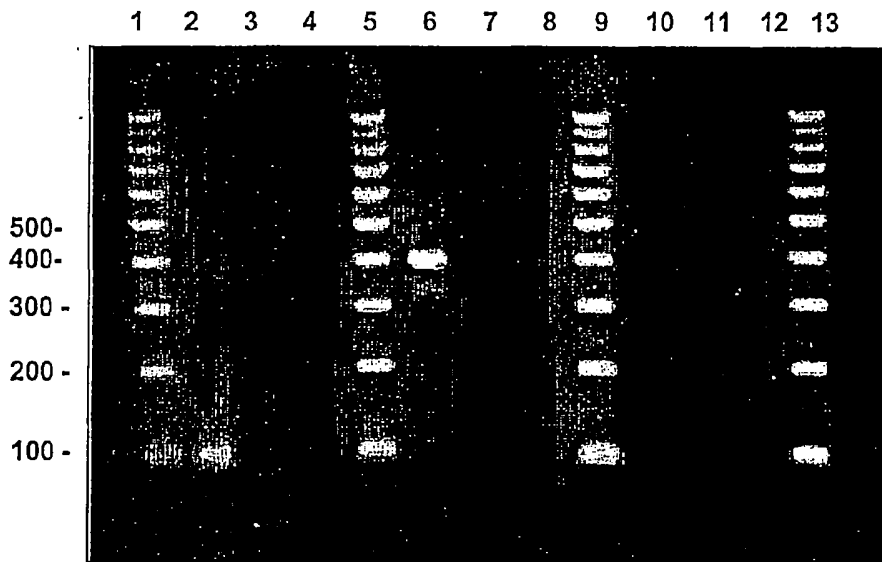


Obr. 5

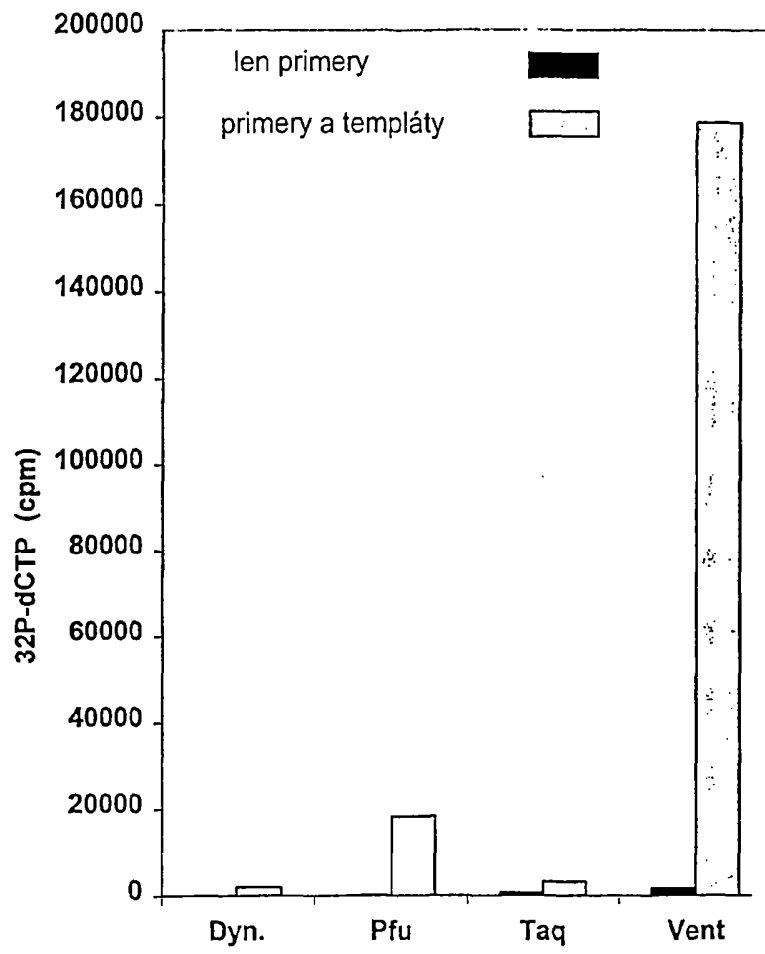


Obr. 6

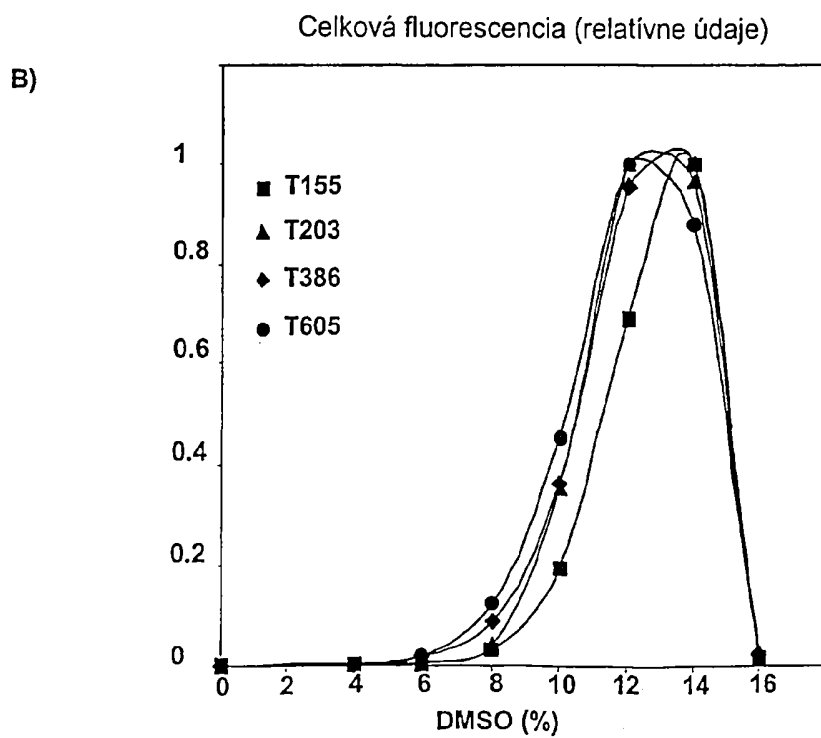
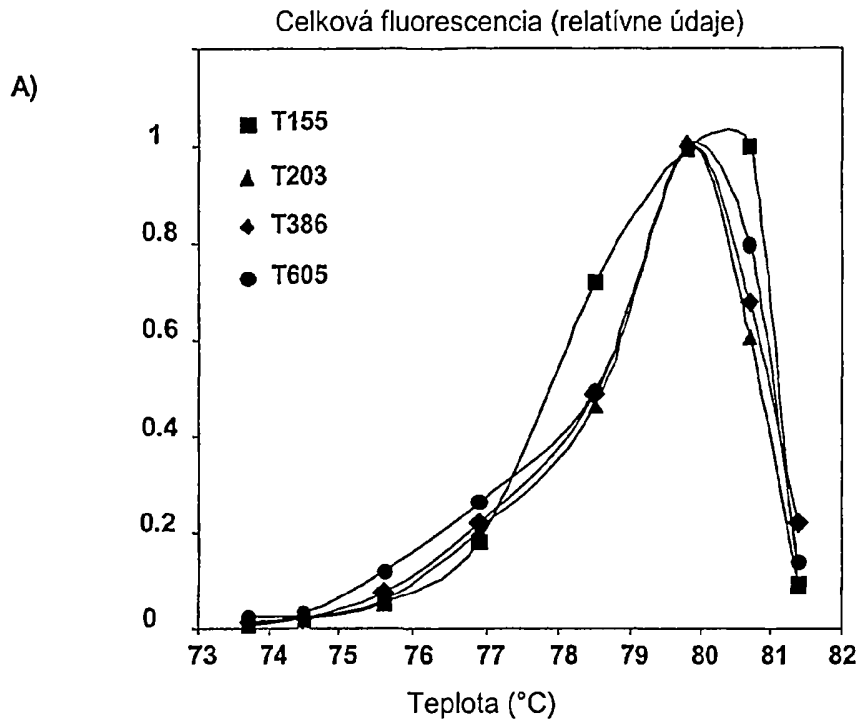
7/10



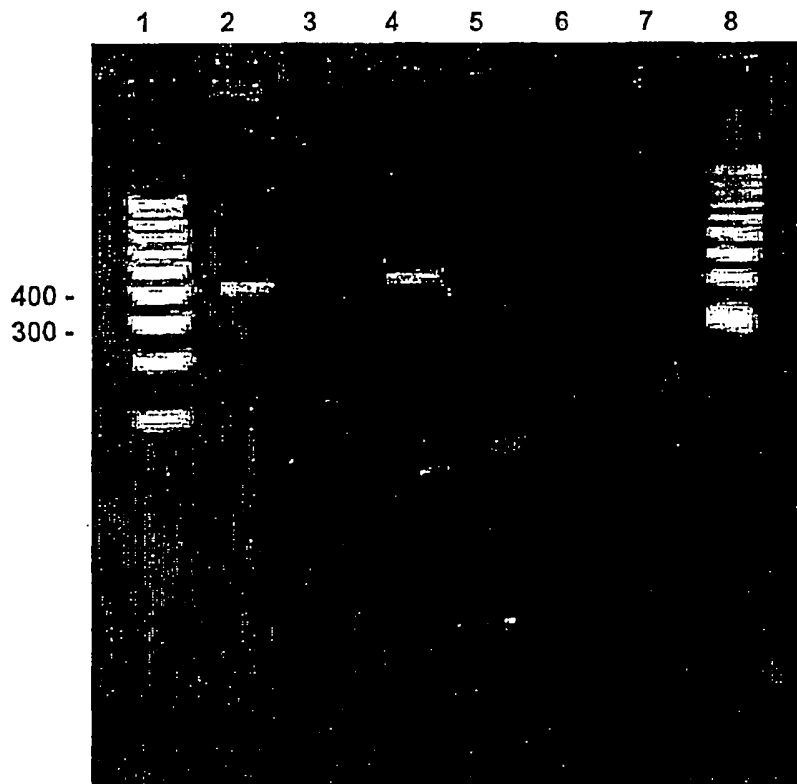
Obr. 7



Obr. 8



10/10



Obr. 10